

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 478**

51 Int. Cl.:

A61K 49/14 (2006.01)

C08G 69/10 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/US2013/030036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13154707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13775657 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2836238**

54 Título: **Conjugados de copolímero**

30 Prioridad:
12.04.2012 US 201261623476 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2018

73 Titular/es:
**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2, Shimohozumi, Ibaraki
Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:
**TSANG, KWOK, YIN;
WANG, HAI;
BAI, HAO;
JIN, YI y
YU, LEI**

74 Agente/Representante:
MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 677 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de copolímero

5 **Campo**

Esta solicitud se refiere en general a polímeros solubles en agua biocompatibles con grupos funcionales colgantes y a métodos para fabricarlos, y particularmente a conjugados de copolímero de poliglutamato-aminoácido útiles para una variedad de aplicaciones de administración de fármacos, por ejemplo, anticancerígenas.

10

Descripción

Se ha usado una variedad de sistemas para la administración de fármacos. Por ejemplo, tales sistemas incluyen cápsulas, liposomas, micropartículas, nanopartículas y polímeros. Varios sistemas biodegradables a base de poliéster se han caracterizado y estudiado. Poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) son algunos de los biomateriales mejor caracterizados con respecto al diseño y rendimiento para aplicaciones para administración de fármacos. Véanse Urich, K.E.; *et al.*, Chem. Rev. (1999) 99:3181-3198 y Panyam J. *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. (2003) 55:329-47. También se han investigado sistemas biodegradables basados en poliortoésteres. Véase Heller, J. *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. (2002) 54:1015-1039. Adicionalmente, se han investigado sistemas de polianhídrido. Tales polianhídridos son normalmente biocompatibles y pueden degradarse *in vivo* para dar compuestos relativamente no tóxicos que se eliminan del cuerpo como metabolitos. Véase Kumar, N. *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. (2002) 54:889-91.

Los polímeros a base de aminoácidos se han considerado como una posible fuente de nuevos biomateriales. Se han investigado poliaminoácidos que tienen buena biocompatibilidad para administrar compuestos de bajo peso molecular. Se ha identificado un número relativamente pequeño de poli(ácidos glutámicos) y copolímeros como materiales candidatos para la administración de fármacos. Véase Bourke, S.L. *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. (2003) 55:447-466.

Los polipéptidos, proteínas terapéuticas y fármacos anticancerígenos hidrófobos administrados padecen a menudo una escasa biodisponibilidad. Tal escasa biodisponibilidad puede deberse a la incompatibilidad de las disoluciones bifásicas de fármacos hidrófobos y disoluciones acuosas y/o la rápida eliminación de estas moléculas de la circulación sanguínea mediante degradación enzimática. Una técnica para aumentar la eficacia de las proteínas administradas y otros agentes de molécula pequeña conlleva conjugar el agente administrado con un polímero, tal como una molécula de polietilenglicol ("PEG"), que puede proporcionar protección frente a la degradación enzimática *in vivo*. Tal "pegilación" a menudo mejora el tiempo de circulación y, por tanto, la biodisponibilidad de un agente administrado.

Sin embargo, el PEG tiene desventajas en determinados aspectos. Por ejemplo, debido a que el PEG es un polímero lineal, la protección estérica proporcionada por PEG es limitada, en comparación con polímeros ramificados. Otra desventaja de PEG es que es generalmente propenso a la derivatización en sus dos extremos terminales. Esto limita el número de otras moléculas funcionales (por ejemplo, las útiles para la administración de proteínas o fármacos a tejidos específicos) que pueden conjugarse con PEG.

El poli(ácido glutámico) (PGA) es otro polímero de elección para solubilizar fármacos anticancerígenos hidrófobos. Se han notificado algunos fármacos anticancerígenos conjugados con PGA. Véase Chun Li. Adv. Drug Del. Rev. (2002) 54:695-713. Sin embargo, ninguno de estos polímeros de PGA está actualmente aprobado por la FDA.

El paclitaxel, extraído de la corteza del árbol tejo del pacífico (Wani *et al.*, J Am Chem Soc. (1971) 93:2325-7), es un fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer de mama. Sin embargo, como otros fármacos anticancerígenos, el paclitaxel padece una escasa biodisponibilidad debido a su hidrofobicidad e insolubilidad en disolución acuosa. Un modo para solubilizar el paclitaxel es formularlo en una mezcla de Cremophor-EL y etanol deshidratado (1:1, v/v) (Sparreboom *et al.*, Cancer Research (1999) 59: 1454-1457). Esta formulación se comercializa actualmente como Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb). Otro método de solubilización de paclitaxel es mediante emulsiónamiento usando homogeneización a alta cizalladura (Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research (2000) 17:175-182). Se han adelantado conjugados de polímero-paclitaxel en varios ensayos clínicos (Ruth Duncan, Nature Reviews Drug Discovery (2003) 2:347-360). El paclitaxel se ha formulado en nanopartículas con proteína albúmina humana, que se ha usado en estudios clínicos (Damascelli *et al.*, Cancer. (2001) 92:2592-602, e Ibrahim *et al.*, Clin Cancer Res. (2002) 8: 1038-44). Esta formulación se comercializa actualmente como Abraxane[®] (American Pharmaceutical Partners, Inc.).

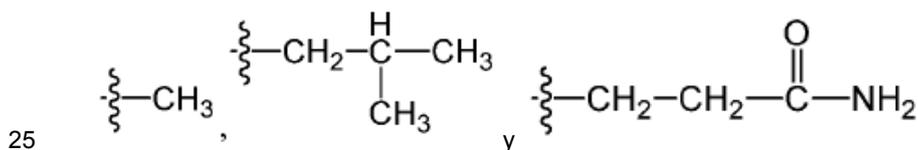
Sumario

Los fármacos relativamente hidrófobos (tales como determinados polipéptidos, proteínas terapéuticas y fármacos anticancerígenos hidrófobos) padecen a menudo una escasa biodisponibilidad. Se cree que este problema se debe al menos en parte a la escasa solubilidad de estos fármacos en sistemas acuosos. Determinados fármacos

degradables enzimáticamente también padecen escasa biodisponibilidad debido a que se degradan relativamente rápido en el sistema circulatorio, dando como resultado una rápida eliminación del cuerpo. Adicionalmente, no se ha optimizado la liberación controlada de paclitaxel a partir de un conjugado de polímero.

5 Los inventores han descubierto una serie de copolímeros de aminoácidos-poliglutamato novedosos que pueden conjugarse con fármacos, incluyendo fármacos anticancerígenos, así como un modo para proporcionar una liberación controlada de los fármacos a través de la incorporación de unidades de glutamina, leucina y/o alanina en los conjugados de polímero. En algunas realizaciones, los conjugados de polímero se acumulan preferentemente en determinados tejidos (por ejemplo, tejidos tumorales) y/o determinados receptores, y por tanto son útiles para administrar fármacos a partes específicas del cuerpo (por ejemplo, fármacos anticancerígenos a tumores). En algunas realizaciones, los conjugados de polímero forman nanopartículas que pueden solubilizar eficazmente el agente anticancerígeno en un sistema acuoso dispersándolo a nivel molecular, y aumentando de ese modo la funcionalidad y/o biodisponibilidad.

15 Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un conjugado de polímero que puede incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III), en las que: cada A^1 y A^2 pueden ser independientemente oxígeno o NR^5 , en el que R^5 puede ser hidrógeno o alquilo C_{1-4} ; y cada R^1 y R^2 puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-10} , un grupo arilo C_{6-20} , amonio, un metal alcalino y un compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno; siempre que al menos uno de R^1 y R^2 sea un compuesto que comprende un fármaco anticancerígeno; y cada R^3 y cada R^4 puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-10} , un grupo arilo C_{6-20} , amonio y un metal alcalino, y R^6 puede ser un grupo derivado de aminoácido. En algunas realizaciones, R^6 puede seleccionarse independientemente de:



Otras realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una composición farmacéutica que puede incluir uno o más conjugados de polímero descritos en el presente documento, y que pueden incluir además al menos uno seleccionado de un excipiente, un portador y un diluyente farmacéuticamente aceptables.

Estas y otras realizaciones se describen en mayor detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 ilustra un esquema de reacción para la preparación de copolímero de poli(L-glutamato)-poli(L- γ -glutamil-glutamina).

La figura 2 muestra un gráfico que ilustra la degradación de poli(ácido L-glutámico) (PGA) en presencia de enzima papaína a pH = 6,2 y 5,0.

La figura 3 muestra un gráfico que ilustra la degradación de varios copolímeros de poli(L-glutamato)-poli(L- γ -glutamil-glutamina) con y sin enzima papaína y PGA con enzima papaína.

La figura 4 ilustra un esquema de reacción para la preparación de conjugado de poli(L- γ -glutamil-glutamina)-paclitaxel (PTX).

La figura 5 ilustra un esquema de reacción para la preparación de conjugado de poli(L-glutamina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX.

50 La figura 6 ilustra un esquema de reacción para la preparación de conjugado de poli(L-leucina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX y un esquema de reacción para la preparación de conjugado de poli(L-alanina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX.

La figura 7 ilustra un esquema de reacción para la preparación de conjugado de poli(L-leucina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX y conjugado de poli(L-alanina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX.

La figura 8 muestra un gráfico que ilustra la liberación de paclitaxel de varios conjugados de poli(L-glutamina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX que tienen cantidades variables de unidades recurrentes de poli(L-glutamina) y el 20% en peso de PTX en plasma humano al 20%-solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37°C.

La figura 9 muestra un gráfico que ilustra la liberación de paclitaxel de varios conjugados de poli(L-glutamina)-poli(L-

γ -glutamil-glutamina)-PTX con pesos moleculares promedios en peso variables, el 20% en moles de unidades recurrentes de poli(L-glutamina) y el 20% en peso de PTX en plasma humano al 20% en PBS a 37°C.

5 La figura 10 muestra un gráfico que ilustra la liberación de paclitaxel a partir de varios conjugados de poli(L-leucina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX y conjugados de poli(L-alanina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX con cantidades variables de unidades recurrentes de poli(L-leucina) y poli(L-alanina), respectivamente, y el 20% en peso de PTX en plasma humano al 20% en PBS a 37°C.

10 La figura 11 muestra un gráfico que ilustra el porcentaje de cambio de volumen tumoral tras la inyección con un conjugado de poli(L-glutamina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX que tiene el 20% en peso de unidades recurrentes de poli(L-glutamina), el 20% en peso de PTX (dosificación de 355 mpk, 267 mpk o 200 mpk (mpk es miligramo/kg)) o el control de vehículo.

15 La figura 12 muestra un gráfico que ilustra el volumen tumoral a lo largo de varios días tras la administración de un conjugado de poli(L-glutamina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX que tiene el 20% en peso de unidades recurrentes de poli(L-glutamina), el 20% en peso de PTX (dosificación de 355 mpk, 267 mpk o 200 mpk (mpk es miligramo/kg)) o el control de vehículo.

20 Descripción detallada

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para un término en el presente documento, prevalecen aquellas especificadas en esta sección a menos que se establezca otra cosa.

25 El término “éster” se usa en el presente documento en su sentido habitual, y por tanto incluye un resto químico con fórmula $-(R)_n-COOR'$, en donde R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y compuesto heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), y en donde n es 0 o 1.

30 El término “amida” se usa en el presente documento en su sentido habitual, y por tanto incluye un resto químico con fórmula $-(R)_n-C(O)NHR'$ o $-(R)_n-NHC(O)R'$, en donde R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y compuesto heteroalíclico (unido a través de un carbono del anillo), y en donde n es 0 o 1. Una amida puede incluirse en una molécula de aminoácido o péptido unida a una molécula de fármaco tal como se describe en el presente documento, formando de ese modo un profármaco.

35 Cualquier cadena lateral de amina, hidroxilo o carboxilo en los compuestos divulgados en el presente documento puede esterificarse o amidarse. Los procedimientos y grupos específicos que van a usarse para lograr este fin los conocen los expertos en la técnica y pueden encontrarse fácilmente en fuentes de referencia tales como Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

40 Tal como se usa en el presente documento, “alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que comprende un grupo hidrocarburo completamente saturado (sin dobles o triples enlaces). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono (siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico tal como “de 1 a 20” se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, “de 1 a 20 átomos de carbono” significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre el caso del término “alquilo” en donde no se designa ningún intervalo numérico). El grupo alquilo puede ser también un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. El grupo alquilo podría ser también un alquilo inferior que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede designarse como “alquilo C₁-C₄” o designaciones similares. A modo de ejemplo solo, “alquilo C₁-C₄” indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no se limitan de ningún modo a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo y hexilo.

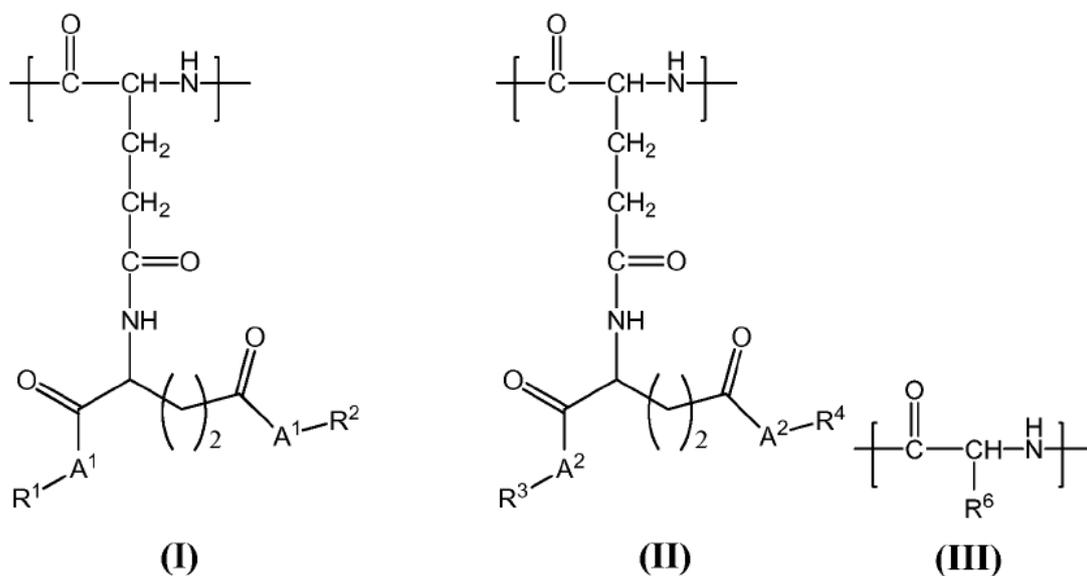
55 El grupo alquilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el/los grupo(s) sustituyente(s) es/son uno o más grupos seleccionados individual e independientemente de alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, aralquilo, heteroaralquilo, (heteroalíclico)alquilo, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, ariloxilo, acilo, éster, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halógeno, carbonilo, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxilo, C-carboxilo protegido, O-carboxilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, sililo, sulfenilo, sulfinito, sulfonilo, haloalquilo (por ejemplo, mono, di y tri-haloalquilo), haloalcoxilo (por ejemplo, mono, di y tri-haloalcoxilo), trihalometanosulfonilo, trihalometanosulfonamido y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituidos, y los derivados protegidos de los mismos. Siempre que se describa un sustituyente como “opcionalmente sustituido”, ese sustituyente puede estar sustituido con uno de los sustituyentes anteriores.

Tal como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos monocíclico o multicíclico carbocíclico (todo de carbono) que tiene un sistema de electrones pi completamente deslocalizados. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, benceno, naftaleno y azuleno. Un grupo arilo de esta invención puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, se reemplazan átomos de hidrógeno por grupo(s) sustituyente(s) que es/son uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, aralquilo, heteroaralquilo, (heteroalíclico)alquilo, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, ariloxilo, acilo, éster, mercapto, ciano, halógeno, tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxilo, C-carboxilo protegido, O-carboxilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, sililo, sulfenilo, sulfinilo, sulfonilo, haloalquilo, haloalcoxilo, trihalometanosulfonilo, trihalometanosulfonamido y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituídos, y los derivados protegidos de los mismos, a menos que se indiquen los grupos sustituyentes de otro modo.

El conjugado de polímero puede contener uno o más átomos de carbono quirales. El carbono quiral (que puede estar indicado por un asterisco *) puede tener la configuración *rectus* (a mano derecha) o la configuración *sinister* (a mano izquierda), y por tanto la unidad recurrente puede ser racémica, enantiomérica o estar enriquecida enantioméricamente. Los símbolos "n" y "*" (que designa un carbono quiral), tal como se usan en otra parte en el presente documento, tienen el mismo significado que se especificó anteriormente, a menos que se establezca otra cosa.

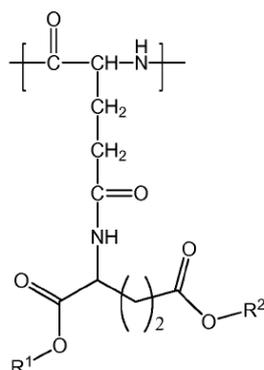
Se entiende que, en cualquier compuesto descrito en el presente documento que tiene uno o más centros quirales, si no se indica expresamente una estereoquímica absoluta, entonces cada centro puede ser independientemente de configuración R o configuración S o una mezcla de las mismas. Por tanto, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden ser enantioméricamente puros o ser mezclas estereoisoméricas. Además, se entiende que, en cualquier compuesto descrito en el presente documento que tiene uno o más dobles enlaces que generan isómeros geométricos que pueden definirse como E o Z, cada doble enlace puede ser independientemente E o Z o una mezcla de los mismos. Asimismo, también se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un conjugado de polímero que puede incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III):



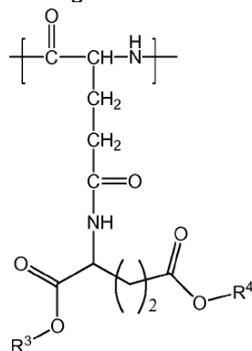
en las que: cada A^1 y A^2 puede ser independientemente oxígeno o NR^5 , en el que R^5 puede ser hidrógeno o alquilo C_{1-4} ; y cada R^1 y R^2 puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-10} , un grupo arilo C_{6-20} , amonio, un metal alcalino y un compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno; siempre que al menos uno de R^1 y R^2 sea un compuesto que comprende un fármaco anticancerígeno; y cada R^3 y cada R^4 puede seleccionarse independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-10} , un grupo arilo C_{6-20} , amonio y un metal alcalino, y R^6 puede ser un grupo derivado de aminoácido. En algunas realizaciones, R^6 puede seleccionarse

independientemente de: $\xi - \text{CH}_3$, $\xi - \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{CH}_3$, y $\xi - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH}_2$.

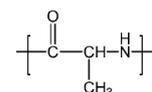


En algunas realizaciones, la fórmula (I) puede ser

y la fórmula (II) puede ser

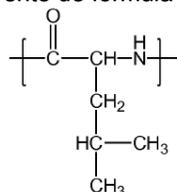


. En algunas realizaciones, la unidad recurrente de fórmula (III) puede ser

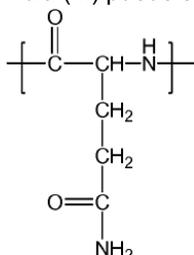


. En

otras realizaciones, la unidad recurrente de fórmula (III) puede ser



. En todavía otras realizaciones,



la unidad recurrente de fórmula (III) puede ser

. En algunas realizaciones, el otro de R¹ y R² puede

- 5 ser un metal alcalino, cada R³ y cada R⁴ puede ser un metal alcalino. Los ejemplos de metal alcalino adecuado incluyen litio (Li), sodio (Na), potasio (K), rubidio (Rb) y cesio (Cs). En algunas realizaciones, el metal alcalino puede ser sodio. Los expertos en la técnica comprenden que cuando A¹, A², A³ y A⁴ son oxígeno, el otro de R¹ y R² puede ser un metal alcalino, cada R³ y cada R⁴ puede ser un metal alcalino, y las fórmulas (I) y (II) pueden ser unidades de glutamato. En otras realizaciones, el otro de R¹ y R² puede ser hidrógeno, y cada R³ y cada R⁴ puede ser hidrógeno.
- 10 Los expertos en la técnica comprenden que cuando A¹, A², A³ y A⁴ son oxígeno, el otro de R¹ y R² puede ser hidrógeno, cada R³ y cada R⁴ puede ser hidrógeno, y las fórmulas (I) y (II) pueden ser unidades glutámicas.

La cantidad de un fármaco anticancerígeno presente en el conjugado de polímero puede variar a lo largo de un amplio intervalo. En algunas realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno en el intervalo del 1% al 50% (peso/peso) basándose en la razón en masa del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero. En otras realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno en el intervalo al 5% al 40% (peso/peso) basándose en la razón en masa del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero. En todavía otras realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno en el intervalo del 10% al 30% (peso/peso). En todavía aún otras realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno en el intervalo del 1% al 10% (peso/peso), del 1% al 5% (peso/peso), del 5% al 10% (peso/peso), del 10% al 20% (peso/peso), del 15% al 35% (peso/peso), del 30% al 40% (peso/peso), basándose en la razón en masa del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero. En algunas realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno del 20% (peso/peso) basándose en la razón en masa del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero. En otras realizaciones, el conjugado de polímero puede incluir una cantidad del fármaco anticancerígeno del 5% (peso/peso), el 10% (peso/peso), el 15%

(peso/peso), el 25% (peso/peso), el 30% (peso/peso) basándose en la razón en masa del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero.

5 Ahora se ha encontrado que la cantidad del fármaco anticancerígeno y las cantidades en porcentaje de las unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) pueden seleccionarse para controlar ventajosamente la solubilidad del conjugado de polímero resultante. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la cantidad del/de los agente(s) y las cantidades en porcentaje de las unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) se seleccionan de modo que el conjugado de polímero sea soluble (o insoluble) a un pH y/o intervalo de pH particular de interés. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero también se selecciona para controlar la solubilidad. Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran el control sobre la solubilidad (así como comportamiento de degradación) mediante la selección apropiada de la cantidad del fármaco anticancerígeno, las cantidades en porcentaje de las unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II), fórmula (III) y el peso molecular. Los expertos en la técnica, informados por la orientación proporcionada en el presente documento, pueden usar experimentación de rutina para identificar las cantidades adecuadas del fármaco anticancerígeno y las cantidades en porcentaje de las unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) que dan como resultado un conjugado de polímero con características de solubilidad deseadas. Tal control sobre la solubilidad puede ser ventajoso, dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, las realizaciones de los conjugados de polímero proporcionados en el presente documento pueden usarse para proporcionar una administración mejorada de fármacos anticancerígenos de otro modo escasamente solubles a tejidos seleccionados, preferiblemente reduciendo efectos secundarios no deseados, y/o pueden reducir la frecuencia con la que un sujeto necesita tomar el fármaco anticancerígeno.

25 La cantidad del fármaco anticancerígeno y las cantidades en porcentaje de las unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) se seleccionan preferiblemente para proporcionar una solubilidad del conjugado de polímero que es mayor que la de un conjugado de poli(ácido glutámico) comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del mismo fármaco anticancerígeno. En algunas realizaciones, la solubilidad del conjugado de polímero es mayor que la de un conjugado de poli(ácido glutámico) comparable. La solubilidad se mide formando una disolución de conjugado de polímero que comprende al menos 5 mg/ml del conjugado de polímero en NaCl acuoso al 0,9% en peso a aproximadamente 22°C, y determinando la claridad óptica. La claridad óptica puede determinarse de manera turbidimétrica, por ejemplo, mediante observación visual o mediante métodos instrumentales apropiados conocidos para los expertos en la técnica. La comparación de la solubilidad resultante con respecto a una disolución de conjugado de poli(ácido glutámico) formada de manera similar muestra solubilidad mejorada tal como se demuestra por una mayor claridad óptica a lo largo de un intervalo más amplio de valores de pH. Por tanto, la solubilidad del conjugado de polímero es mayor que la de un conjugado de poli(ácido glutámico) comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del fármaco anticancerígeno cuando una disolución de conjugado de polímero sometida a prueba, que comprende al menos 5 mg/ml del conjugado de polímero en NaCl acuoso al 0,9% en peso a aproximadamente 22°C, tiene mayor claridad óptica a lo largo de un intervalo de pH más amplio que una disolución de conjugado de poli(ácido glutámico) sometida a prueba comparable. Los expertos en la técnica entenderán que un conjugado de poli(ácido glutámico) "comparable" es un material de control en el que la porción polimérica del conjugado tiene un peso molecular que es aproximadamente el mismo que el del conjugado de polímero objeto (que comprende una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III)) con la que se compara.

45 Los conjugados de polímero que incluyen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) son copolímeros. En algunas realizaciones, un conjugado de polímero descrito en el presente documento puede incluir dos o más unidades recurrentes diferentes de fórmula (I), dos o más unidades recurrentes diferentes de fórmula (II) y/o dos o más unidades recurrentes diferentes de fórmula (III). Además, en algunas realizaciones, los conjugados de polímero que pueden incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) pueden incluir otras unidades recurrentes que no son de fórmula (I), ni de fórmula (II) y/o ni de fórmula (III). En otras realizaciones, los polímeros pueden consistir solamente en unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III).

55 El compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno puede conjugarse con el polímero de muchas maneras diferentes. En algunas realizaciones, el compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno puede unirse directamente al polímero. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede unirse directamente al polímero a través de un átomo de oxígeno, de azufre, de nitrógeno y/o de carbono del fármaco anticancerígeno. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede unirse directamente a una unidad recurrente de fórmula (I). En otras realizaciones, el compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno puede incluir además un grupo conector. Un grupo conector es un grupo que une el fármaco anticancerígeno (o el compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno) a la unidad recurrente. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede unirse a una unidad recurrente de fórmula (I) a través de un grupo conector. El grupo conector puede ser relativamente pequeño. Por ejemplo, el grupo conector puede comprender una amina, una amida, un éter, un éster, un grupo hidroxilo, un grupo carbonilo o un grupo tiol. Alternativamente, el grupo conector puede ser relativamente grande. Por ejemplo, el grupo conector puede comprender un grupo alquilo, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo aril(alquilo C₁₋₆), un grupo heteroarilo, o un grupo heteroaril(alquilo C₁₋₆). En algunas realizaciones, el conector puede ser -NH(CH₂)₁₋₄-NH-. En algunas realizaciones, el conector puede ser -(CH₂)₁₋₄-aril-NH-. El grupo conector puede

unirse al fármaco anticancerígeno en cualquier posición adecuada. Por ejemplo, el grupo conector puede unirse en lugar de un hidrógeno en un carbono del fármaco anticancerígeno. El grupo conector puede añadirse al fármaco anticancerígeno usando métodos conocidos para los expertos en la técnica.

5 En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede seleccionarse de un taxano, *Camptotheca* y antraciclina. Cuando el agente comprende un taxano, el taxano puede ser paclitaxel. En otras realizaciones, el taxano puede ser docetaxel. Cuando el fármaco anticancerígeno es paclitaxel, el paclitaxel puede conjugarse con la unidad recurrente de fórmula (I) en el átomo de oxígeno mediante el carbono C2' del paclitaxel. Alternativamente o además, el paclitaxel puede conjugarse con la unidad recurrente de fórmula (I) en el átomo de oxígeno mediante el carbono C7 del paclitaxel. Cuando el fármaco anticancerígeno es una *Camptotheca*, la *Camptotheca* puede ser camptotecina. En algunas realizaciones, cuando el fármaco anticancerígeno es antraciclina, la antraciclina puede ser doxorubicina.

15 El número total de unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) puede variar. En algunas realizaciones, el número total de unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) puede estar en el intervalo de desde 50 hasta 5000. En otras realizaciones, el número total de unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) puede estar en el intervalo de desde 100 hasta 2000. En todavía otras realizaciones, el número total de unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III) puede estar en el intervalo de desde 150 hasta 15 000, desde 50 hasta 2000, desde 300 hasta 6000.

20 Asimismo, el porcentaje de unidades recurrentes de cada una de las fórmulas (I), (II) y (III) individualmente en el conjugado de polímero puede variar a lo largo de un amplio intervalo. Las tablas 1 y 2 proporcionan algunas realizaciones de un conjugado de polímero que puede incluir unidades recurrentes de fórmula (I), unidades recurrentes de fórmula (II) y unidades recurrentes de fórmula (III). Por ejemplo, tal como se proporciona mediante la entrada 1, primera columna en la tabla 1, en algunas realizaciones, un conjugado de polímero puede incluir del 1% en moles al 60% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) basándose en los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III). Como otro ejemplo, tal como se proporciona mediante la entrada 9, primera columna en la tabla 1, en algunas realizaciones, un conjugado de polímero puede incluir al menos el 10% en moles de la unidad recurrente de fórmula (I) basándose en los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III). Como ejemplo adicional, tal como se proporciona en la entrada 1, tercera columna en la tabla 2, en algunas realizaciones, un conjugado de polímero puede incluir del 5% en peso al 50% en peso de la unidad recurrente de fórmula (III) basándose en el peso total de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III). La base para las realizaciones en la tabla 1 son los moles totales de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III) en el conjugado de polímero. La base para las realizaciones en la tabla 2 es el peso total de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III) en el conjugado de polímero.

Tabla 1

% en moles de fórmula (I)	% en moles de fórmula (II)	% en moles de fórmula (III)
del 1% al 60%	del 1% al 70%	del 1% al 70%
del 1% al 10%	del 1% al 10%	del 1% al 20%
del 1% al 20%	del 1% al 20%	del 1% al 30%
del 1% al 30%	del 1% al 30%	del 1% al 50%
del 5% al 50%	del 1% al 50%	del 10% al 70%
del 10% al 30%	del 20% al 70%	del 10% al 20%
del 30% al 40%	del 40% al 60%	del 30% al 40%
del 20% al 70%	del 50% al 60%	del 50% al 60%
al menos el 10%	al menos el 20%	al menos el 10%
al menos el 25%	al menos el 40%	al menos el 30%
no más del 40%	no más del 70%	no más del 65%
no más del 30%	no más del 60%	no más del 45%

40 Tabla 2

% en peso de fórmula (I)	% en peso de fórmula (II)	% en peso de fórmula (III)
del 1% al 60%	del 1% al 90%	del 1% al 60%
del 5% al 50%	del 5% al 80%	del 5% al 50%
del 7% al 40%	del 10% al 70%	del 10% al 30%
del 10% al 30%	del 20% al 60%	al menos el 10%
al menos el 10%	del 30% al 50%	al menos el 20%
al menos el 25%	al menos el 25%	al menos el 30%
al menos el 30%	al menos el 45%	al menos el 40%
no más del 60%	no más del 70%	no más del 65%
no más del 50%	no más del 60%	no más del 50%

En algunas realizaciones, la cantidad del agente, el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (I), el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (II), y el porcentaje de la unidad recurrente de fórmula (III) en el conjugado de polímero se seleccionan para proporcionar una solubilidad del conjugado de polímero que es mayor que la de un conjugado de poli(ácido glutámico) comparable que comprende sustancialmente la misma cantidad del agente. El intervalo de valores de pH a lo largo del cual el conjugado de polímero, que comprende unidades recurrentes de fórmula (I), fórmula (II) y fórmula (III), tiene mayor solubilidad que un conjugado de poli(ácido glutámico) comparable puede ser estrecho o amplio. Tal como se indicó anteriormente, la solubilidad se mide formando una disolución de conjugado de polímero que comprende al menos 5 mg/ml del conjugado de polímero en NaCl acuoso al 0,9% en peso a 22°C, y determinando la claridad óptica. En algunas realizaciones, el conjugado de polímero puede ser soluble a lo largo de un intervalo de pH de al menos tres unidades de pH. En otras realizaciones, el conjugado de polímero puede ser soluble a lo largo de un intervalo de pH de al menos 8 unidades de pH. En todavía otras realizaciones, el conjugado de polímero puede ser soluble a lo largo de un intervalo de pH de al menos 9 unidades de pH. En todavía aún otras realizaciones, el intervalo de pH a lo largo del cual el conjugado de polímero puede ser soluble incluye al menos un valor de pH en el intervalo de 2 a 5, por ejemplo, a pH = 2, pH = 3, pH = 4 y/o pH = 5. Preferiblemente, el intervalo de pH a lo largo del cual el conjugado de polímero es soluble es más amplio que el intervalo de pH a lo largo del cual el conjugado de poli(ácido glutámico) comparable es soluble. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjugado de polímero puede ser soluble a lo largo de un intervalo de pH que es al menos una unidad de pH más amplio, preferiblemente al menos dos unidades de pH más amplio, que el intervalo de pH a lo largo del cual el conjugado de poli(ácido glutámico) comparable es soluble.

La cantidad de conjugado de polímero colocado en la disolución para medir la solubilidad también puede variar considerablemente. En algunas realizaciones, la solubilidad puede medirse cuando la disolución de conjugado de polímero sometido a prueba comprende al menos 5 mg/ml del conjugado de polímero. En otras realizaciones, la solubilidad puede medirse cuando la disolución de conjugado de polímero sometido a prueba comprende al menos 10 mg/ml del conjugado de polímero. En todavía otras realizaciones, la solubilidad puede medirse cuando la disolución de conjugado de polímero sometido a prueba comprende al menos 25 mg/ml del conjugado de polímero. En todavía aún otras realizaciones, la solubilidad puede medirse cuando la disolución de conjugado de polímero sometido a prueba comprende al menos 100 mg/ml del conjugado de polímero. En algunas realizaciones, la solubilidad puede medirse cuando la disolución de conjugado de polímero sometido a prueba comprende al menos 150 mg/ml del conjugado de polímero. Los expertos en la técnica entenderán que el conjugado de poli(ácido glutámico) comparable se somete a prueba a la misma concentración que la del conjugado de polímero sometido a prueba.

Al variar las cantidades de unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III), las propiedades del conjugado de polímero pueden ajustarse. Por ejemplo, al variar la cantidad de una unidad recurrente de fórmula (III), la degradación del polímero y/o la tasa de liberación del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno pueden ajustarse. Asimismo, variar una unidad recurrente de fórmula (III) también puede ajustar una o más propiedades del conjugado de polímero. En algunas realizaciones, aumentar el número de unidades recurrentes de fórmula (III) en un conjugado de polímero que incluye unidades recurrentes de las fórmulas (I), (II) y (III) puede proporcionar una tasa aumentada de liberación del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno. Una base de comparación puede ser un conjugado de poli(L- γ -glutamil-glutamina) comparable que no incluye unidades recurrentes de fórmula (III) (por ejemplo, peso molecular sustancialmente idéntico, porcentaje del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno).

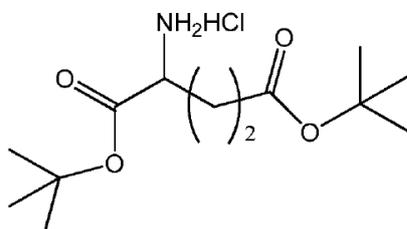
El peso molecular promedio en peso de los conjugados de polímero que incluyen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) puede variar. En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede estar en el intervalo de 20 kDa a 300 kDa. En otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede estar en el intervalo de 30 kDa a 150 kDa. En todavía otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede estar en el intervalo de 35 kDa a 85 kDa. En todavía aún otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede estar en el intervalo de 50 kDa a 65 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede estar en el intervalo de 45 kDa a 70 kDa, de 35 kDa a 100 kDa, de 50 kDa a 85 kDa, de 50 kDa a 60 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede ser de al menos 40 kDa. En otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede ser de al menos 50 kDa. En otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede ser de al menos 60 kDa. En todavía otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede ser de menos de 80 kDa. En todavía aún otras realizaciones, el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede ser de menos de 70 kDa. En algunas realizaciones, variar el peso molecular puede modificar la tasa de liberación del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno. En algunas realizaciones, aumentar el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede aumentar la tasa de liberación del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno. En otras realizaciones, aumentar el peso molecular promedio en peso del conjugado de polímero puede disminuir la tasa de liberación del compuesto que puede incluir un fármaco anticancerígeno.

Los polímeros descritos en el presente documento pueden formarse para dar nanopartículas en disolución acuosa. Los conjugados que incluyen un polímero descrito en el presente documento y un fármaco anticancerígeno pueden

formarse para dar nanopartículas de manera similar. Tales nanopartículas pueden usarse para administrar preferentemente un fármaco a un tejido seleccionado.

Los polímeros que pueden incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) pueden prepararse de diversas maneras. En algunas realizaciones, una unidad recurrente de fórmula (I) y una unidad recurrente de fórmula (II) pueden producirse partiendo de poli(ácido glutámico) y un aminoácido, tal como ácido glutámico. Alternativamente, en otras realizaciones, el polímero puede crearse convirtiendo en primer lugar el material de poli(ácido glutámico) de partida en su forma de sal. La forma de sal de poli(ácido glutámico) puede obtenerse haciendo reaccionar poli(ácido glutámico) con una base adecuada, por ejemplo, bicarbonato de sodio. Puede unirse un resto aminoácido o su forma de sal (por ejemplo, ácido glutámico o glutamato) al grupo ácido carboxílico colgante del poli(ácido glutámico). El peso molecular promedio en peso del poli(ácido glutámico) puede variar a lo largo de un amplio intervalo, pero es preferiblemente de desde 10 000 hasta 200 000 Dalton, y más preferiblemente de desde 25 000 hasta 100 000 Dalton.

En algunas realizaciones, el aminoácido, tal como ácido glutámico, puede protegerse mediante un grupo protector antes de la unión al poli(ácido glutámico) o poliglutamato. Un ejemplo de un resto aminoácido protegido adecuado para esta reacción es clorhidrato de diéster t-butílico de ácido L-glutámico, mostrado a continuación:



La reacción del poli(ácido glutámico) o poliglutamato con el aminoácido puede tener lugar en presencia de cualquier disolvente adecuado. En algunas realizaciones, el disolvente puede ser un disolvente aprótico, por ejemplo, N,N'-dimetilformamida. En algunas realizaciones, puede usarse un agente de acoplamiento tal como EDC, DCC, CDI, DSC, HATU, HBTU, HCTU, PyBOP®, PyBroP®, TBTU y BOP. En otras realizaciones, la reacción puede tener lugar en presencia de un catalizador (por ejemplo, DMAP).

La conjugación de un compuesto que incluye un fármaco anticancerígeno con un polímero tal como se describe en el presente documento puede llevarse a cabo de diversas maneras. Un método para conjugar el compuesto que incluye un fármaco anticancerígeno para formar una unidad recurrente de fórmula (I) es mediante el uso de calor (por ejemplo, calor de usar un método de microondas). Alternativamente, la conjugación puede tener lugar a temperatura ambiente. Pueden usarse disolventes, agentes de acoplamiento, catalizadores y/o tampones apropiados tal como conocen generalmente los expertos en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento para formar el conjugado de polímero. Como con el poli(ácido glutámico), pueden usarse tanto la forma de sal como de ácido del polímero obtenido de poli(ácido glutámico) y/o sal y un aminoácido como material de partida para formar el conjugado de polímero. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede ser un taxano, una *Camptotheca* y/o una antraciclina. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno puede ser un taxano tal como paclitaxel o docetaxel. En otras realizaciones, el fármaco anticancerígeno conjugado con el polímero puede ser una *Camptotheca*, tal como camptotecina. En todavía otras realizaciones, el fármaco anticancerígeno conjugado con el polímero puede ser una antraciclina, tal como doxorubicina. En algunas realizaciones, el fármaco anticancerígeno conjugado con el polímero puede ser paclitaxel, incluyendo paclitaxel conjugado con el polímero mediante su átomo C2' de oxígeno y/o mediante su átomo C7 de oxígeno. En algunas realizaciones, el paclitaxel puede acoplarse con el polímero solo mediante el átomo C2' de oxígeno. En otras realizaciones, el paclitaxel puede acoplarse con el polímero solo mediante el átomo C7 de oxígeno. En todavía otras realizaciones, el polímero puede incluir tanto grupos de paclitaxel conjugados con C2' como grupos de paclitaxel conjugados con C7.

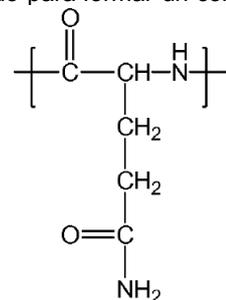
En algunas realizaciones, el compuesto que incluye un fármaco anticancerígeno puede acoplarse usando un agente de acoplamiento (por ejemplo, EDC y/o DCC) y/o un catalizador (por ejemplo, DMAP) en un disolvente (por ejemplo, un disolvente aprótico tal como DMF). Pueden usarse agentes adicionales, tales como piridina o hidroxibenzotriazol. En algunas realizaciones, la reacción puede tener lugar a lo largo del periodo de 0,5-2 días. Pueden usarse métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para aislar y/o purificar el conjugado de polímero. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede verse en una disolución ácida para formar un precipitado. Cualquier precipitado que se forma puede entonces filtrarse y lavarse con agua. Opcionalmente, el precipitado puede purificarse mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, el precipitado puede transferirse a acetona y disolverse, y la disolución resultante puede filtrarse de nuevo en una disolución de bicarbonato de sodio. Si se desea, la disolución de reacción resultante puede dializarse en agua usando una membrana de celulosa y el polímero puede liofilizarse y aislarse. El contenido del compuesto que incluye un fármaco anticancerígeno (tal como paclitaxel) en el polímero resultante puede determinarse mediante espectrometría UV.

Alternativamente, el compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno puede hacerse reaccionar con un aminoácido, tal como ácido glutámico o glutamato, para formar un segundo compuesto en el que el compuesto que incluye el fármaco anticancerígeno se une covalentemente al aminoácido. Entonces, el compuesto de aminoácido-agente puede hacerse reaccionar con poli(ácido glutámico) o su sal para formar una unidad recurrente de fórmula (I). En algunas realizaciones, el paclitaxel puede hacerse reaccionar con ácido glutámico para formar un compuesto en el que el paclitaxel se une covalentemente al grupo ácido carboxílico colgante del ácido glutámico. Entonces, el compuesto de ácido glutámico-paclitaxel puede hacerse reaccionar con poli(ácido glutámico) o su sal para formar una unidad recurrente de fórmula (I). Si se desea, el paclitaxel acoplado al aminoácido a través del oxígeno C2' puede separarse del paclitaxel acoplado al aminoácido a través del oxígeno C7 usando métodos de separación conocidos (por ejemplo, HPLC).

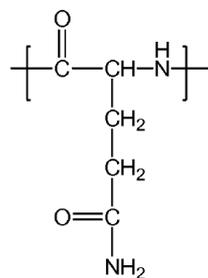
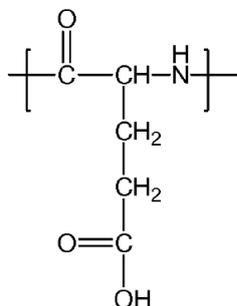
Tras la formación del conjugado de polímero, también puede medirse cualquier cantidad libre de fármaco anticancerígeno no unido covalentemente al polímero. Por ejemplo, puede usarse cromatografía en capa fina (CCF) para confirmar la ausencia sustancial de paclitaxel libre que permanece en las composiciones de polímeros conjugados con paclitaxel.

Si los átomos de oxígeno del aminoácido están protegidos, los grupos protectores pueden retirarse usando métodos conocidos tales como usando un ácido adecuado (por ejemplo, ácido trifluoroacético). Si se desea, la forma de sal del polímero obtenido de hacer reaccionar poli(ácido glutámico) con el aminoácido puede formarse tratando la forma de ácido del polímero con una disolución de base adecuada, por ejemplo, disolución de bicarbonato de sodio. El polímero puede recuperarse y/o purificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el disolvente puede retirarse mediante métodos adecuados, por ejemplo, evaporación rotatoria. Adicionalmente, la mezcla de reacción puede filtrarse en una disolución acuosa ácida para inducir precipitación. El precipitado resultante puede entonces filtrarse y lavarse con agua. Se expone información adicional respecto a la preparación de unidades recurrentes de las fórmulas (I) y (II) en la publicación de patente estadounidense n.º 2007-0128118, presentada el 1 de diciembre de 2006, y particularmente con el propósito de describir la síntesis de los polímeros descritos en la misma.

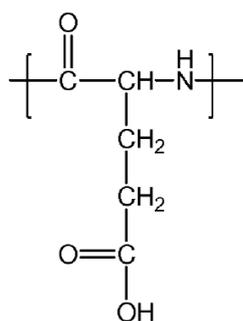
Puede utilizarse una variedad de métodos para incluir una o más unidades recurrentes de fórmula (III) en la estructura principal del polímero. En algunas realizaciones, puede incorporarse una unidad recurrente de fórmula (III) antes de la adición de un compuesto que incluye un agente anticancerígeno. Un método para formar un conjugado



de polímero que incluye una unidad recurrente de fórmula (III) que tiene la estructura es tal como sigue. Puede hacerse reaccionar poli(ácido glutámico) o su forma de sal con un aminoácido, tal como ácido glutámico, en una cantidad que es de menos de 1,0 equivalentes del aminoácido a base de poli(ácido glutámico) o su forma de sal. El polímero resultante que contiene tanto unidades recurrentes de fórmula (III) como



puede entonces transformarse en usando métodos y reactivos conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico colgante de



5 puede hacerse reaccionar con un agente de acoplamiento, tal como 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y hacerse reaccionar adicionalmente con NH₃ en dioxano. Entonces, puede formarse una unidad recurrente de fórmula (I) a partir de un polímero que contiene una o más unidades recurrentes de fórmula (II) y una o más unidades recurrentes de fórmula (III) usando uno o más métodos descritos en el presente documento.

5 En otras realizaciones, una unidad recurrente de fórmula (III) puede incorporarse antes de la adición de un compuesto que incluye un agente anticancerígeno.

10 El procedimiento para incorporar leucina y alanina en poli(ácido glutámico) para convertirse en copolímeros se ha descrito en la patente estadounidense n.º 3.350.365. N-Carboxi- α -anhídrido (NCA) de L-leucina o NCA de L-alanina y NCA de éster 5-bencílico de ácido L-glutámico pueden copolimerizarse para formar poli(L-leucina)-poli(éster 5-bencílico de ácido L-glutámico) y poli(L-alanina)-poli(éster 5-bencílico de ácido L-glutámico). El grupo protector de éster 5-bencílico puede retirarse en HBr/ácido acético; por tanto, poli(L-leucina)-poli(éster 5-bencílico de ácido L-glutámico) y poli(L-alanina)-poli(éster 5-bencílico de ácido L-glutámico) se convierten en poli(L-leucina)-poli(ácido L-glutámico) y poli(L-alanina)-poli(ácido L-glutámico), respectivamente. El conjugado de poli(L-leucina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX puede formarse acoplando otro ácido glutámico sobre poli(L-leucina)-poli(ácido L-glutámico) y tras la conjugación de paclitaxel. De manera similar, el conjugado de poli(L-alanina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX puede sintetizarse usando el mismo procedimiento de síntesis de conjugado de poli(L-leucina)-poli(L- γ -glutamil-glutamina)-PTX. Se expone información adicional respecto a la preparación de la conjugación de paclitaxel en la publicación de patente estadounidense n.º 2007-0128118, presentada el 1 de diciembre de 2006, y particularmente con el propósito de describir la síntesis de los conjugados de poliaminoácido-paclitaxel descritos en la misma.

20

Composiciones farmacéuticas

25 Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una composición que puede incluir uno o más conjugados de polímero descritos en el presente documento y al menos uno seleccionado de un excipiente, un portador y un diluyente farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, se proporcionan profármacos, metabolitos, estereoisómeros, hidratos, solvatos, polimorfos y sales farmacéuticamente aceptables de un conjugado de polímero divulgado en el presente documento.

30 Un "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el fármaco original *in vivo*.

35 El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un conjugado de polímero descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como diluyentes o portadores. La composición farmacéutica facilita la administración de un conjugado de polímero a un organismo. Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, administración oral, mediante inyección, mediante aerosol, parenteral y tópica. También pueden obtenerse composiciones farmacéuticas haciendo reaccionar compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico.

40 El término "portador" se refiere a un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto en células o tejidos. Por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) es un portador comúnmente usado, ya que facilita la captación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo.

45 El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos diluidos en agua que disolverán el compuesto de interés (por ejemplo, un conjugado de polímero descrito en el presente documento) así como estabilizarán la forma biológicamente activa del compuesto. En la técnica se utilizan sales disueltas en disoluciones tamponadas como diluyentes. Una disolución tamponada comúnmente usada es solución salina tamponada con fosfato porque imita las condiciones de sal de la sangre humana. Puesto que las sales tampón pueden controlar el pH de una disolución a bajas concentraciones, un diluyente tamponado rara vez modifica la actividad biológica de un compuesto. El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un portador o diluyente que no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto.

50

55 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que no provoca una irritación significativa a un organismo al que se le administra y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto. En algunas realizaciones, la sal es una sal de adición de ácido del compuesto. Pueden obtenerse sales

farmacéuticas haciendo reaccionar un compuesto con ácidos inorgánicos tales como ácido hidrácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico. También pueden obtenerse sales farmacéuticas haciendo reaccionar un compuesto con un ácido orgánico tal como ácidos carboxílicos o sulfónicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico o naftalenosulfónico. También pueden obtenerse sales farmacéuticas haciendo reaccionar un compuesto con una base para formar una sal tal como una sal de amonio, una sal de metal alcalino, tal como una sal de sodio o de potasio, una sal de metal alcalinotérreo, tal como una sal de calcio o de magnesio, una sal de bases orgánicas tales como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, alquilamina C₁-C₇, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina.

Si la fabricación de formulaciones farmacéuticas implica mezclado íntimo de los excipientes farmacéuticos y el principio activo en su forma de sal, entonces puede ser deseable usar excipientes farmacéuticos que no sean básicos, es decir, o bien excipientes ácidos o bien neutros.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir uno o más agentes tensioactivos, portadores, diluyentes, excipientes, agentes de suavizado, agentes de suspensión, sustancias formadoras de película y agentes de ayuda al recubrimiento fisiológicamente aceptables, o una combinación de los mismos; y un compuesto (por ejemplo, un conjugado de polímero descrito en el presente documento) divulgado en el presente documento. En la técnica farmacéutica se conocen bien portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, colorantes, edulcorantes, perfumes, agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Por ejemplo, pueden añadirse benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico como conservantes. Además, pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión. En diversas realizaciones, pueden usarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados como agentes tensioactivos; pueden usarse sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, aluminato de metasilicato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrogenofosfato de calcio, carboximetilcelulosa de calcio como excipientes; pueden usarse estearato de magnesio, talco, aceite endurecido como agentes de suavizado; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja como agentes de suspensión o lubricantes; puede usarse acetato-ftalato de celulosa como derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar, o copolímero de metilacetato-metacrilato como derivado de polivinilo como agentes de suspensión; y pueden usarse plastificantes tales como ésteres ftalatos como agentes de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente humano *per se*, o en composiciones farmacéuticas en las que se mezclan con otros principios activos, como en terapia de combinación, o portadores, diluyentes, excipientes o combinaciones de los mismos. La formulación adecuada es dependiente de la vía de administración elegida. Los expertos en la técnica conocen técnicas para la formulación y administración de los compuestos descritos en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden fabricarse de una manera que es conocida por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, producción de grageas, granulado en húmedo, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o preparación de comprimidos. Adicionalmente, los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr su propósito previsto. Muchos de los compuestos usados en las combinaciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden proporcionarse como sales con contraiones farmacéuticamente compatibles.

En la técnica existen múltiples técnicas de administración de un compuesto incluyendo, pero sin limitarse a, administración oral, rectal, tópica, mediante aerosol, mediante inyección y parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales e intraoculares.

En diversas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y los conjugados de polímero divulgados en el presente documento pueden estar en forma de un líquido inyectable.

Pueden prepararse productos inyectables en formas convencionales, o bien como suspensiones o bien como disoluciones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cisteína. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes de humectación, agentes de tamponamiento del pH. Los tampones fisiológicamente compatibles incluyen, pero no se limitan a, disolución de Hanks, disolución de Ringer o tampón de solución salina fisiológico. Si se desea, pueden usarse preparaciones que potencian la absorción (por ejemplo, liposomas).

Para administración transmucosa, pueden usarse agentes penetrantes apropiados para la barrera que va a permearse en la formulación.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua, incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos (por ejemplo, un polímero divulgado en el presente documento) en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, pomelo o almendras, o ésteres de ácido grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

También puede administrarse el compuesto de una manera más bien local que sistémica, por ejemplo, mediante inyección del compuesto directamente en la zona infectada, a menudo en una formulación de depósito o liberación sostenida. Además, puede administrarse el compuesto en un sistema de administración de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas serán dirigidos a y los tomará selectivamente el órgano.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para administración humana o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos para fármacos con receta, o el prospecto aprobado. Las composiciones que pueden incluir un compuesto descrito en el presente documento formulado en un portador farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Métodos de administración

Algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un conjugado de polímero o a la composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o mejora de una enfermedad o estado que puede incluir administrar una cantidad eficaz de uno o más de los conjugados de polímero descritos en el presente documento (por ejemplo, un conjugado de polímero que puede incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III)) o una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento a un sujeto que lo necesita. Otras realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un conjugado de polímero descrito en el presente documento para su uso en un método para administrar un fármaco anticancerígeno a un tejido seleccionado. En algunas realizaciones, los conjugados de polímero que pueden incluir una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) son para su uso en un método para tratar o mejorar una enfermedad o estado, tal como cáncer. En otras realizaciones, un conjugado de polímero descrito en el presente documento puede usarse para formar un medicamento para su uso en un método para tratar o mejorar una enfermedad o estado, por ejemplo, cáncer. En todavía otras realizaciones, un conjugado de polímero descrito en el presente documento es para su uso en un método para tratar o mejorar una enfermedad o estado, incluyendo cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad o estado puede ser un cáncer tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata y melanoma. En algunas realizaciones, la enfermedad o estado puede ser un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor de pulmón, tumor de mama, tumor de colon, tumor de ovario, tumor de próstata y tumor de melanoma. En algunas realizaciones, un conjugado de polímero descrito en el presente documento puede administrarse por vía intravenosa.

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. "Animal" incluye vertebrados e invertebrados de sangre fría y caliente tales como peces, moluscos, reptiles y, en particular, mamíferos. "Mamífero" incluye, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, primates, tales como monos, chimpancés y simios, y, en particular, humanos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "terapéutico" o "terapia" no significan necesariamente la cura o supresión total de la enfermedad o estado. Cualquier alivio de cualquier signo o síntoma no deseado de una enfermedad o estado, en cualquier grado puede considerarse tratamiento y/o terapia. Además,

el tratamiento puede incluir acciones que pueden empeorar la sensación de bienestar global del paciente o su aspecto.

El término "cantidad eficaz" se usa para indicar una cantidad de un compuesto activo, o agente farmacéutico, que provoca la respuesta biológica o médica indicada. Por ejemplo, una cantidad eficaz de compuesto puede ser la cantidad necesaria para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose. Esta respuesta puede producirse en un tejido, sistema, animal o humano e incluye el alivio de los signos o síntomas de la enfermedad que está tratándose. La determinación de una cantidad eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, en vista de la divulgación proporcionada en el presente documento. La cantidad eficaz de los compuestos divulgados en el presente documento requerida como dosis dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluyendo humano, que está tratándose, y las características físicas del animal específico en consideración. La dosis puede adaptarse para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores que los expertos en las técnicas médicas reconocerán.

Tal como será fácilmente evidente para un experto en la técnica, la dosificación útil *in vivo* que va a administrarse y el modo particular de administración variarán dependiendo de la edad, el peso, la gravedad de la afección y las especies de mamífero tratadas, los compuestos particulares empleados y el uso específico para el cual estos compuestos se emplean. La determinación de niveles de dosificación eficaces, es decir, los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, puede lograrlos un experto en la técnica usando métodos de rutina, por ejemplo, ensayos clínicos con humanos y estudios *in vitro*.

La dosificación puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Alternativamente, pueden basarse y calcularse las dosificaciones según el área de superficie del paciente, tal como entienden los expertos en la técnica. Aunque la dosificación exacta se determinará para cada fármaco específico, en la mayoría de los casos pueden hacerse algunas generalizaciones respecto a la dosificación. El régimen de dosificación diario para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis oral de entre 0,01 mg y 3000 mg de cada principio activo, preferiblemente entre 1 mg y 700 mg, por ejemplo de 5 a 200 mg. La dosificación puede ser individual o una serie de dosis o más administradas en el transcurso de uno o más días, según lo necesite el sujeto. En algunas realizaciones, los compuestos se administrarán durante un periodo de terapia continua, por ejemplo durante una semana o más, o durante meses o años.

En casos en los que se han establecido dosificaciones en humanos para compuestos para al menos algún estado, pueden usarse esas mismas dosificaciones, o dosificaciones que están entre el 0,1% y el 500%, más preferiblemente entre el 25% y el 250% de la dosificación en humanos establecida. Cuando no se establece dosificación en humanos, como será el caso para composición farmacéuticas recién descubiertas, puede deducirse una dosificación en humanos adecuada a partir de los valores de DE_{50} o DI_{50} , u otros valores adecuados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, tal como se califica mediante estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

En casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, las dosificaciones pueden calcularse como la base libre. Tal como entenderán los expertos en la técnica, en determinadas situaciones puede ser necesario administrar los compuestos divulgados en el presente documento en cantidades que superan, o incluso superan con creces, el intervalo de dosificación preferido establecido anteriormente con el fin de tratar de manera eficaz y agresiva enfermedades o infecciones particularmente agresivas.

El intervalo y la cantidad de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores, o la concentración eficaz mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y la vía de administración. Sin embargo, pueden usarse bioensayos o ensayos de HPLC para determinar las concentraciones plasmáticas. Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor de MEC. Las composiciones deben administrarse usando un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre el 30-90% y lo más preferiblemente entre el 50-90%. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

Debe indicarse que el médico encargado sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o disfunciones orgánicas. A la inversa, el médico encargado sabría también cómo ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no fuera adecuada (descartando toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en la gestión del trastorno de interés variará con la gravedad del estado que va a tratarse y con la vía de administración. La gravedad del estado puede evaluarse, por ejemplo, en parte, mediante métodos de evaluación de pronóstico convencionales. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. Puede usarse un programa comparable al comentado anteriormente en medicina veterinaria.

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden evaluarse para determinar su eficacia y toxicidad

usando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un subconjunto de los compuestos, que comparten determinados restos químicos, puede establecerse determinando la toxicidad *in vitro* hacia una línea celular, tal como una línea celular de mamífero, y preferiblemente de humano. Los resultados de tales estudios son a menudo predictivos de la toxicidad en animales, tales como mamíferos, o más específicamente, humanos. Alternativamente, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo animal, tal como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse usando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse usando varios métodos reconocidos, tales como métodos *in vitro*, modelos animales o ensayos clínicos con humanos. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el experto en la técnica puede guiarse por el estado de la técnica para elegir un modelo, dosis, vía de administración y/o régimen apropiados.

Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos con los propósitos de describir adicionalmente las realizaciones descritas en el presente documento, y no limitan el alcance de las reivindicaciones.

Materiales:

Se adquirieron sales de sodio de poli-L-glutamato con diferentes pesos moleculares (pesos moleculares promedio de 41 400 (PGA(97k)), 17 600 (PGA(44k)), 16 000 (PGA(32k)) y 10 900 (PGA(21k)) Dalton basándose en dispersión de la luz de múltiples ángulos (MALS)); 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC); clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC); hidroxibenzotriazol (HOBt); piridina; 4-dimetilaminopiridina (DMAP); N,N'-dimetilformamida (DMF); acetato de gadolinio; cloroformo; y bicarbonato de sodio de Sigma-Aldrich Chemical Company. Se convirtió poli-L-glutamato en poli(ácido L-glutámico) usando disolución de ácido clorhídrico 2 N. Se adquirió ácido trifluoroacético (TFA) de Bioscience. Se adquirieron clorhidrato de éster β -t-butilico y α -t-butilico del ácido L-aspártico (H-Asp(OtBu)-OtBu HCl), clorhidrato de diéster t-butilico del ácido L-glutámico (H-Glu(OtBu)-OtBu HCl), éster α -bencilico del ácido N- α -CBZ-L-glutámico (Z-Glu-OBzl) de Novabiochem (La Jolla, CA). Se adquirió paclitaxel de PoliMed (Houston, Texas). Todos los demás productos químicos y reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint Louis, MO).

Se obtuvo ^1H -RMN de Joel (400 MHz) y se midieron los tamaños de partícula mediante ZetalPals (Brookhaven Instruments Corporation). Se llevó a cabo química de microondas en Biotage. Se determinaron los pesos moleculares de polímeros mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) combinada con un detector de dispersión de la luz de múltiples ángulos (MALS) (Wyatt Corporation):

Condiciones de análisis de SEC-MALS:

- Sistema de HPLC: Agilent 1200
- Columna: Shodex SB 806M HQ (el límite de exclusión para el pululano es de 20 000 000, tamaño de partícula: 13 micrómetros, tamaño (mm) DI x longitud; 8,0 x 300)
- Fase móvil: 1 x DPBS o 1% de LiBr en DPBS (pH 7,0)
- Velocidad de flujo: 1 ml/min
- Detector de MALS: DAWN HELEOS de Wyatt
- Detector de DRI: Optilab rEX de Wyatt
- Viscosímetro en línea: ViscoStar de Wyatt
- Software: ASTRA 5.1.9 de Wyatt
- Concentración de muestra: 1-2 mg/ml
- Volumen de inyección: 100 μl

Valor dn/dc de polímero: se usó 0,185 en la medición.

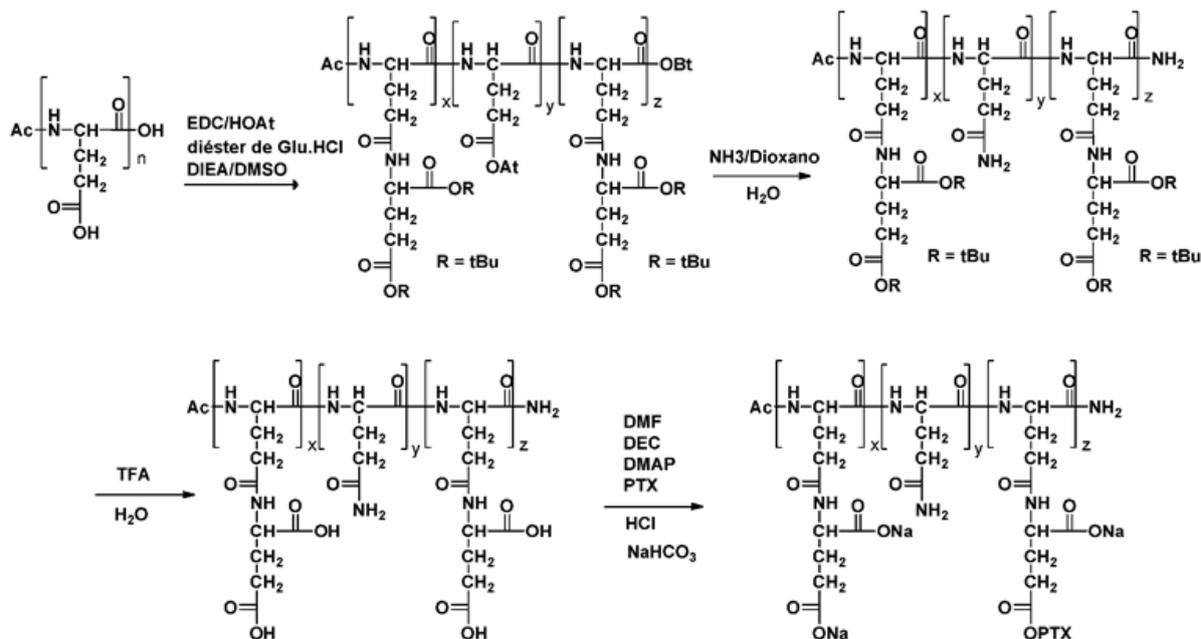
Se usó BSA como control antes de ejecutarse las muestras reales.

Usando el sistema y las condiciones descritas anteriormente (a continuación en el presente documento, denominado sistema Heleos con detector de MALS), se encontró experimentalmente que el peso molecular promedio de los polímeros de partida (pesos moleculares promedio de sales de sodio de poli-L-glutamato de 41 400, 17 600, 16 000 y 10 900 Dalton notificados por Sigma-Aldrich usando su sistema con MALS) era de 49 000, 19 800, 19 450 y 9 400 Dalton, respectivamente.

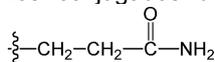
Se estimó el contenido de paclitaxel en conjugados de polímero-paclitaxel mediante espectrometría UV/Vis (Lambda Bio 40, PerkinElmer) basándose en una curva patrón generada con concentraciones conocidas de paclitaxel en metanol ($\lambda = 228$ nm).

5

Ejemplo 1



10 Los conjugados de polímero que incluyen una unidad recurrente de fórmula (III) que tienen la estructura



(Q) pueden prepararse según el esquema general mostrado en el ejemplo 1.

Ejemplo 2

15 Éster de PGGA parcial-10% de Q

A PGA-OH (200 mg), EDC (446 mg, 2,33 mmol) y HOAt (317 mg, 2,33 mmol) pesados en un vial secado en horno (40 ml) con una barra magnética se les añadieron 15 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 2 horas. Se añadieron diéster de Glu.HCl (413 mg, 1,40 mmol) y DIEA (243 μ l, 1,40 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 2 h. Se añadió NH_3 /dioxano (6,2 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche (16 horas) a temperatura ambiental. Se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl ac. 0.2 N para precipitar el polímero. Se lavó el precipitado con agua (2x) y se aisló el polímero con centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante. Rendimiento del 83,3% (446,8 mg), GPC (PM: 69,55 kDa).

25

Ejemplo 3

PGGA parcial-10% de Q-Na

30 Al éster obtenido del ejemplo 2 (446,8 mg) en un vial (40 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO_3 ac. 0,3 N (20 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-cPGGA-10% de Q-ácido, 25,9 mg, PM: 51,78 kDa, y forma de sal-PGGA-10% de Q-Na, 34,1 mg, PM: 72,34 kDa).

35

Ejemplo 4

40 Éster de PGGA parcial-20% de Q

5 A PGA-OH (200 mg), EDC (446 mg, 2,33 mmol) y HOAt (317 mg, 2,33 mmol) pesados en un vial secado en horno (40 ml) con una barra magnética se les añadieron 20 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadieron diéster de Glu.HCl (367 mg, 1,24 mmol) y DIEA (216 μ l, 1,24 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 3 h. Se añadió NH_3 /dioxano (10 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla durante la noche (16 horas) a temperatura ambiental. Se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el precipitado con agua (2x). Se aisló el polímero con centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante. Rendimiento del 74% (421 mg).

10 Ejemplo 5

PGGA parcial-20% de Q-Na

15 Al éster obtenido del ejemplo 4 (421 mg) en un vial (40 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 50 ml agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO_3 ac. 0,3 N (20 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-cPGGA-20% de Q-ácido, 228,1 mg, PM: 50,91 kDa, y forma de sal-PGGA-20% de Q-Na, 68,2 mg, PM: 56,55 kDa).

Ejemplo 6

Éster de PGGA parcial-30% de Q

25 A PGA-OH (200 mg), EDC (446 mg, 2,33 mmol) y HOAt (317 mg, 2,33 mmol) pesados en un vial secado en horno (40 ml) con una barra magnética se les añadieron 20 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadieron diéster de Glu.HCl (321 mg, 1,09 mmol) y DIEA (189 μ l, 1,09 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 3 h. Se añadió NH_3 /dioxano (10 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche (16 horas) a temperatura ambiental. Se vertió la disolución lentamente en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x) y se aisló con centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante. Rendimiento del 75% (391,6 mg).

35 Ejemplo 7

PGGA parcial-30% de Q-Na

40 Al éster obtenido del ejemplo 6 (392 mg) en un vial (40 ml) con barra de agitación magnética, se le añadió TFA (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO_3 ac. 0,3 N (20 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-cPGGA-30% de Q-ácido, 221,7 mg, PM: 46,08 kDa, y forma de sal-PGGA-30% de Q-Na, 37,7 mg, PM: 75,43 kDa).

Ejemplo 8

Éster de PGGA parcial-40% de Q

50 A PGA-OH (200 mg), EDC (446 mg, 2,33 mmol) y HOAt (317 mg, 2,33 mmol) pesados en un vial secado en horno (40 ml) con una barra magnética se les añadieron 20 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadieron diéster de Glu.HCl (275 mg, 0,93 mmol) y DIEA (162 μ l, 0,93 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 3 h. Se añadió NH_3 /dioxano (10 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla durante la noche (16 horas) a temperatura ambiental. Se vertió la disolución lentamente en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x) y se aisló con centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante. Rendimiento del 77,3% (367 mg).

60 Ejemplo 9

PGGA parcial-40% de Q-Na

65 Al éster obtenido del ejemplo 8 (367 mg) en un vial (40 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (10 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24

horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (20 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-cPGGA-40% de Q-ácido, 204 mg, PM: 43,1 kDa, y forma de sal-PGGA-40% de Q-Na, 62,6 mg, PM: 63,87 kDa).

5

Ejemplo 10

Éster de PGGA parcial-50% de Q

10 A PGA-OH (200 mg), EDC (446 mg, 2,33 mmol) y HOAt (317 mg, 2,33 mmol) pesados en un vial secado en horno (40 ml) con una barra magnética se les añadieron 20 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadieron diéster de Glu.HCl (229 mg, 0,78 mmol) y DIEA (135 µl, 0,78 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 3 h. Se añadió NH₃/dioxano (10 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche (16 horas) a temperatura ambiental. Se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x) y se aisló con centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante. Rendimiento del 80% (343 mg).

15

Ejemplo 11

PGGA parcial-50% de Q-Na

20 Al éster obtenido del ejemplo 10 (343 mg) en un vial (40 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (10 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (20 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-cPGGA-50% de Q-ácido, 195,1 mg, PM: 43,23 kDa, y forma de sal-PGGA-50% de Q-Na, 59,3 mg, PM: 48,13 kDa).

25

30

Ejemplo 12

Éster de PGGA parcial-20% de Q

35 A PGA-OH (1,9 g), EDC (4,2 g, 22,0 mmol) y HOAt (3,0 g, 22,0 mmol) pesados en un matraz secado en horno (250 ml) con una barra magnética se les añadieron 100 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 40 min. Se añadieron diéster de Glu.HCl (3,5 g, 1 1,82 mmol) y DIEA (2,05 ml, 11,82 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 h). Se añadió NH₃/dioxano (90 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla durante 7 horas a temperatura ambiental. Se vertió la disolución lentamente en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x) y se aisló mediante centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante (4,54 g, 96%, PM: 53,48 kDa).

40

Ejemplo 13

PGGA parcial-20% de Q-ácido

45 Al éster obtenido del ejemplo 12 (4,54 g) en un matraz (100 ml) con barra de agitación magnética, se le añadió TFA (40 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 500 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (50 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-PGGA-20% de Q-ácido, 1,63 g, PM: 38,59 kDa, y forma de sal-PGGA-20% de Q-Na, 1,268 g, PM: 56,74 kDa).

50

55

Ejemplo 14

PGGA parcial-20% de Q-20% en peso de PTX

60 A PGGA parcial-20% de Q (200 mg) pesado en un vial de 40 ml secado en horno se le añadieron 10 ml de DMSO anhidro. Se burbujeó la disolución con N₂ seco durante 5 min. Entonces se añadieron DMAP (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla. Se agitó la mezcla a un ajuste de 1500 rpm hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió PTX (50 mg, 0,059 mmol) en una porción y se agitó la disolución resultante a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó la reacción mediante CCF. Tras la finalización de la reacción, se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero (78,8 mg, PM:

65

47,63 kDa). Se le añadió a una porción de la forma de ácido una disolución de NaHCO₃ acuosa 1 N para ajustar el pH a ~8. Se dializó la mezcla (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero (178 mg). Se filtró la mezcla usando un filtro de membrana de 0,20 µm. Se congelaron las muestras y se liofilizaron hasta un peso constante.

5

Ejemplo 15Éster de PGGa parcial-20% de Q

10 A PGA-OH (10 g), EDC (22,3 g, 116,5 mmol) y HOAt (15,85 g, 116,5 mmol) pesados en un matraz secado en horno (2000 ml) con una barra magnética se les añadieron 750 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 60 min. Se añadieron diéster de Glu.HCl (18,3 g, 62,0 mmol) y DIEA (10,8 ml, 62,0 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 3 horas. Se añadió NH₃/dioxano (500 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiental. Se vertió la disolución lentamente en una disolución de HCl ac. 0,2 N (volumen de 5x, con 100 g de NaCl) para precipitar el polímero. Se filtró la mezcla y se lavó con agua (3x). Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante (21 g, 75%, PM: 53,36 kDa).

15

Ejemplo 16

20

PGGA parcial-30% de Q-ácido

Al éster obtenido del ejemplo 15 (21 g) en un matraz (1000 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (500 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 1000 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (50 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-PGGA-30% de Q-ácido, 15 g con rendimiento del 83%, PM: 42,65 kDa, y forma de sal-PGGA-30% de Q-Na, 300 mg, PM: 66,20 kDa).

25

30

Ejemplo 17PGGA parcial-30% de Q-20% en peso de PTX

35

A PGGA parcial-20% de Q (200 mg) pesado en un vial de 40 ml secado en horno se le añadieron 10 ml de DMSO anhidro. Se burbujeó la disolución con N₂ seco durante 5 min. Entonces se añadieron DMAP (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla a un ajuste de 1500 rpm hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió PTX (50 mg, 0,059 mmol) en una porción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó la reacción mediante CCF. Tras la finalización de la reacción, se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero (97,5 mg, PM: 61,32 kDa). Se le añadió a una porción de la forma de ácido una disolución de NaHCO₃ acuosa 1 N para ajustar el pH a ~8. Se dializó la mezcla (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero (164 mg). Se filtró la mezcla mediante un filtro de membrana de 0,20 µm. Se congelaron las muestras y se liofilizaron hasta un peso constante.

40

45

Ejemplo 18Éster de PGGa parcial-40% de Q

A PGA-OH (1,9 g), EDC (4,2 g, 22,0 mmol) y HOAt (3,0 g, 22,0 mmol) pesados en un matraz secado en horno (250 ml) con una barra magnética se les añadieron 100 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 40 min. Se añadieron diéster de Glu.HCl (2,63 g, 8,9 mmol) y DIEA (1,54 ml, 8,9 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se añadió NH₃/dioxano (95 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla durante 7 horas a temperatura ambiental. Se vertió la disolución lentamente en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x) y se aisló mediante centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante (4,0 g, 99%, PM: 60,41 kDa).

55

Ejemplo 19PGGA parcial-40% de Q-ácido

Al éster obtenido del ejemplo 18 (4,0 g) en un matraz (100 ml) con barra de agitación magnética, se le añadió TFA (40 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 500 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24

65

horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (50 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-PGGA-40% de Q-ácido, 1,63 g, PM: 38,39 kDa, y forma de sal-PGGA-40% de Q-Na, 1,452 g, PM: 42,52 kDa).

5

Ejemplo 20

PGGA parcial-40% de Q-20% en peso de PTX

10 A PGGA parcial-20% de Q (200 mg) pesado en un vial de 40 ml secado en horno, se le añadieron 10 ml de DMSO anhidro. Se burbujeó la mezcla con N₂ seco durante 5 min. Entonces se añadieron DMAP (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla a un ajuste de 1500 rpm hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió PTX (50 mg, 0,059 mmol) en una porción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó la reacción mediante CCF. Tras la finalización de la reacción, se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero (97,5 mg, PM: 61,32 kDa). Se le añadió a una porción de la forma de ácido una disolución de NaHCO₃ acuosa 1 N para ajustar el pH a ~8. Se dializó la mezcla (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero (164 mg). Se filtró la disolución mediante un filtro de membrana de 0,20 µm. Se congelaron las muestras y se liofilizaron hasta un peso constante.

15

20

Ejemplo 21

Éster de PGGA parcial-50% de Q

25

30

A PGA-OH (1,9 g), EDC (4,2 g, 22,0 mmol) y HOAt (3,0 g, 22,0 mmol) pesados en un matraz secado en horno (250 ml) con una barra magnética se les añadieron 100 ml de DMSO anhidro. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 40 min. Se añadieron diéster de Glu.HCl (2,63 g, 8,9 mmol) y DIEA (1,54 ml, 8,9 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se añadió NH₃/dioxano (95 ml, 0,5 M) y se agitó la mezcla durante 7 horas a temperatura ambiental. Se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl ac. 0,2 N para precipitar el polímero. Se lavó el polímero con agua (2x), y se aisló mediante centrifugación. Se congeló el polímero resultante y se liofilizó hasta un peso constante (3,41 g, 93%, PM: 74,93 kDa).

35

Ejemplo 22

PGGA parcial-50% de Q-ácido

40 Al éster obtenido del ejemplo 21 (4,0 g) en un matraz (100 ml) con barra de agitación magnética se le añadió TFA (40 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadieron 500 ml de agua y se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero. Se retiró una porción de la forma de ácido y se disolvió en NaHCO₃ ac. 0,3 N (50 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal. Se congelaron las dos muestras y se liofilizaron hasta pesos constantes (forma de ácido-PGGA-50% de Q-ácido, 2,13 g, PM: 40,08 kDa, y forma de sal-PGGA-50% de Q-Na, 0,502 g, PM: 39,56 kDa).

45

Ejemplo 23

PGGA parcial-50% de Q-20% en peso de PTX

50

55

60

A PGGA parcial-20% de Q (200 mg), pesado en un vial de 40 ml secado en horno se le añadieron 10 ml de DMSO anhidro. Se burbujeó la mezcla con N₂ seco durante 5 min. Entonces se añadieron DMAP (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla a un ajuste de 1500 rpm hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió PTX (50 mg, 0,059 mmol) en una porción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó la reacción mediante CCF. Tras la finalización de la reacción, se vertió lentamente la mezcla en una disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de ácido del polímero (163,2 mg, PM: 55,49 kDa). Se le añadió a una porción de la forma de ácido una disolución de NaHCO₃ acuosa 1 N para ajustar el pH a ~8. Se dializó la mezcla (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas) para dar la forma de sal del polímero (150 mg). Se filtró la mezcla mediante una membrana de 0,20 µm. Se congelaron las muestras y se liofilizaron hasta un peso constante.

Ejemplo 24

Estudios de degradación enzimática de polímeros

65

Se disolvieron por separado sal de sodio de poli(ácido L-glutámico) (PGA) y enzima papaína en un tampón acetato de sodio (NaOAc 20 mM, EDTA 2 mM y DTT 5 mM, pH 5,0) a una concentración de 4 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente. Se añadió una disolución de la enzima papaína (0,2 ml) en el tampón acetato a una disolución del PGA (2 ml) en el tampón acetato. Se añadió adicionalmente el tampón acetato (1,8 ml) a la mezcla de la disolución de enzima-polímero. Se agitó la mezcla de reacción a 25°C. Se envió un duplicado de 100 µl de la mezcla de reacción para análisis molecular en un periodo de tiempo deseado. Se usó cromatografía de permeación en gel (GPC) con detector de dispersión de la luz para analizar el peso molecular de PGA a partir de la reacción de degradación enzimática de polímeros y los resultados se muestran en la figura 2.

Se disolvieron por separado sal de sodio de poli(ácido L-glutámico) (PGA) y enzima papaína en un tampón acetato de sodio (NaOAc 20 mM, EDTA 2 mM y DTT 5 mM, pH 6,0) a una concentración de 4 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente. Se añadió una disolución de la enzima papaína (0,2 ml) en el tampón acetato a una disolución del PGA (2 ml) en el tampón acetato. Se añadió adicionalmente el tampón acetato (1,8 ml) a la mezcla de la disolución de enzima-polímero. Se agitó la mezcla de reacción a 25°C. Se envió un duplicado de 100 µl de la mezcla de reacción para análisis molecular en un periodo de tiempo deseado. Se usó cromatografía de permeación en gel (GPC) con detector de dispersión de la luz para analizar el peso molecular de PGA a partir de la reacción de degradación enzimática de polímeros y los resultados se muestran en la figura 2.

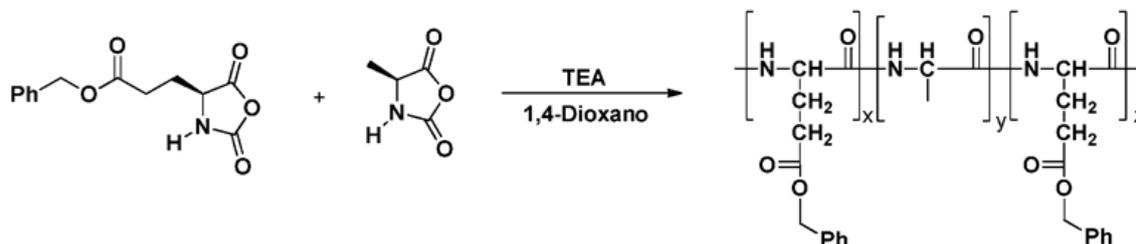
Se disolvieron por separado sal de sodio de poli(ácido L-glutámico) (PGA), copolímeros de poli(L-glutamato)-poli(L-γ-glutamil-glutamina) y enzima papaína en un tampón acetato de sodio (NaOAc 20 mM, EDTA 2 mM y DTT 5 mM, pH 5,0) a una concentración de 4 mg/ml, 4 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente. Se añadió por separado una disolución de la enzima papaína (0,2 ml) en el tampón acetato a una disolución del PGA (2 ml) y los copolímeros (2 ml cada uno) en el tampón acetato. Se añadió adicionalmente el tampón acetato (1,8 ml) a cada una de las mezclas de la disolución de enzima-polímero. Se agitó cada mezcla de reacción a 25°C. Se envió un duplicado de 100 µl de la mezcla de reacción para análisis molecular en un periodo de tiempo deseado. Se usó cromatografía de permeación en gel (GPC) con detector de dispersión de la luz para analizar el peso molecular de PGA a partir de la reacción de degradación enzimática de polímeros y los resultados se muestran en la figura 3.

Los resultados en la figura 3 ilustran el efecto de variar la cantidad de unidades recurrentes de poli(L-glutamato)-poli(L-γ-glutamil-glutamina) en copolímeros también contienen unidades recurrentes de sal de sodio de poli(ácido L-glutámico), en condiciones de degradación enzimática. Tal como se muestra en los datos ilustrados en la figura 3, las cantidades relativas de poli(L-glutamato)-poli(L-γ-glutamil-glutamina) en los copolímeros están correlacionadas generalmente con una degradación más lenta del copolímero, en comparación con PGA que no incorpora poli(L-glutamato)-poli(L-γ-glutamil-glutamina) en estas condiciones.

En la figura 7 se muestra un esquema de síntesis para preparar PGGA-y% de alanina (A) o leucina (L)-35% de PTX.

Ejemplo 25

Éster BN de PGA parcial-20% de alanina

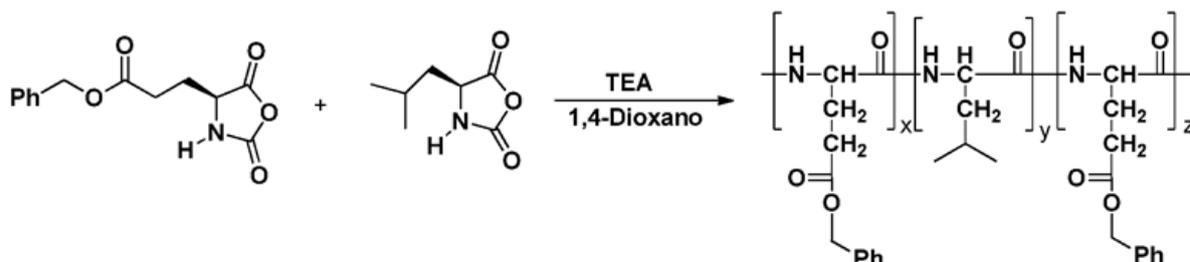


Se purgó un matraz de fondo redondo de 500 ml secado en horno (110°C durante la noche) equipado con una barra de agitación con argón seco durante 5 min. Se selló el matraz con un septum y se vertió 1,4-dioxano anhidro (200 ml) directamente en el matraz mediante un embudo. Se añadieron anhídrido de γ-bencil-N-carboxil-L-glutamato (NCA-éster bencílico, 10 g) y NCA-alanina (1,09 g). Tras purgarse con argón seco, se agitó la mezcla a 700 rpm hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se burbujeó nitrógeno anhidro a través de la disolución durante 10 min para retirar cualquier oxígeno disuelto. Se añadió una disolución de trietilamina (TEA) (0,132 ml) con 1,4-dioxano (1,0 mol) con agitación vigorosa (700 rpm). Tras agitar durante una hora a temperatura ambiente, se dejó en reposo la mezcla de reacción a temperatura ambiente sin alteración a lo largo de 24 horas para proporcionar una disolución transparente, incolora, viscosa. Entonces se vertió lentamente esta disolución viscosa en un vaso de precipitados de 1 l equipado con una barra de agitación y se añadió etanol de calidad analítica (500 ml) con agitación (700 rpm). Tras agitar durante 20 min a temperatura ambiente, se aisló el polímero fibroso mediante filtración a través de un embudo Buchner de cerámica de 3 pulgadas, usando un papel de filtro de piel de tiburón de 8-12 µm medio. Se lavó

el producto con etanol de calidad analítica (3 x 600 ml). Entonces se rompió el polímero húmedo en pequeños pedazos y se secó al aire a temperatura ambiente durante una hora. Se secó adicionalmente el material a alto vacío durante la noche para dar 7,97 g de un sólido fibroso blanco como producto final (PM: 16,82 kDa).

5 Ejemplo 26

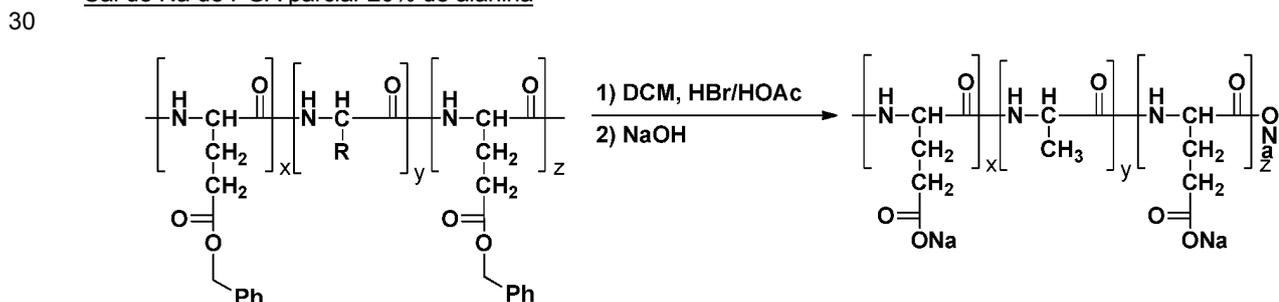
Éster BN de PGA parcial-10% de leucina



10 Se purgó un matraz de fondo redondo de 500 ml secado en horno (110°C durante la noche) equipado con una barra de agitación con argón seco durante 5 min. Se selló el matraz con un septum y se vertió 1,4-dioxano anhidro (200 ml) directamente en el matraz mediante un embudo. Se añadieron anhídrido de γ -bencil-N-carboxil-L-glutamato (NCA-éster bencílico, 10 g) y NCA-leucina (0,663 g). Tras purgarse con argón seco, se agitó la mezcla a 700 rpm hasta que todo el sólido se disolvió. Se burbujó nitrógeno anhidro a través de la disolución durante 10 min para retirar cualquier oxígeno disuelto. Se añadió una disolución de TEA (0,118 ml) con 1,4-dioxano (1,0 ml) con agitación vigorosa (700 rpm). Tras agitarse durante una hora a temperatura ambiente, se dejó en reposo la mezcla de reacción a temperatura ambiente sin alteración a lo largo de 24 horas para proporcionar una disolución transparente, incolora, viscosa. Se vertió lentamente la disolución viscosa en un vaso de precipitados de 1 l equipado con una barra de agitación y se añadió etanol de calidad analítica (500 ml) con agitación (700 rpm). Tras agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se aisló el polímero fibroso mediante filtración a través de un embudo Buchner de cerámica de 3 pulgadas, usando un papel de filtro de piel de tiburón de 8-12 cm medio. Se lavó el producto con etanol de calidad analítica (3 x 600 ml). Entonces se rompió el polímero húmedo en pequeños pedazos y se secó al aire a temperatura ambiente durante una hora. Se secó adicionalmente el material a alto vacío durante la noche para dar 8,35 g de un sólido fibroso blanco como producto final (PM: 81,53 kDa).

Ejemplo 27

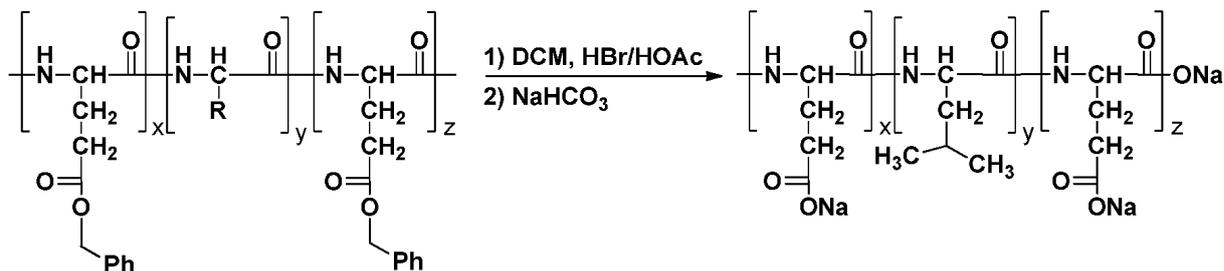
Sal de Na de PGA parcial-20% de alanina



35 Se añadió copolímero parcial (200 g) en un vial de vidrio de 50 ml. Se añadió DCM anhídrido (40 ml) con agitación. Entonces se sonicó la disolución de mezcla durante 30 min. Se añadió disolución de HBr al 33% en ácido acético (1,0 ml) a la disolución en una porción. Se agitó la mezcla (700 rpm) a temperatura ambiente durante la noche. Se vertió la disolución de la mezcla en hexano (100 ml, enfriada previamente en un congelador a -20°C) a -20°C. Precipitó un sólido blanco. Se detuvo la agitación tras 10 min y se permitió que los sólidos sedimentaran durante 5 min a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente mediante decantación, y se lavó el sólido húmedo con acetona (2 X 40 ml). Tras decantar el sobrenadante, se añadió agua MilliQ (40 ml) y se ajustó el pH con NaOH 1 N (ac.) a pH = 10. Se disolvió completamente el sólido tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se dializó la disolución usando tubos de 1 kDa. Durante las cuatro primeras horas de diálisis, se reemplazó el agua desionizada una vez cada hora y se usó agua MilliQ para el último reemplazo. Entonces se filtró la disolución dializada y se liofilizó hasta un peso constante.

45 Ejemplo 28

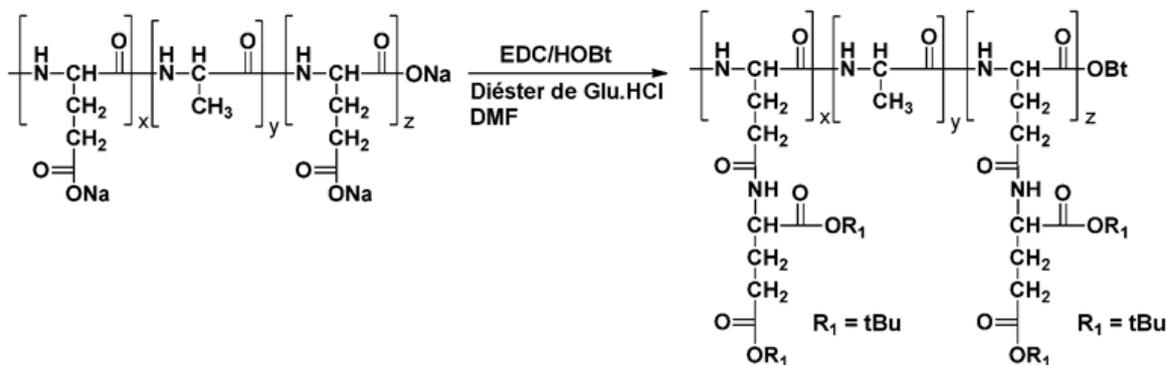
Sal de Na de PGA parcial-10% de leucina



5 En un matraz de fondo redondo de 1000 ml secado en horno equipado con una barra de agitación magnética se
añadió éster de copolímero de PGA parcial-10% de leucina (6 g) y DCM anhídrido (500 ml). Se agitó la mezcla a
temperatura ambiente hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió HBr al 33% en ácido acético (25 ml) y se agitó
la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Entonces se vertió la mezcla en hexano (1000 ml, enfiada
previamente en un congelador a -20°C) a -20°C. Precipitó un sólido blanco. Se detuvo la agitación tras 10 min y se
10 permitió que el sólido sedimentara durante 5 min a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente mediante
decantación, y se lavó el sólido húmedo con acetona (2 X 400 ml). Tras decantar el sobrenadante, se añadió
disolución de NaHCO₃ 0,3 N (400 ml) y se continuó la agitación hasta que se disolvió el sólido completamente.
Entonces se dializó la disolución usando tubos de 1 kDa. Durante las cuatro primeras horas de diálisis, se reemplazó
el agua desionizada una vez cada hora y se usó agua MilliQ para el último reemplazo. Entonces se filtró la disolución
15 dializada y se liofilizó hasta un peso constante (3,93 g, PM: 20,84 kDa).

Ejemplo 29

Éster de PGGA parcial-20% de alanina

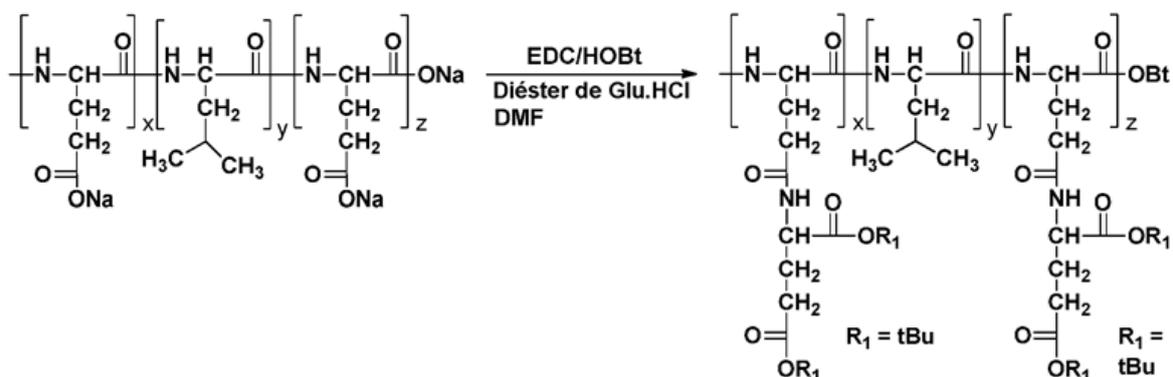


20 Se pesaron PGA parcial-20% de alanina-Na (2 g), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (7,62 g,
39,75 mmol) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (2,44 g, 15,90 mmol) en un matraz de fondo redondo de 250 ml secado en
horno con una barra de agitación magnética. Se añadió dimetilformamida (DMF) anhídrido (100 ml). Se agitó la mezcla
a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadió diéster de Glu.HCl (7,84 g, 26,49 mmol) y se agitó la mezcla a
temperatura ambiental durante 24 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Se vertió la mezcla de reacción
25 lentamente en agua destilada (200 ml) con agitación. Se formó un precipitado blanco. Se aisló el precipitado
mediante filtración y se lavó el residuo con agua desionizada (5 X 100 ml). Se secó el precipitado blanco y se liofilizó
durante más de 24 horas. Se secó adicionalmente el sólido blanco mediante P₂O₅ a alto vacío durante la noche para
30 proporcionar el producto final (4,10 g, PM: 31,67 kDa).

Ejemplo 30

Éster de PGGA parcial-10% de leucina

35

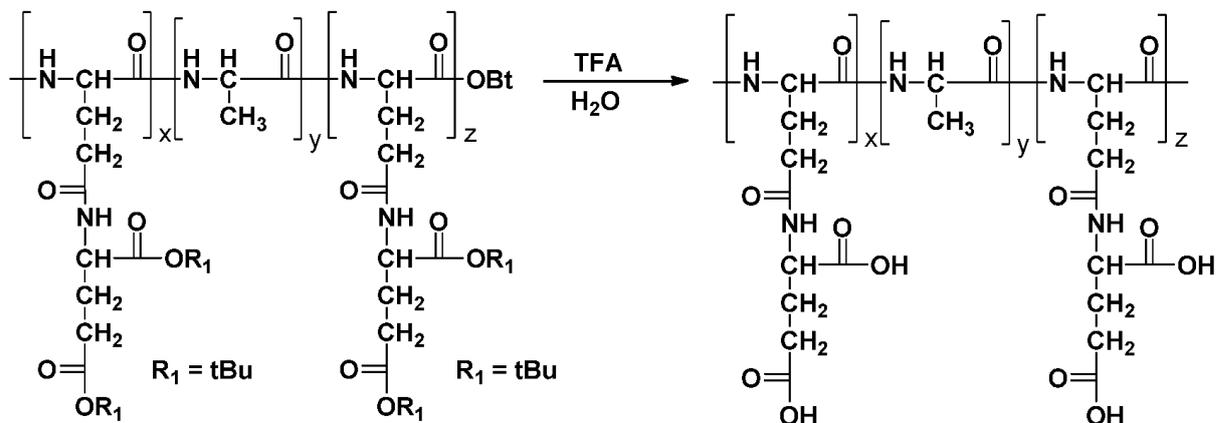


5 Se pesaron PGA parcial- 20% de leucina-Na (2,0 g), EDC (7,62 g, 39,75 mmol) y HOBt (2,44 g, 15,90 mmol) en un matraz de fondo redondo de 250 ml secado en horno con una barra de agitación magnética. Se añadió DMF anhidro (100 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 0,5 horas. Se añadió diéster de Glu.HCl (7,84 g, 26,49 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 24 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Se vertió la disolución de reacción lentamente en agua destilada (200 ml) con agitación. Se formó un precipitado blanco. Se aisló el precipitado mediante filtración y se lavó el residuo con agua desionizada (5 x 100 ml). Se secó el precipitado blanco y se liofilizó a lo largo de 24 horas. Se secó adicionalmente el sólido blanco mediante P_2O_5 a alto vacío durante la noche para proporcionar el producto final (4,4 g, PM: 66,64 kDa).

Ejemplo 31

PGGA-20% de alanina

15

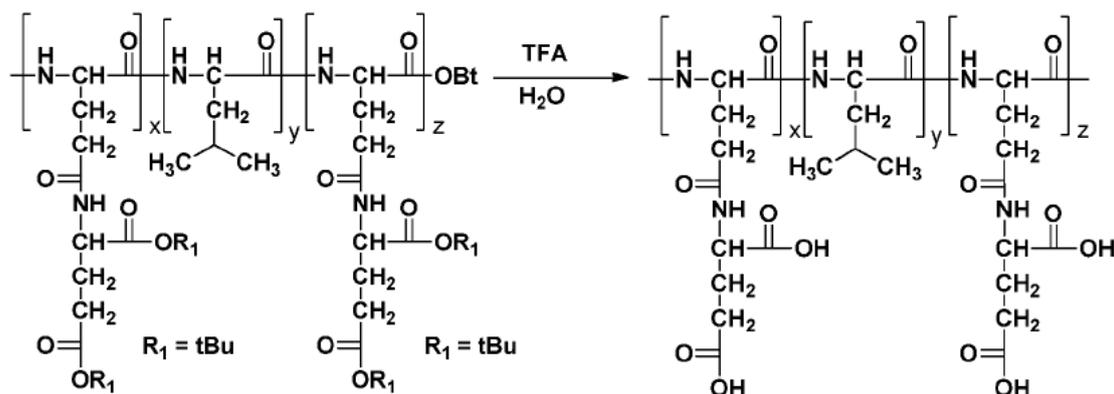


20 A éster de PGGA parcial-20% de alanina (4,0 g) en un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra de agitación magnética se le añadió ácido trifluoroacético (TFA) (25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (aproximadamente 16 horas). Se retiró el ácido trifluoroacético mediante vacío. Al residuo se le añadió agua (1000 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas). Se congeló la disolución y se liofilizó hasta un peso constante (2,92 g, PM: 20,65 kDa).

Ejemplo 32

25

PGGA-10% de leucina

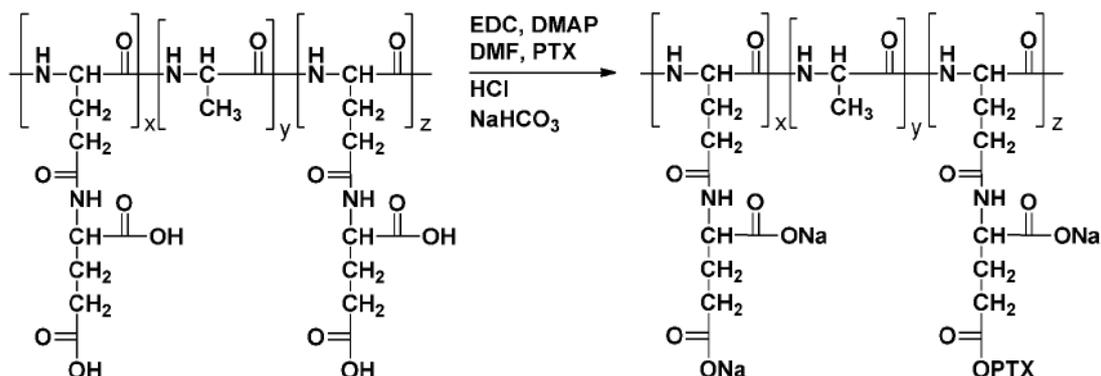


- 5 A éster de PGGA parcial-10% de leucina (4,3 g) en un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra de agitación magnética se le añadió TFA (25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante la noche (aproximadamente 16 horas). Se retiró TFA mediante vacío. Al residuo se le añadió agua (1000 ml). Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas). Se congeló la disolución y se liofilizó hasta un peso constante (2,87 g, PM: 49,38 kDa)

Ejemplo 33

10

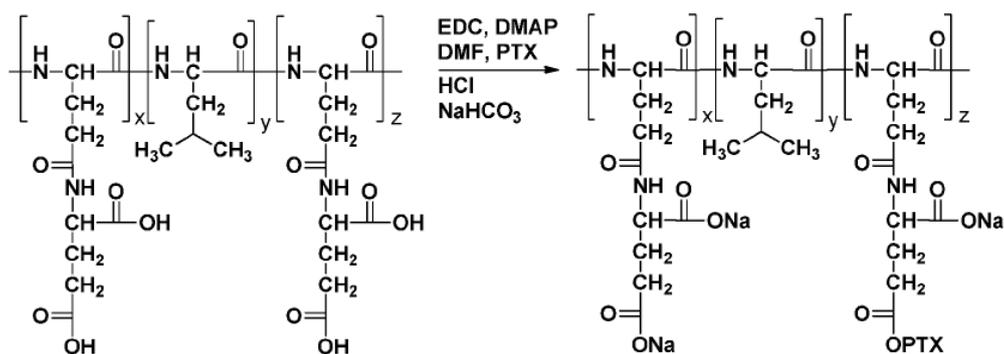
PGGA parcial-20% de alanina-35% de PTX



- 15 A PGGA parcial-20% de alanina (200 mg) pesado en un vial de 40 ml secado en horno se le añadió DMSO anhidro (15 ml). Se burbujeó la disolución con N_2 seco durante 5 min. Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla con agitación (1500 rpm) hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se añadió PTX (107,69 mg) en una porción. Se agitó la disolución a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF y se continuó hasta que se completó según se determina mediante CCF. Se vertió la disolución lentamente en disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas). Se filtró la disolución usando un filtro de membrana de 0,20 μm . Se congeló la disolución y se liofilizó hasta un peso constante (0,165 g, PM: 29,21 kDa).

Ejemplo 34

PGGA parcial-10% de leucina-35% de PTX



5 A PGGA parcial-10% de leucina (200 mg) pesado en un vial de 40 ml secado en horno se le añadió DMSO anhidro (15 ml). Se burbujeó la disolución con N₂ seco durante 5 min. Se añadieron DMAP (28,4 mg, 0,233 mmol) y EDC (193 mg, 1,0 mmol) en secuencia en la mezcla con agitación (1500 rpm) hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se añadió PTX (107,69 mg) en una porción y se agitó la disolución resultante a temperatura ambiental durante 48 horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante CCF y se continuó hasta que se completó según se determina mediante CCF. Entonces se vertió la disolución lentamente en disolución de HCl 0,2 N con agitación fuerte. Se realizó diálisis (PMC: 1 kDa, 10x cambios de agua a lo largo de 24 horas). Se filtró la disolución usando un
10 filtro de membrana de 0,20 µm. Se congeló la disolución y se liofilizó hasta un peso constante (0,372 g, PM: 82,46 kDa).

Ejemplo 35

15 Estudios de liberación de fármacos anticancerígenos

Instrumento de CL-EM, metodología y normas.

Instrumento de CL-EM (Agilent LC 1100, MS G1956B)

20 Columna (Agilent Eclipse XDB C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm, n.º SN B07016)

Disolvente A: agua Milli Q con ácido fórmico al 0,1%

25 Disolvente B: acetonitrilo de calidad para CL-EM con ácido fórmico al 0,1%

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Longitud de onda de detección: 230 nm

30 Temperatura de columna: 25°C

Temperatura de cámara de muestra: 4°C

Gradiente:	Tiempo *(min)	% de A	% de B
	0	80	20
	15	5	95
	20	5	95
	21	80	20
	24	80	20

35 Modo de detección de EM: positivo; intervalo: 70-200

Se ejecutó el patrón de paclitaxel en metanol una vez tras cada conjunto de muestra para garantizar que la idoneidad del sistema era válida, lo que se definió como % de DER ≤ 2%.

40 Conjugados de polímero-paclitaxel con cantidades variables de poli(L-glutamina):

(1) PGGA-PTX (control)

45 (2) PGGA-50% de Q-20% de PTX

(3) PGGA-40% de Q-20% de PTX

(4) PGGA-30% de Q-20% de PTX

(5) PGGA-20% de Q-20% de PTX

5 Se realizó análisis de la liberación de fármaco de los conjugados de polímero-paclitaxel mediante el método de CL-EM. Se disolvió una disolución de los conjugados de polímero-paclitaxel (0,36 mg/ml como equivalente de paclitaxel) en 1 ml de plasma humano al 20% en PBS. Se colocaron los viales de muestra en una incubadora a 37°C con agitación continua. En un intervalo de tiempo predefinido (4, 8, 24, 48, 72 y 96 h), se retiraron de la incubadora dos viales de cada fármaco más un control y se extrajeron con 2 x 2 ml de acetato de etilo (EtOAc) tal como sigue. Se retiró el EtOAc mediante SpeedVac. Se reconstituyó el residuo con 1 ml de metanol, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se envió para análisis mediante CL-EM. Los resultados se muestran en la figura 8.

15 Los resultados de la figura 8 ilustran la tasa de liberación de paclitaxel como una función del porcentaje de poli(L-glutamina) contenida dentro del conjugado de copolímero a lo largo del tiempo. Los datos mostrados en la figura 8 muestran que la composición de copolímero de conjugados que contienen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) puede usarse para controlar generalmente la tasa de liberación de paclitaxel, en estas condiciones. Tal como se muestra en la figura 8, aumentar el porcentaje de poli(L-glutamina) contenida dentro del conjugado de polímero proporciona una tasa de liberación aumentada del fármaco anticancerígeno, paclitaxel, a lo largo de varias horas en comparación con el conjugado de polímero de control.

Conjugados de polímero-paclitaxel con pesos moleculares variables de PGGA:

25 (1) PGGA-PTX (control),

(2) PGGA de 19k Da-20% de Q-20% de PTX

(3) PGGA de 33k Da-20% de Q-20% de PTX

30 (4) PGGA de 47k Da-20% de Q-20% de PTX

35 Se realizó análisis de la liberación de fármaco de los conjugados de polímero-paclitaxel con pesos moleculares variables de PGGA mediante el método de CL-EM. Se disolvió una disolución de los conjugados de polímero-paclitaxel (0,36 mg/ml como equivalente de paclitaxel) en 1 ml de plasma humano al 20% en PBS. Se colocaron los viales de muestra en una incubadora a 37°C con agitación continua. En un intervalo de tiempo predefinido (4, 8, 24, 48, 72 y 96 h), se retiraron de la incubadora dos viales de cada fármaco más un control y se extrajeron con 2 x 2 ml de acetato de etilo (EtOAc) tal como sigue. Se retiró el EtOAc mediante SpeedVac. Se reconstituyó el residuo con 1 ml de metanol, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se envió para análisis mediante CL-EM. Los resultados se muestran en la figura 9.

45 Los resultados de la figura 9 ilustran la tasa de liberación de paclitaxel como una función del peso molecular de conjugados de copolímero que contienen unidades recurrentes de poli(L-glutamina) a lo largo del tiempo. Los datos mostrados en la figura 9 muestran que el peso molecular de conjugados de copolímero que contienen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) de pesos moleculares variables puede usarse para controlar generalmente la tasa de liberación de paclitaxel, en estas condiciones.

Conjugados de polímero-paclitaxel que contienen cantidades variables de poli(L-alanina) o poli(L-leucina):

50 (1) PGGA-PTX (control),

(2) PGGA-20% de A-20% de PTX

55 (3) PGGA-10% de A-20% de PTX

(4) PGGA-20% de L-20% de PTX

60 (5) PGGA-10% de L-20% de PTX

65 Se realizó análisis de la liberación de fármaco de los conjugados de polímero-paclitaxel mediante el método de CL-EM. Se disolvió una disolución de los conjugados de polímero-paclitaxel (0,36 mg/ml como equivalente de paclitaxel) en 1 ml de plasma humano al 20% en PBS. Se colocaron los viales de muestra en una incubadora a 37°C con agitación continua. En un intervalo de tiempo predefinido (4, 8, 24, 48, 72 y 96 h), se retiraron de la incubadora dos viales de cada fármaco más un control y se extrajeron con 2 x 2 ml de acetato de etilo (EtOAc) tal como sigue. Se retiró el EtOAc mediante SpeedVac. Se reconstituyó el residuo con 1 ml de metanol, se filtró a través de un filtro de

jeringa de 0,2 µm y se envió para análisis mediante CL-EM. Los resultados se muestran en la figura 10.

Los resultados de la figura 10 ilustran la tasa de liberación de paclitaxel como una función de la cantidad de unidades recurrentes de poli(L-alanina) o poli(L-leucina) en el conjugado de copolímero a lo largo del tiempo. Los datos mostrados en la figura 10 muestran que la composición de copolímero de conjugados que contienen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) puede usarse para controlar generalmente la tasa de liberación de paclitaxel, en estas condiciones. Tal como se muestra en la figura 10, aumentar el porcentaje de poli(L-alanina) o poli(L-leucina) contenidas dentro del conjugado de polímero proporciona una tasa de liberación aumentada del fármaco anticancerígeno, paclitaxel, a lo largo de varias horas en comparación con el conjugado de polímero de control.

Ejemplo 36

Estudios de MTT de citotoxicidad *in vitro*

Se evaluaron conjugados de polímeros descritos en el presente documento que contenían paclitaxel para determinar su efecto sobre la proliferación de células de melanoma B16F0 a varias concentraciones diferentes del fármaco. Se llevo a cabo ensayo de MTT citotóxico según se notifica en Monks *et al.* JNCI 1991, 83, 757-766.

Ejemplo 37

Ensayo *in vivo*

Establecimiento de xenoinjerto de tumor NCI-H460

Se adquirió la línea celular NCI-H460 de la ATCC y se mantuvo en RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células estaban en crecimiento en fase logarítmica cuando se recogieron. Se tripsinizaron las células ligeramente con tripsina-EDTA y se recogieron del cultivo tisular. Se contó el número de células viables y se determinó en un hemocitómetro en presencia de azul tripano (solo se contaron células viables). Se inocularon a cada ratón por vía subcutánea en el flanco derecho 0,1 ml de un inóculo de 3×10^6 células NCI-H460 usando una jeringa y aguja 25 G (un inóculo por ratón). Se monitorizó el volumen tumoral dos veces a la semana. También se tomaron mediciones de peso corporal. Se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: Volumen tumoral = (longitud x anchura²)/2.

Eficacia de los artículos de prueba

Una vez que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 75 - 125 mm³ (volumen tumoral promedio a 100 mm³), se asignaron los ratones a los grupos de control de vehículo y diversos grupos de tratamiento, de modo que los volúmenes tumorales medios en los grupos tratados estaban dentro del 10% del volumen tumoral medio en el grupo de control de vehículo, y el % de CV del volumen tumoral era de menos del 25%. El mismo día, se inyectaron artículos de prueba recién preparados y el grupo de control de vehículo a través de una vena de la cola a dosis de 175 y 250 mg (equiv. de PTX)/kg, y un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Se monitorizó el volumen tumoral dos veces a la semana. También se tomaron mediciones de peso corporal. Se calculó el volumen tumoral usando la fórmula proporcionada anteriormente. El volumen tumoral individual alcanzó 3000 mm³ o el tumor se ulceró y los animales se sacrificaron basándose en regulaciones del IACUC.

Medición del peso corporal

Se monitorizaron los pesos corporales y se registraron diariamente durante la primera semana comenzando el primer día de tratamiento y dos veces a la semana después de la primera semana, incluyendo el día de finalización del estudio.

Preparación de disolución de administración

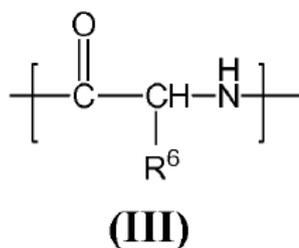
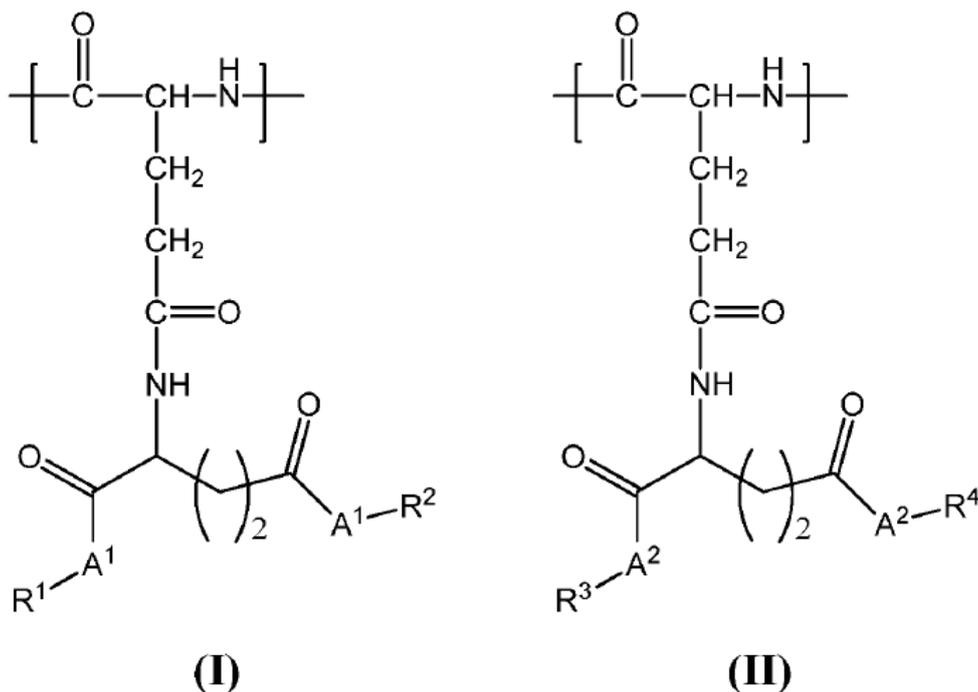
Las disoluciones de administración se prepararon de manera reciente el día de administración. Se disolvieron los artículos de prueba en PBS (pH 7,4) a una concentración de equivalente de PTX/ml para cumplir la dosificación y el volumen de dosificación de 10 ml por kilogramo. Se diluyó Abraxane (calidad clínica) en solución salina a una concentración de 8 mg/ml (equivalente de PTX).

Los resultados se muestran en las figuras 11 y 12. La figura 11 ilustra que el volumen del tumor disminuye en un mayor grado tras la inyección con un conjugado de polímero que incluye una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) tal como se describe en el presente documento a diversas dosificaciones en comparación con el control de vehículo. La figura 12 muestra que los conjugados de polímero que incluyen una unidad recurrente de fórmula (I), una unidad recurrente de fórmula (II) y una unidad recurrente de fórmula (III) tal como se describe en el presente documento a diversas dosificaciones reducen el volumen tumoral en un mayor grado que el control de vehículo.

REIVINDICACIONES

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

5



en las que:

10

cada A¹ y cada A² son independientemente oxígeno o NR⁵, en el que R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

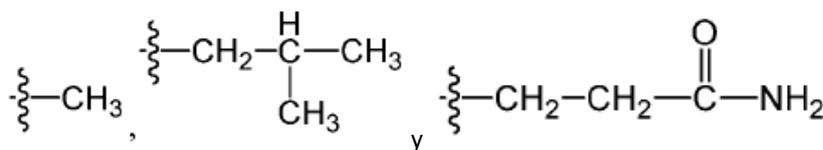
15

cada R¹ y cada R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₁₀, un grupo arilo C₆₋₂₀, amonio, un metal alcalino y un compuesto que comprende un fármaco anticancerígeno, siempre que al menos uno de R¹ y R² sea un compuesto que comprende un fármaco anticancerígeno;

20

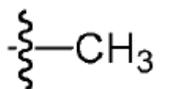
cada R³ y cada R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₁₀, un grupo arilo C₆₋₂₀, amonio y un metal alcalino; y

cada R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en

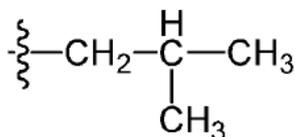


2. El conjugado de polímero de la reivindicación 1, en el que el compuesto que comprende el fármaco anticancerígeno comprende además un grupo conector.

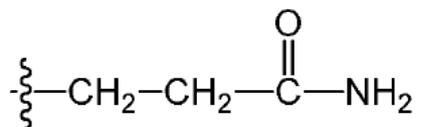
3. El conjugado de polímero de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto que comprende el fármaco anticancerígeno se une directamente a A¹.
- 5 4. El conjugado de polímero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fármaco anticancerígeno se selecciona del grupo que consiste en un taxano, *Camptotheca* y antraciclina.
5. El conjugado de polímero de la reivindicación 4, en el que el taxano se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel y docetaxel.
- 10 6. El conjugado de polímero de la reivindicación 4, en el que el taxano es paclitaxel.
7. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conjugado de polímero comprende una cantidad del fármaco anticancerígeno en el intervalo del 1% al 50% (peso/peso) basándose en la razón de masas del fármaco anticancerígeno con respecto al conjugado de polímero.
- 15 8. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el otro de R¹ y R² es un metal alcalino, y cada R³ y cada R⁴ son un metal alcalino.
- 20 9. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el otro de R¹ y R² es hidrógeno, y cada R³ y cada R⁴ son hidrógeno.
10. El polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada A¹ y cada A² son oxígeno.
- 25 11. El conjugado de polímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada R⁶ es



- 30 12. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada R⁶ es



13. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada R⁶ es



- 35 14. El conjugado de polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el conjugado de polímero comprende del 1% en moles al 70% en moles de la unidad recurrente de fórmula (III) basándose en los moles totales de unidades recurrentes de fórmulas (I), (II) y (III).
- 40 15. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y al menos uno seleccionado de un excipiente, un portador y un diluyente farmacéuticamente aceptables.

FIGURA 1

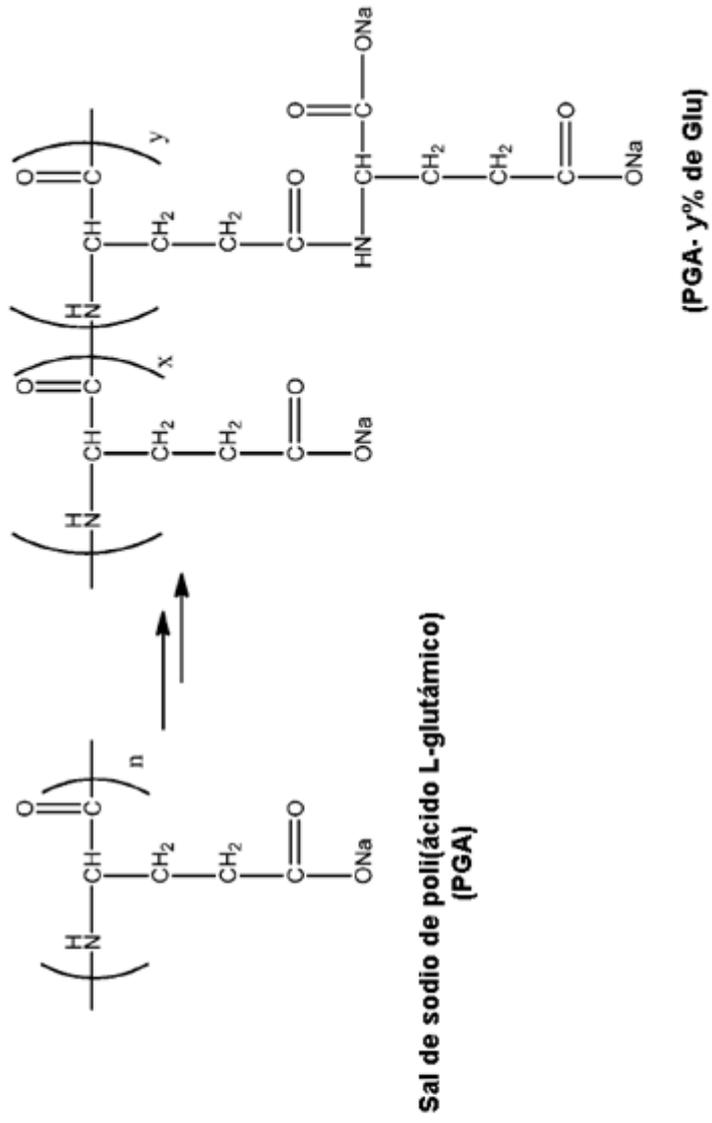


FIGURA 2

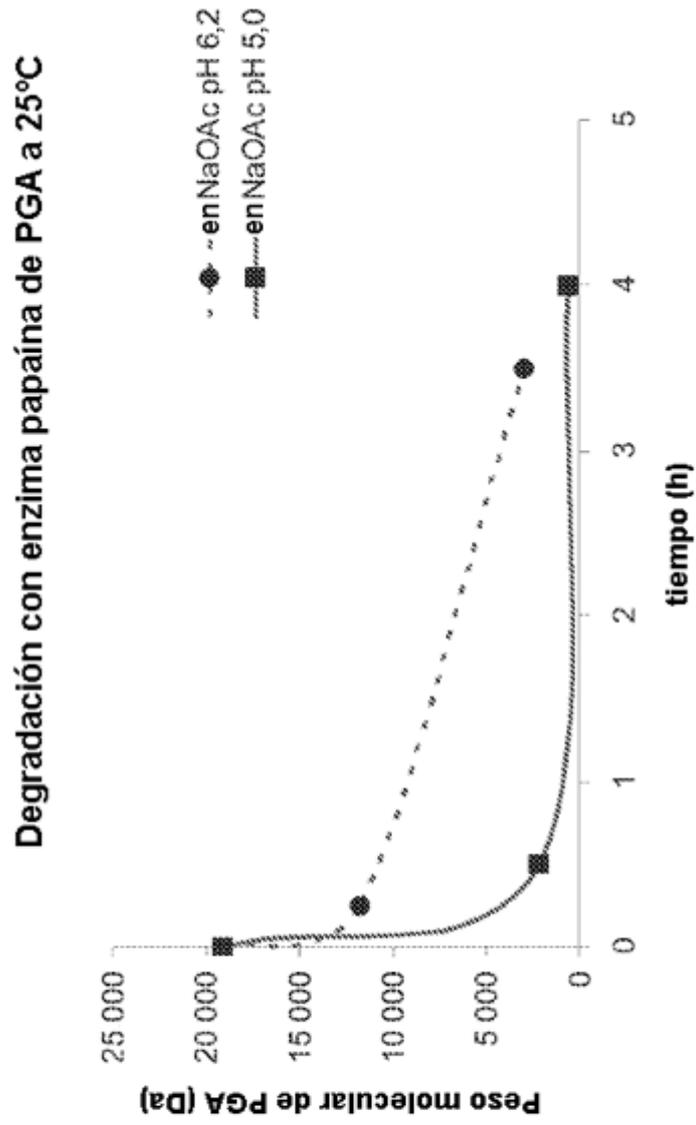


FIGURA 3

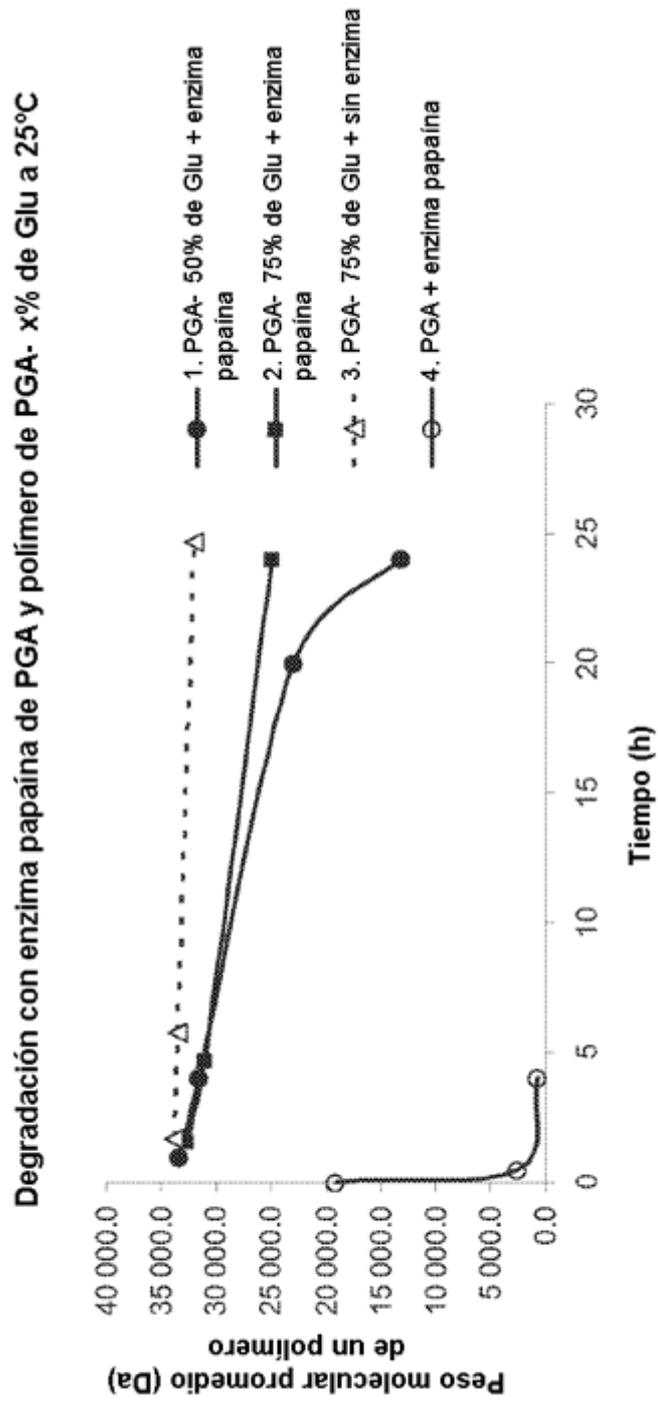


FIGURA 4

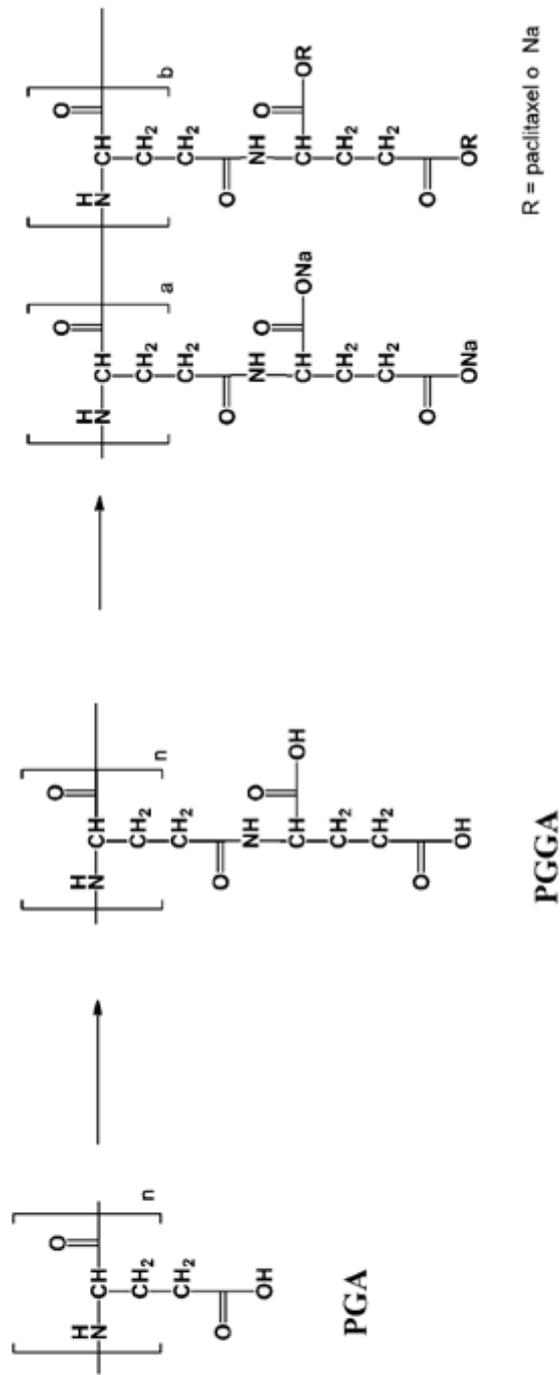


FIGURA 5

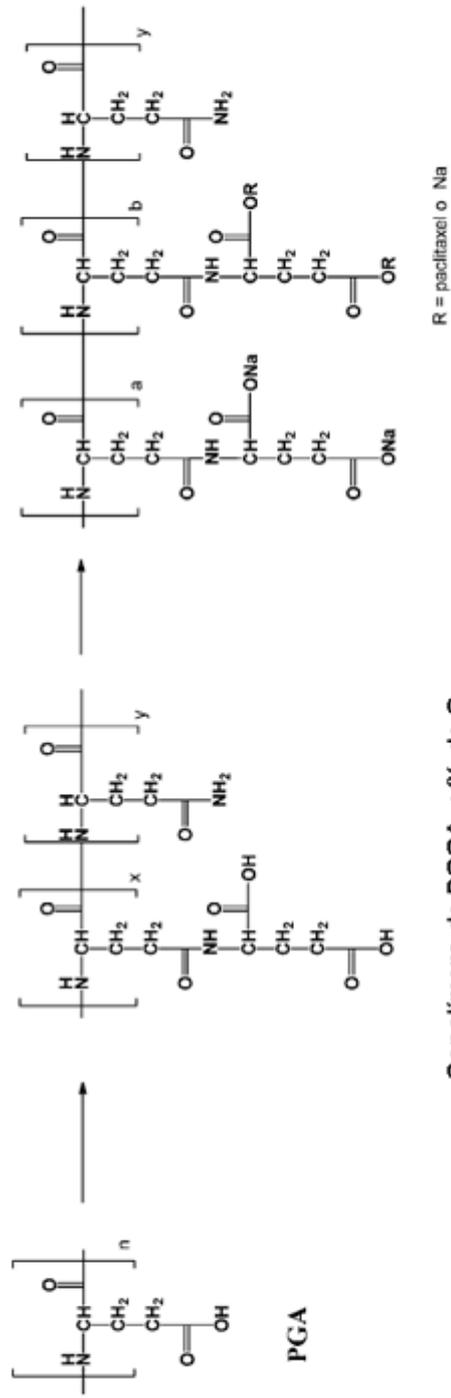


FIGURA 6

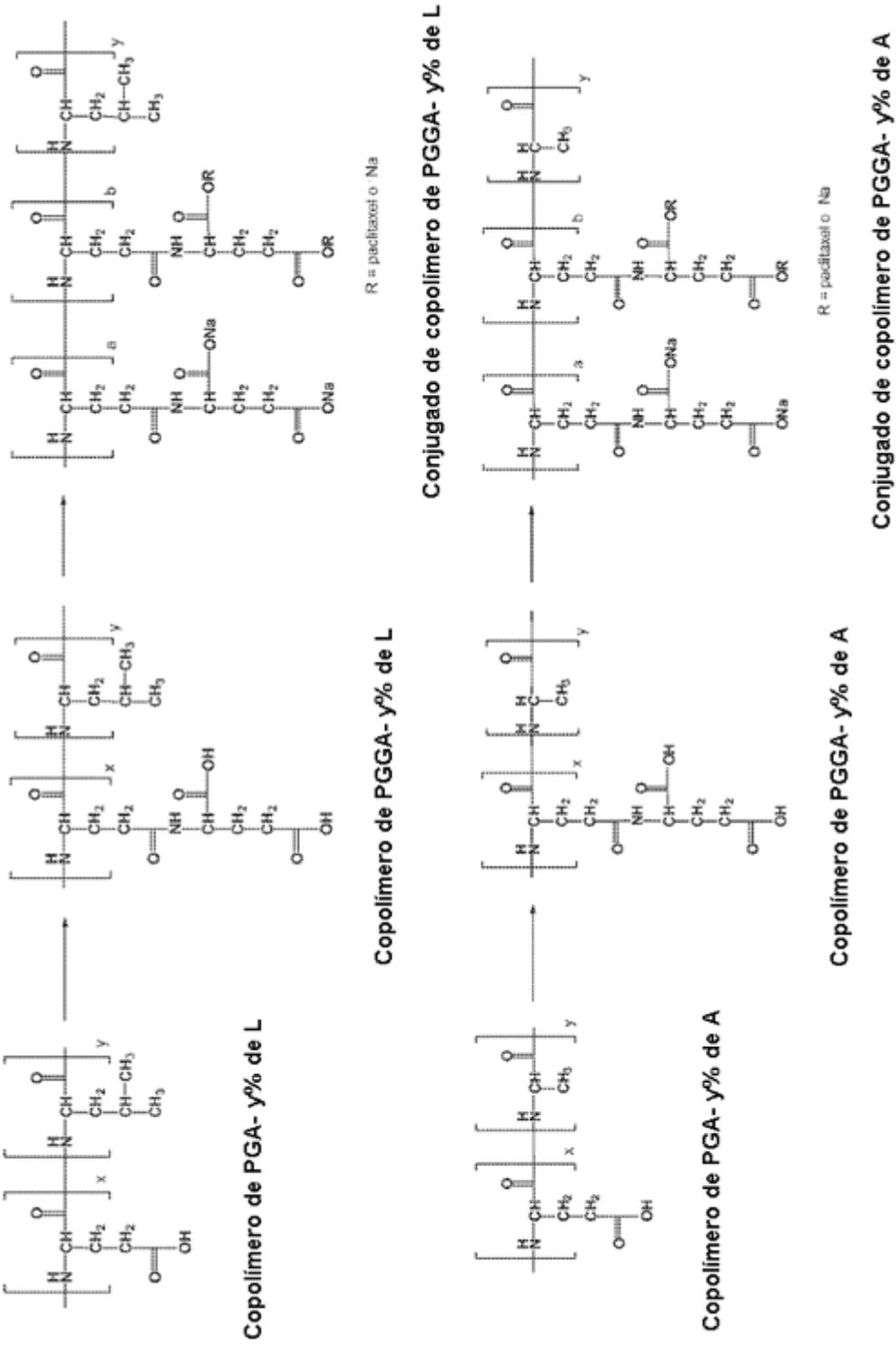


FIGURA 7

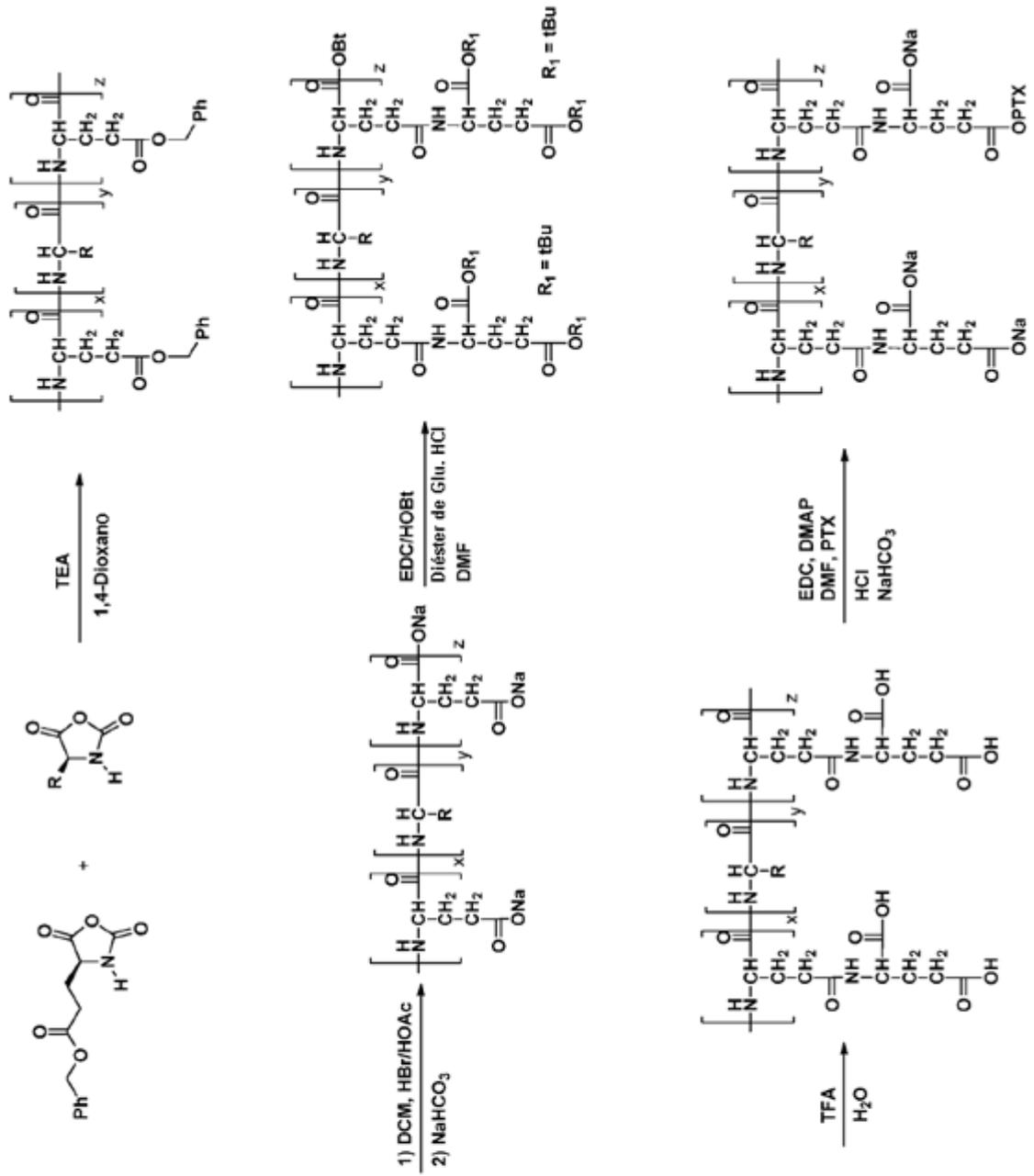


FIGURA 8

Liberación de paclitaxel de conjugados de polímero-paclitaxel en plasma humano al 20% en PBS, a 37°C

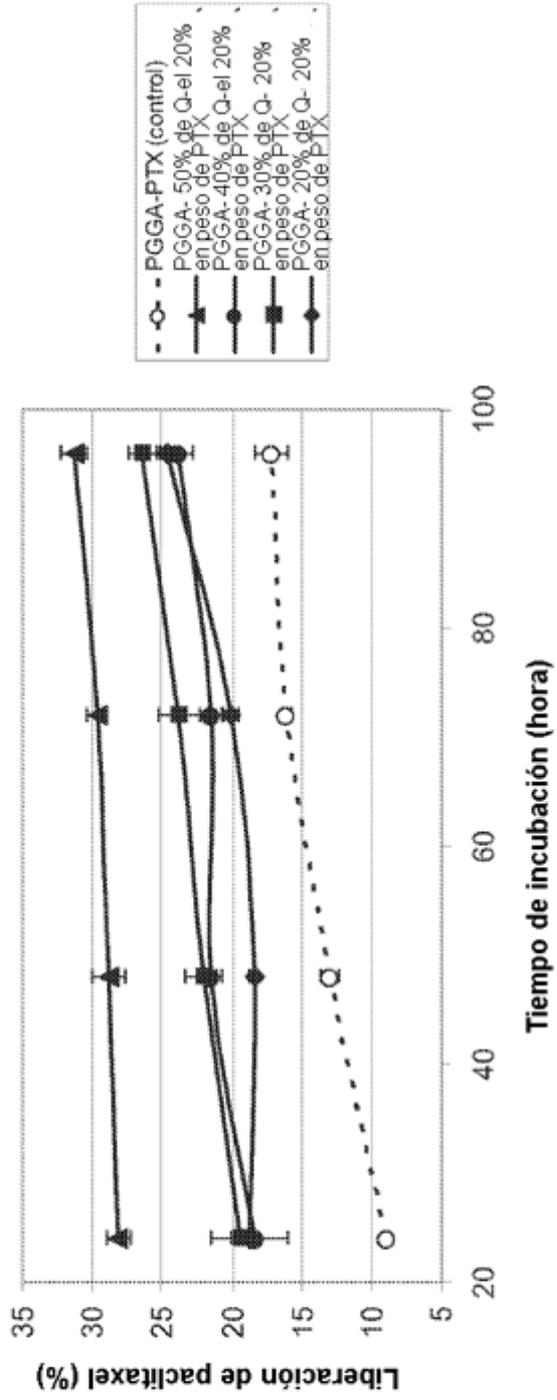


FIGURA 9

Liberación de paclitaxel de conjugados de polímero con pesos moleculares variables en plasma humano al 20% en PBS, a 37°C

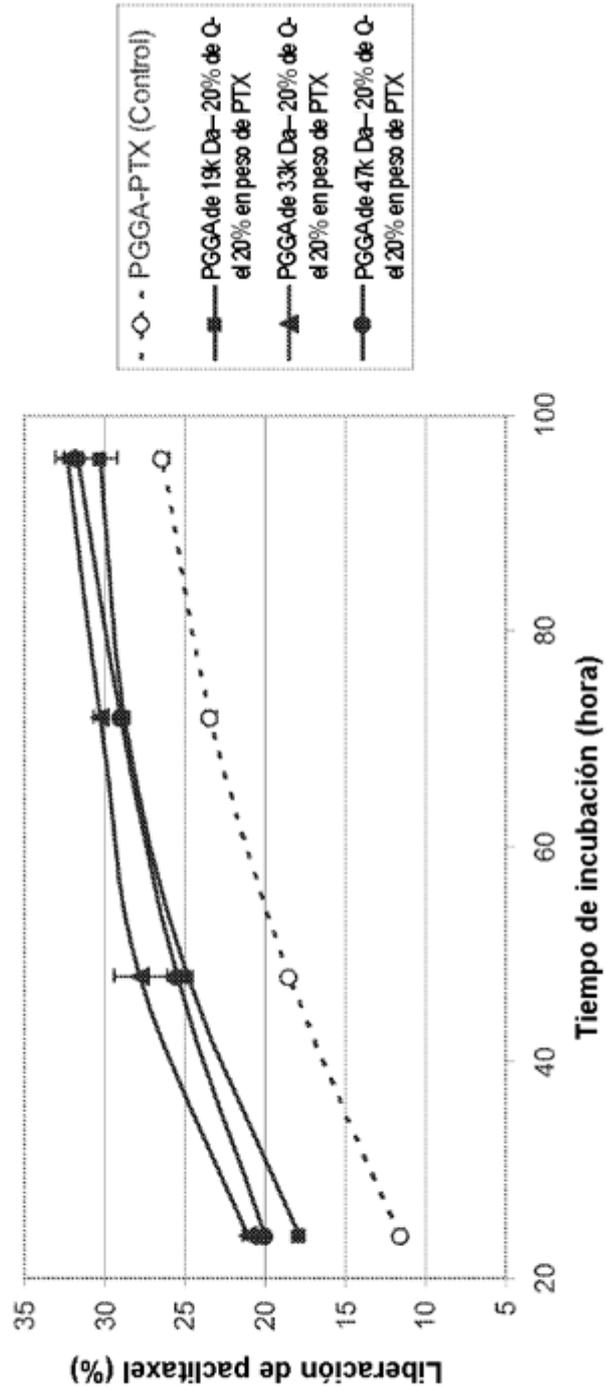


FIGURA 10

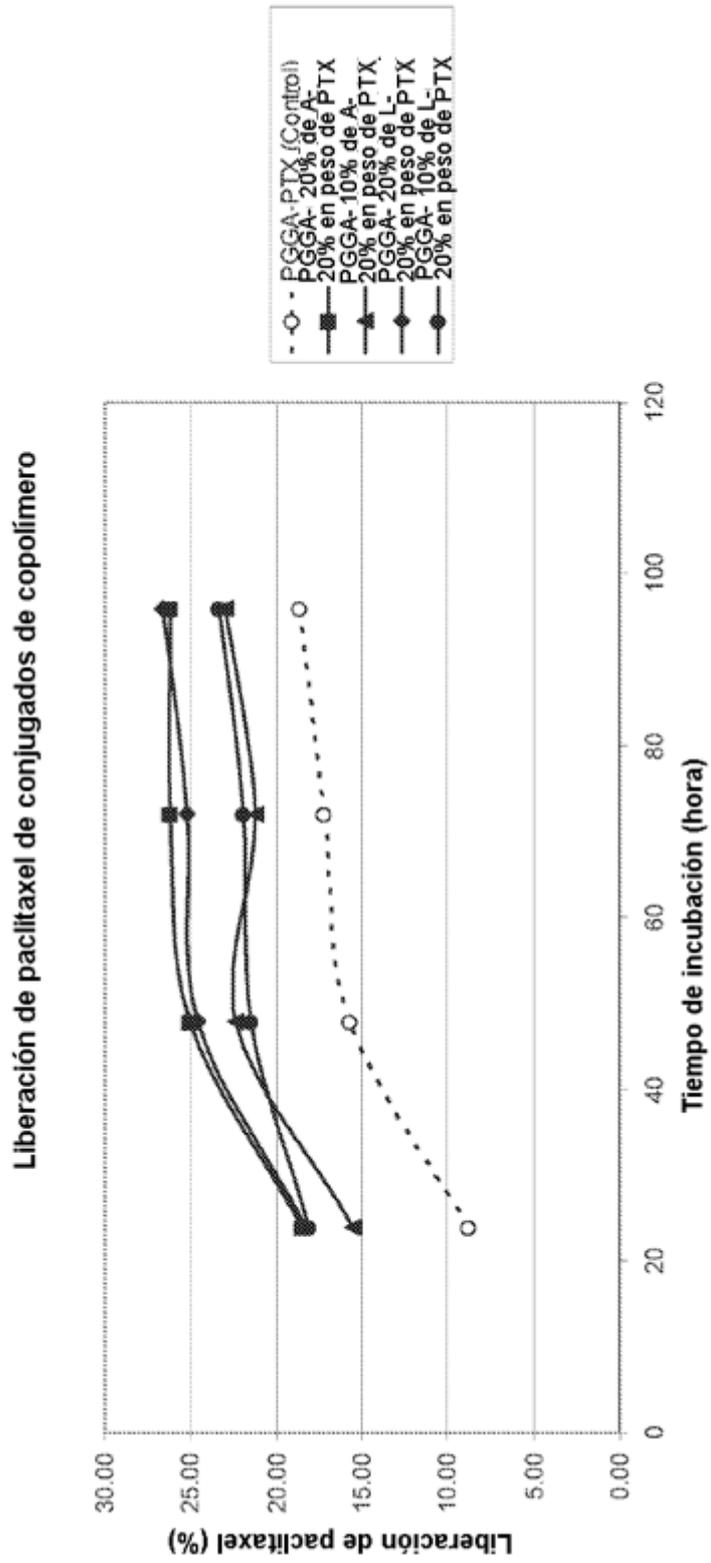


FIGURA 11

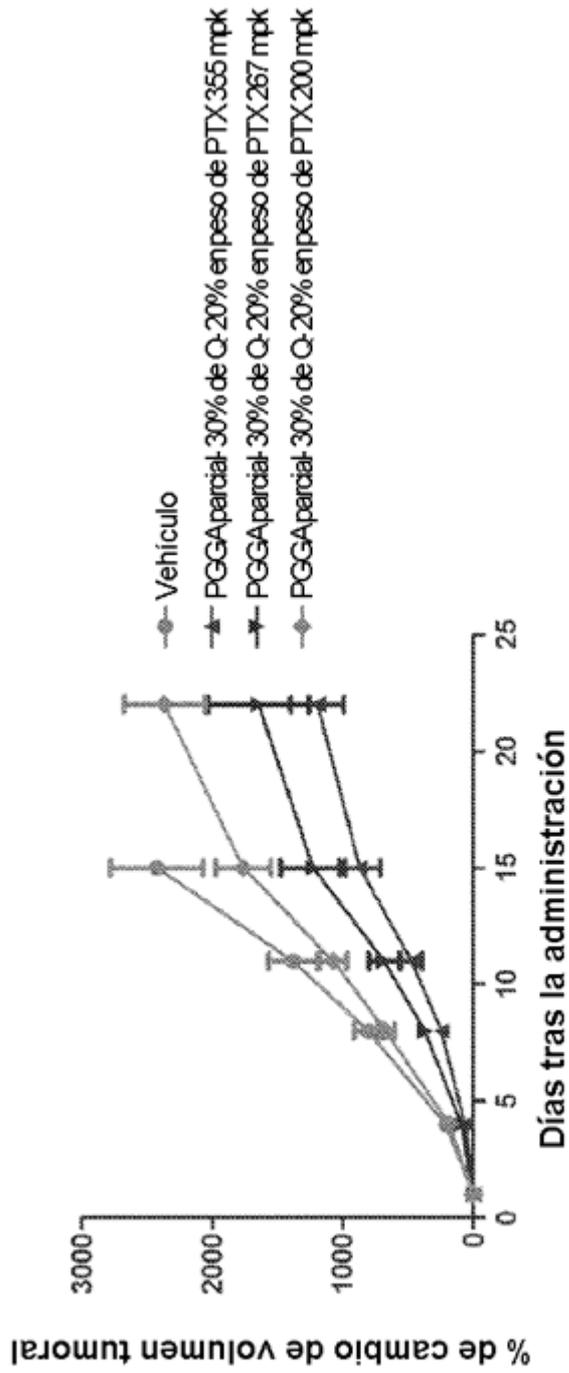


FIGURA 12

