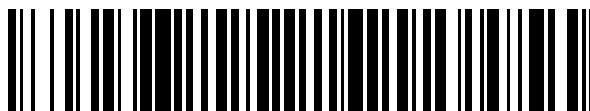


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 026**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C08G 65/08 (2006.01)

C08G 65/14 (2006.01)

C08G 65/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2010 PCT/US2010/057289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11063156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10782159 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2501413**

54 Título: **Formas de sal de ácido de conjugados polímero-fármaco**

30 Prioridad:

24.12.2009 US 290072 P

18.11.2009 US 262463 P

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

21.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 723 026 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

Formas de sal de ácido de conjugados polímero-fármaco.

Campo

- 5 Esta divulgación se refiere en general a composiciones mixtas de sales de ácidos de conjugados de polímero solubles en agua, composiciones farmacéuticas de las mismas y métodos de preparación, formulación, administración y uso de tales composiciones de sales de ácidos mixtas. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.
- 10 Antecedentes
- 15 A lo largo de los años, se han propuesto numerosos métodos para mejorar la estabilidad y la administración de agentes biológicamente activos. Los desafíos asociados con la formulación y el suministro de agentes farmacéuticos pueden incluir una pobre solubilidad acuosa del agente farmacéutico, toxicidad, baja biodisponibilidad, inestabilidad y rápida degradación in vivo, por mencionar solo algunos. Aunque se han ideado muchos enfoques para mejorar la administración de agentes farmacéuticos, no existe un enfoque único sin sus inconvenientes potenciales. Por ejemplo, los enfoques de administración de fármacos empleados comúnmente para resolver o al menos mejorar uno o más de estos problemas incluyen la encapsulación de medicamentos, tal como en un liposoma, matriz de polímero o micela unimolecular, unión covalente a un polímero soluble en agua tal como polietilenglicol, uso de agentes de direccionamiento genético, formación de sales, y similares.
- 20 La unión covalente de un polímero soluble en agua puede mejorar la solubilidad en agua de un agente activo, así como alterar sus propiedades farmacológicas. Ciertos conjugados de polímeros de ejemplo se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 7,744,861, pero no se limitan a. En otro enfoque, un agente activo que tiene funcionalidades ácidas o básicas se puede hacer reaccionar con una base o ácido apropiado y comercializarse en forma de sal. Más de la mitad de todas las moléculas activas se comercializan como sales (Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, Hilfiker, R., ed., Wiley-VCH, 2006). Los desafíos con las formas de sal incluyen encontrar una sal óptima, así como controlar el comportamiento del estado sólido durante el procesamiento. Las sales biofarmacéuticas pueden ser amorfas, cristalinas, y pueden existir como hidratos, solventes, diversos polimorfos, etc. Es interesante que rara vez sean formas de sal, y mucho menos formas de sales de ácidos mixtas, de conjugados de polímeros usados en las formulaciones de medicamentos.
- 25 Otro desafío asociado con la preparación de conjugados de polímeros solubles en agua-agente activo Waters es la capacidad de preparar polímeros solubles en agua relativamente puros en un método consistente y reproducible. Por ejemplo, los derivados de poli(etilenglicol) (PEG) activados con grupos funcionales reactivos son útiles para acoplarse a agentes activos (tal como moléculas pequeñas y proteínas), formando así un conjugado entre el PEG y el agente activo. Cuando un agente activo se conjuga con un polímero de poli(etilenglicol) o "PEG", el agente activo conjugado se denomina convencionalmente como que ha sido "PEGilado".
- 30 Cuando se compara con la seguridad y eficacia del agente activo en la forma no conjugada, la versión conjugada presenta propiedades diferentes, y a menudo clínicamente beneficiosas. El éxito comercial de los agentes activos PEGilados tal como el interferón alfa-2a PEGASYS® PEGilado (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), el interferón alfa-2b PEG-INTRON® PEGilado (Schering Corp., Kenilworth, NJ), y NEULASTA® PEG-filgrastim (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) demuestra el grado en que la PEGilación tiene el potencial de mejorar una o más propiedades de un agente activo.
- 35 En la preparación de un conjugado, por lo general se emplea un reactivo polimérico para permitir un enfoque sintético relativamente sencillo para la síntesis de conjugado. Al combinar una composición que comprende un reactivo polimérico con una composición que comprende el agente activo, es posible, en las condiciones de reacción apropiadas, llevar a cabo una síntesis de conjugado relativamente conveniente.
- 40 La preparación del reactivo polimérico apropiado para los requisitos regulatorios para productos farmacéuticos, sin embargo, a menudo es un desafío. Los enfoques de polimerización convencionales dan como resultado composiciones relativamente impuras y/o bajo rendimiento. Aunque tales impurezas y rendimientos pueden no ser problemáticos fuera del campo farmacéutico, la seguridad y el coste representan preocupaciones importantes en el contexto de los medicamentos para uso humano. De este modo, los enfoques de polimerización convencionales no son apropiados para la síntesis de reactivos poliméricos destinados a la fabricación de conjugados farmacéuticos.
- 45 En el caso de los polímeros multi-brazos, hay una escasez de polímeros solubles en agua disponibles, deseables, que tengan propiedades bien controladas y definidas con la ausencia de cantidades significativas de impurezas indeseables. Por lo tanto, uno puede obtener fácilmente, por ejemplo, un poli(etilenglicol) de multi-brazos de alto peso molecular, pero los conjugados de fármacos fabricados a partir de polímeros comerciales pueden tener cantidades significativas (esto es, > 8%) de conjugado de polímero-fármaco que tiene ya sea impurezas
- 50
- 55

biológicamente activas de peso molecular muy baja o muy alta. Esta extensión de impurezas activas en una composición de fármaco puede hacer que tales composiciones sean inaceptables y, de este modo, hacer que la aprobación de tales fármacos sea un desafío, si no imposible.

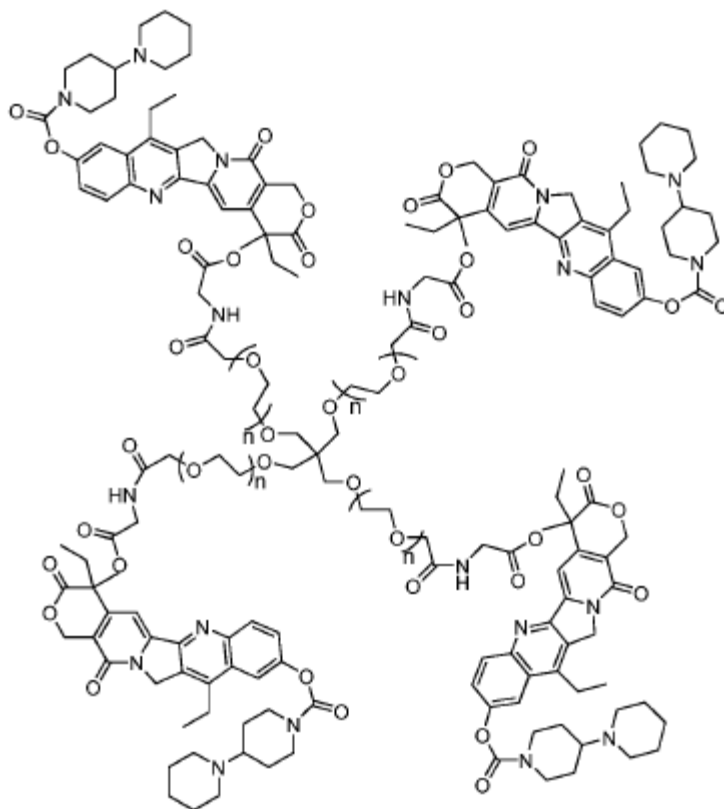
- 5 La Publicación Internacional No. WO2005/028539 describe polímeros solubles en agua que tienen tres o más brazos, al menos tres de los cuales están unidos covalentemente a un agente activo, por ejemplo, una pequeña molécula, preferiblemente por un enlace hidrolizable.

Resumen de la invención

- 10 La presente invención proporciona una composición que comprende sales mixtas de conjugados de agente activo y polímero solubles en agua, en el que el agente activo en el conjugado tiene al menos un grupo amino básico, y además en el que para cada grupo amina dentro del agente activo, el grupo amina es ya sea protonado o no protonado, donde cualquier grupo amina protonado dado es una forma de sal de ácido de un ácido inorgánico o ácido trifluoroacético (TFA), en el que (i) el polímero soluble en agua es un poli(etilenglicol) de multi-brazos, (ii) el agente activo es irinotecán, (iii) el ácido inorgánico es ácido clorhídrico (HCl), (iv) al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, (v) 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal HCl, y (vi) 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

En una o más realizaciones de la invención, el agente activo es una camptotecina. El agente activo de la invención es irinotecán, según las reivindicaciones.

- 20 En una o más realizaciones de la invención, la composición comprende una sal mixta de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo de acuerdo con las reivindicaciones correspondientes a la estructura (I):



- 25 en la que n es un número entero que oscila desde 20 a aproximadamente 500 (átomos de nitrógeno amino protonados específicos y contraiones no mostrados), y para cada grupo amina dentro de cada irinotecán, cada grupo amino está ya sea protonado o no protonado, donde cualquier grupo amina protonado dado es una forma de sal de ácido de un ácido inorgánico o ácido trifluoroacético.

En una o más realizaciones de la invención, con respecto a una composición de conjugados (por ejemplo, una composición de conjugados de cuatro brazos), el por ciento en moles de grupos amino del agente activo (u otros átomos de nitrógeno básicos) en la composición que se encuentran protonada, ya que la sal de TFA es mayor que cada uno del por ciento en moles de grupos amino del agente activo en la composición que se protonan como una

sal de ácido inorgánico y el por ciento en moles de grupos amino del agente activo en la composición en forma de base libre

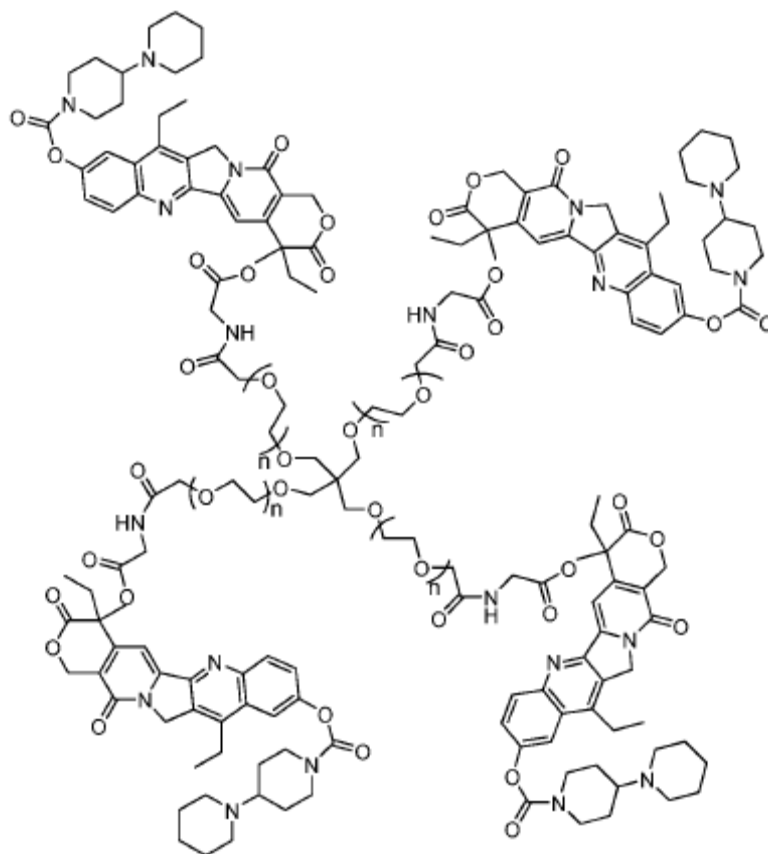
5 Todavía en una realización alternativa, con respecto a una composición de conjugados (por ejemplo, una composición de conjugados de cuatro brazos) el por ciento en moles de grupos de amina de agente activo (u otros átomos de nitrógeno básicos) en la composición que están protonados como la sal de TFA es mayor que el por ciento en moles de los grupos de amina del agente activo en la composición que se encuentran en forma de base libre (esto es, no protonada).

10 En una o más realizaciones, con respecto a una composición de conjugados (por ejemplo, una composición de conjugados de cuatro brazos) al menos 25 por ciento en moles de grupos de amina de agente activo en la composición están protonados como la sal de TFA.

En una o más realizaciones de la invención, con respecto a una composición de conjugados (por ejemplo, una composición de conjugados de cuatro brazos), aproximadamente 35-65 por ciento en moles de grupos amino del agente activo en la composición están protonados como la sal de TFA.

15 En una o más realizaciones de la invención, con respecto a una composición de conjugados (por ejemplo, una composición de conjugados de cuatro brazos), aproximadamente el 25-40 por ciento en moles de los grupos amino del agente activo en la composición están protonados como una sal de ácido inorgánico (tal como la sal de HCl) y aproximadamente el 5-35 por ciento en moles de los grupos amino del agente activo en la composición no están protonados (esto es, como base libre).

20 En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una sal mixta de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico de un conjugado según las reivindicaciones, teniendo el conjugado la siguiente estructura:



25 en la que n es un número entero que oscila desde aproximadamente 40 a aproximadamente 500 (observando que en la estructura anterior, no se muestran los átomos de nitrógeno básicos específicos en forma protonada y los aniones correspondientes). En una o más realizaciones de la invención, una porción de grupos amino en conjugado abarcada por la estructura inmediatamente anterior no está protonada. Las relaciones molares de ejemplo de formas protonadas y no protonadas como se ha proporcionado anteriormente y en este documento se aplican al conjugado anterior.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método para proporcionar una sal mixta de un conjugado de agente polimerizante soluble en agua, que comprende las etapas de: (i) desproteger una sal de ácido inorgánico de un agente activo que contiene amina en forma protegida por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para formar una sal mixta desprotegida de ácido inorgánico/TFA, (ii) determinar las cantidades molares relativas de ácido inorgánico y TFA en la sal de ácido desprotegida formada en la etapa (i), (iii) acoplar la sal mixta de ácido inorgánico/TFA desprotegida de la etapa (i) con un reactivo polimérico soluble en agua en presencia de una base (por ejemplo, trimetilamina, trietilamina y dimetilamino-piridina) para formar un conjugado de agente activo en polímero. y (iv) recuperación del conjugado de agente activo de polímero, donde el conjugado de agente activo de polímero recuperado se caracteriza por tener grupos amino del agente activo presentes individualmente en una forma seleccionada del grupo que consiste en la forma de base libre (no protonada), forma de sal de ácido inorgánico y forma de sal de TFA, en el que (i) el polímero soluble en agua es un poli(etilenglicol) de multi-brazos, (ii) el agente activo es irinotecán, (iii) el ácido inorgánico es ácido clorhídrico (HCl), (iv) el reactivo polimérico soluble en agua es un éster de polietilenglicol activado, (v) al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, (vi) 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal HCl, y (vii) 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

El método comprende determinar las cantidades molares relativas de ácido inorgánico y TFA en la sal de ácido desprotegida formada en la etapa (i). La sal de ácido inorgánico en la etapa (i) es una sal de ácido clorhídrico. En una o más realizaciones de la invención, la cantidad de base en la etapa (ii) oscila de 1.00 a 2.00 (moles de TFA + moles de ácido). En una o más realizaciones relacionadas, la cantidad de base en la etapa (ii) oscila de 1.00 a 1.50 (moles de TFA + moles de ácido inorgánico), donde el paréntesis indica la multiplicación. En una o más realizaciones relacionadas, la cantidad de base en la etapa (ii) oscila de 1.00 a 1.20 (moles de TFA + moles de ácido inorgánico). En una realización particular, el número de equivalentes de base es 1.05 ((moles de TFA + moles de ácido inorgánico).

El reactivo polimérico soluble en agua es un éster de polietilenglicol activado (esto es, un reactivo de polietilenglicol que tiene al menos un grupo éster activado). En una o más realizaciones de la invención, los grupos de amina de agente activo en el conjugado de agente de polímero activo se seleccionan del grupo que consiste en grupos de amina secundaria y grupos de amina terciaria. En una o más realizaciones de la invención, los grupos amino del agente activo son grupos amino terciarios. En otra realización más, el conjugado de agente activo de polímero comprende un átomo de nitrógeno básico que, como su correspondiente ácido conjugado, tiene un pK_a en un intervalo de aproximadamente 10-11.5.

El agente activo de la invención es irinotecán según las reivindicaciones. El agente activo es una camptotecina. Moléculas ilustrativas de camptotecina son camptotecina, irinotecán y 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38). Los sitios de ejemplo para la unión covalente a un polímero soluble en agua incluyen las posiciones de los anillos 7, 10 y 20 del esqueleto de la camptotecina, entre otros.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéuticamente aceptable, comprendiendo la composición farmacéuticamente aceptable (i) una sal mixta según una cualquiera o más de las realizaciones descritas en este documento, y (ii) solución reguladora de lactato, en forma liofilizada. En una o más realizaciones de la invención, la composición farmacéuticamente aceptable es una composición estéril. En una o más realizaciones de la invención, la composición farmacéuticamente aceptable se proporciona opcionalmente en un recipiente (por ejemplo, un vial), que contiene opcionalmente el equivalente de una dosis de 100 mg de irinotecán en forma no conjugada.

En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un método de preparación de una sal mixta de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo, comprendiendo el método las etapas de: (i) desproteger t-Boc glicina-irinotecán.HCl por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para formar glicina-irinotecán HCl desprotegido, (ii) acoplamiento del glicina-irinotecán HCl desprotegido con pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil succinimida de 4 brazos en presencia de una base en condiciones eficaces para formar un conjugado, pentaeritritolil-polietilenglicol-carboximetil glicina-irinotecán de 4 brazos (también conocido como irinotecán unido a pentaeritritolil-4-brazo- (PEG-1-metilen-2-oxo-vinilamino acetato) y (iii) recuperando el conjugado de la etapa (ii), en el que el conjugado es una sal mixta que comprende grupos amina en una combinación forma de base libre, sal de HCl y de TFA, en el que al menos 25 por ciento en moles de los grupos de amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal HCl, y el 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

En una o más realizaciones de la invención, el método comprende además purificar el conjugado (por ejemplo, que comprende recristalizar el conjugado para formar un conjugado recristalizado). En una o más realizaciones de la invención, se proporciona un producto recristalizado, siendo el producto recristalizado una sal de ácido mixta que comprende grupos amino del agente activo que existe como una combinación de formas de base libre, sal HCl y de TFA.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una gráfica que ilustra los resultados de los estudios de estabilidad al estrés en tres muestras diferentes de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, cada una con una composición diferente con respecto a las cantidades relativas de ácido trifluoroacético y sales de clorhidrato, así como la base libre. Las muestras analizadas incluyeron > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, triángulos), 94% de sal total (6% de base libre, cuadrados) y 52% de sal total (48% de base libre, círculos). Las muestras se almacenaron a 25 °C y 60% de humedad relativa; la gráfica ilustra la degradación del compuesto a lo largo del tiempo, como se describe en detalle en el ejemplo 3.
- La figura 2 es un gráfico que ilustra el aumento de irinotecán libre con el tiempo en muestras de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos almacenadas a 40 °C y 75% de humedad relativa, cada una con una composición diferente con respecto a las cantidades relativas de ácido trifluoroacético y sales de clorhidrato, así como base libre. Las muestras analizadas corresponden al producto que contiene > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y al producto que contiene 86% de sales totales (14% de base libre, diamantes), como se describe en el ejemplo 3.
- La figura 3 es un gráfico que ilustra el aumento en el tiempo en especies pequeñas de PEG (productos de degradación de PEG) en muestras de 4-brazo-PEG-Gly-Irino-20K almacenadas a 40 °C y 75% de humedad relativa, como se describe en detalle en el ejemplo 3. Las muestras analizadas corresponden al producto que contiene > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y el producto que contiene 86% de sales totales (14% de base libre, diamantes).
- La figura 4 es una compilación de superposiciones de cromatogramas que muestran la liberación de irinotecán mediante hidrólisis a partir de mono- (DS-1), di- (DS-2), tri- (DS-3) y tetra-irinotecán sustituido (DS-4) 4- brazo-PEG-Gly-Irino-20K como se describe en detalle en el ejemplo 5.
- La figura 5 es un gráfico que ilustra los resultados de la hidrólisis de diversas especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos como se describió anteriormente en una solución reguladora acuosa a pH 8.4 en presencia de carboxipeptidasa B porcina en comparación con los datos de modelación cinética de hidrólisis como se describe en el ejemplo 5. Para el modelo de cinética, se asumió que la hidrólisis de todas las especies es una cinética de primer orden. Se usó la constante de velocidad de reacción de primer orden para la desaparición de DS4 (0.36 hr⁻¹) para generar todas las curvas.
- La figura 6 es un gráfico que ilustra la hidrólisis de diversas especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos como se describió anteriormente en plasma humano en comparación con los datos de modelado de cinética de hidrólisis. Los detalles se proporcionan en el ejemplo 5. Para el modelo de cinética, se asumió que la hidrólisis de todas las especies es una cinética de primer orden. Se usó la constante de velocidad de reacción de primer orden para la desaparición de DS 4 (0.26 hr⁻¹) para generar todas las curvas.
- La figura 7 es un cromatograma que sigue la cromatografía de filtración en gel de un material preparado como se describe en el ejemplo 8.
- La figura 8 es un cromatograma que sigue la cromatografía de filtración en gel de un material preparado como se describe en el ejemplo 9.
- 35 Descripción detallada
- Diversos aspectos de la invención se describirán ahora más detalladamente a continuación.
- Se debe observar que, como se usa en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a un "polímero" incluye un solo polímero así como dos o más de los polímeros iguales o diferentes, la referencia a un "conjugado" se refiere a un solo conjugado así como dos o más de los mismos o diferentes conjugados, la referencia a un "excipiente" incluye un solo excipiente así como dos o más de los mismos o diferentes excipientes.
- 40
- En la descripción y reivindicación de la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se describen a continuación.
- 45 Un "grupo funcional" es un grupo que se puede usar, en condiciones normales de síntesis orgánica, para formar un enlace covalente entre la entidad a la que está unido y otra entidad, que normalmente lleva un grupo funcional adicional. El grupo funcional generalmente incluye enlace (es) múltiple (s) y/o heteroátomos. Los grupos funcionales preferidos se describen en este documento.
- 50 El término "reactivo" se refiere a un grupo funcional que reacciona fácilmente o a una velocidad práctica en condiciones convencionales de síntesis orgánica. Esto contrasta con aquellos grupos que ya sea no reaccionan o requieren catalizadores fuertes o condiciones de reacción poco prácticas para reaccionar (esto es, un grupo "no reactivo" o "inerte").
- Un "grupo protector" es una unidad estructural que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del

- tipo de grupo químicamente reactivo que se protege, así como las condiciones de reacción que se emplearán y la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula. Los grupos funcionales que se pueden proteger incluyen, de ejemplo, grupos de ácido carboxílico, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol y grupos carbonilo. Los grupos protectores representativos para ácidos carboxílicos incluyen ésteres (tales como un éster de p-metoxibencilo), amidas e hidrazidas; para grupos amino, carbamatos (tales como tert-butoxicarbonilo) y amidas; para grupos hidroxilo, éteres y ésteres; para grupos tiol, tioéteres y tioésteres; para grupos carbonilo, acetales y cetales. Tales grupos protectores son bien conocidos para los expertos en el arte y se describen, por ejemplo, en T.W. Greene y G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999, y en P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Third Ed., Thieme Chemistry, 2003, y las referencias citadas en el mismo.
- 5
- 10 Un grupo funcional en "forma protegida" se refiere a un grupo funcional que lleva un grupo protector. Como se usa en este documento, el término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo pretende abarcar formas protegidas del mismo.
- "PEG" o "poli(etilenglicol)" como se usa en este documento, pretende abarcar cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Por lo general, los PEG para uso en la presente invención comprenderán una de las dos estructuras siguientes: $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$, dependiendo de si el o los oxígeno(s) terminales se han o no han sido desplazados, por ejemplo, durante una transformación sintética. La variable (n) oscila de 3 a aproximadamente 3000, y los grupos de terminales y la arquitectura del PEG general pueden variar.
- 15
- Un polímero soluble en agua puede soportar uno o más "grupos protegidos en el extremo", (en cuyo caso se puede afirmar que el polímero soluble en agua está "protegido en el extremo". Con respecto a los grupos protegidos en el extremo, los grupos protegidos en el extremo de ejemplo son generalmente grupos que contienen carbono e hidrógeno, por lo general compuestos por 1-20 átomos de carbono y un átomo de oxígeno que está covalentemente unido al grupo. A este respecto, el grupo es por lo general alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi y benciloxi) y con respecto al grupo que contiene carbono puede ser opcionalmente saturado o insaturado, así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo y formas sustituidas de cualquiera de los anteriores.
- 20
- El grupo protegido en el extremo también puede comprender una etiqueta detectable. Cuando el polímero tiene un grupo protegido en el extremo que comprende una etiqueta detectable, la cantidad o ubicación del polímero y/o la unidad estructural (por ejemplo, el agente activo) al que está unido el polímero se puede determinar usando un detector apropiado. Tales etiquetas incluyen, sin limitación, fluorescentes, quimioluminiscentes, unidades estructurales usados en el marcaje de enzimas, colorimétricos (por ejemplo, colorantes), iones metálicos y unidades estructurales radiactivos.
- 25
- 30 "Soluble en agua", en el contexto de un polímero de la invención o un "segmento de polímero soluble en agua" es cualquier segmento o polímero que sea al menos 35% (en peso), preferiblemente mayor que 70% (por peso), y más preferiblemente más del 95% (en peso) soluble en agua a temperatura ambiente. Por lo general, un polímero o segmento soluble en agua transmitirá al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de la luz, transmitida por la misma solución después del filtrado.
- 35
- El término "activado", cuando se usa en la conjugación con un grupo funcional particular, se refiere a un grupo funcional reactivo que reacciona fácilmente con un electrófilo o nucleófilo en otra molécula. Esto contrasta con aquellos grupos que requieren bases fuertes o condiciones de reacción altamente poco prácticas para reaccionar (esto es, un grupo "no reactivo" o "inerte").
- 40
- "Electrófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tiene un centro electrófilo, esto es, un centro que busca electrones o es capaz de reaccionar con un nucleófilo.
- "Nucleófilo" se refiere a un ion o átomo o una colección neutra o iónica de átomos que tiene un centro nucleófilo, esto es, un centro que busca un centro electrófilo o que puede reaccionar con un electrófilo.
- 45
- Los términos "protegido" o "grupo que protege" o "grupo protector" se refieren a la presencia de una unidad estructural (esto es, el grupo protector) que evita o bloquea la reacción de un grupo funcional químicamente reactivo particular en una molécula bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege, así como las condiciones de reacción que se emplearán y la presencia de grupos reactivos o protectores adicionales en la molécula, si los hay. Los grupos protectores conocidos en la técnica se pueden encontrar en Greene, T.W., et al., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, NY (1999).
- 50
- "Masa molecular" en el contexto de un polímero soluble en agua tal como PEG, se refiere al peso molecular promedio en peso de un polímero, por lo general determinado por cromatografía de exclusión de tamaño, técnicas de dispersión de la luz o determinación de la viscosidad intrínseca en un solvente orgánico como 1,2,4-triclorobenceno.
- 55
- Los términos "espaciador" y "unidad estructural espaciadora" se usan en este documento para referirse a un átomo o una colección de átomos usados opcionalmente para unir unidades estructurales de interconexión tales como un

término de una serie de monómeros y un electrófilo. Las unidades estructurales espaciadoras de la invención pueden ser hidrolíticamente estables o pueden incluir un enlace fisiológicamente hidrolizable o enzimáticamente degradable.

5 Un enlace "hidrolizable" es un enlace relativamente lábil que reacciona con el agua (esto es, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los enlaces ilustrativos hidrolíticamente inestables incluyen éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.

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

10 Una unión o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico que es sustancialmente estable en agua, es decir, no se hidroliza en condiciones fisiológicas en un grado apreciable durante un período prolongado de tiempo. Los ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente: enlaces carbono-carbono (por ejemplo, en cadenas alifáticas), éteres, amidas y uretanos. En general, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que presenta una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente el 1-2% por día en condiciones fisiológicas. Las tasas de hidrólisis de enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de los libros de texto de química estándar.

15 "Multi-brazos" en referencia a la geometría o estructura global de un polímero se refiere a un polímero que tiene 3 o más "brazos" que contienen polímeros conectados a una molécula o estructura "núcleo". De este modo, un polímero multi-brazos puede poseer 3 brazos de polímero, 4 brazos de polímero, 5 brazos de polímero, 6 brazos de polímero, 20 7 brazos de polímero, 8 brazos de polímero o más, dependiendo de su configuración y estructura del núcleo. Un tipo particular de polímero multi-brazos es un polímero altamente ramificado denominado polímero dendrítico o polímero hiperramificado que tiene un núcleo iniciador de al menos 3 ramas, una multiplicidad de ramificación interior o 2 o más, una generación de 2 o más, y al menos 25 grupos de superficie dentro de una única molécula dendrítica. Para los fines en este documento, se considera que un dendrímero posee una estructura distinta de la de un polímero multi-brazos. Es decir, un polímero multi-brazos como se menciona en este documento excluye explícitamente los dendrímeros. Adicionalmente, un polímero multi brazos como se proporciona en este documento posee un núcleo no reticulado.

25 Un "dendrímero" o "polímero hiperramificado" es un polímero globular monodisperso de tamaño en el que todos los enlaces emergen radialmente desde un punto focal central o núcleo con un patrón de ramificación regular y con unidades repetidas que cada una contribuyen con un punto de ramificación. Los dendrímeros por lo general no se forman necesariamente mediante un procedimiento de fabricación de múltiples etapas a escala nanométrica. Cada etapa da como resultado una nueva "generación" que tiene dos o más veces la complejidad de la generación anterior. Los dendrímeros presentan ciertas propiedades de estado dendrítico, tal como la encapsulación del núcleo, lo que los hace únicos de otros tipos de polímeros.

30 "Punto de ramificación" se refiere a un punto de bifurcación que comprende uno o más átomos en el cual un polímero se separa o ramifica de una estructura lineal en uno o más brazos de polímero adicionales. Un polímero multi-brazos puede tener un punto de ramificación o puntos de ramificación múltiples, siempre que las ramificaciones no sean repeticiones regulares que den como resultado un dendrímero.

35 "Substantialmente" o "esencialmente" significa casi total o completamente, por ejemplo, el 95% o más de una cantidad dada.

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

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

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

50 Los "sustituyentes no interferentes" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, son por lo general no reactivos con otros grupos funcionales contenidos dentro de la molécula.

55 El término "sustituido" como en, por ejemplo, "alquilo sustituido", se refiere a una unidad estructural (por ejemplo, un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero no limitados a: cicloalquilo C₃-C₈, por ejemplo, ciclopropilo y ciclobutilo; halo, por ejemplo, flúor, cloro, bromo y yodo; ciano alcoxi, fenilo inferior; y fenilo sustituido. Para las sustituciones en un anillo de fenilo, los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (esto es, orto, meta o para).

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en el que R es alquilo o alquilo sustituido, preferiblemente alquilo C₁-C₂₀ (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, etc.), preferiblemente C₁-C₇.

5 Como se usa en este documento, "alqueno" se refiere a grupos hidrocarburo ramificados y no ramificados de 1 a 15 átomos de longitud, que contienen al menos un doble enlace, tal como etenilo (vinilo), 2-propen-1-il (alilo), isopropenilo, y 3-buten-1-ilo.

El término "alquino", como se usa en este documento, se refiere a grupos hidrocarburo ramificados y no ramificados de 2 a 15 átomos de longitud, que contienen al menos un enlace triple, tal como etinilo, 1-propinilo, 3-butin-1-ilo, 1-octin-1-ilo, y así sucesivamente.

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

"Fenilo sustituido" y "arilo sustituido" indican un grupo fenilo y un grupo arilo, respectivamente, sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, o 1-5 sustituyentes) elegidos entre halo (F, Cl, Br, I), hidroxilo, ciano, nitro, alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆), benciloxi, carboxi, arilo, y así sucesivamente.

15 Un ácido inorgánico es un ácido que está ausente de átomos de carbono. Los ejemplos incluyen ácidos hidrogenados, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

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

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

25 El "agente activo", como se usa en este documento, incluye cualquier agente, fármaco o compuesto, que proporciona algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que se puede demostrar in vivo o in vitro. Como se usa en este documento, estos términos incluyen además cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que produce un efecto localizado o sistémico en un paciente. Como se usa en este documento, especialmente en referencia a los enfoques sintéticos descritos en este documento, un "agente activo" pretende abarcar versiones derivadas o modificadas con un enlazante de los mismos, de manera que tras la administración in vivo, se libera la molécula "bioactiva" original.

30 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se refieren a un excipiente que se puede incluir en una composición que comprende un agente activo y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.

35 "Cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad fisiológicamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan de manera intercambiable en este documento para significar la cantidad de un agente activo presente en una preparación farmacéutica que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente activo y/o conjugado en el torrente sanguíneo o en un tejido o sitio diana en el cuerpo. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes prevista y las consideraciones del paciente, y puede ser determinado fácilmente por un experto en el arte, en base a la información proporcionado en este documento y disponible en la literatura relevante.

40 "Multifuncional" en el contexto de un polímero significa un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales, donde los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes, y están por lo general presentes en los términos del polímero. Los polímeros multifuncionales por lo general contendrán desde aproximadamente 3-100 grupos funcionales, o desde 3-50 grupos funcionales, o desde 3-25 grupos funcionales, o desde 3-15 grupos funcionales, o de 3-10 grupos funcionales, esto es, contienen 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos funcionales.

45 "Difuncional" y "bifuncional" se usan de manera intercambiable en este documento y significa una entidad tal como un polímero que tiene dos grupos funcionales contenidos en el mismo, por lo general en los extremos del polímero. Cuando los grupos funcionales son los mismos, se dice que la entidad es homodifuncional u homobifuncional. Cuando los grupos funcionales son diferentes, se dice que la entidad es heterodifuncional o heterobifuncional.

50 Un reactivo básico o ácido descrito en este documento incluye neutro, cargado y cualquier forma de sal correspondiente de los mismos.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan de manera intercambiable en este documento y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, roedores, simios, humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas. Tales sujetos por lo general sufren o son

propensos a una afección que se puede prevenir o tratar mediante la administración de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo como se describe en este documento.

El término "aproximadamente", en particular en referencia a una cantidad dada, pretende abarcar desviaciones de más o menos cinco por ciento.

5 "Tratamiento" y "que trata" una afección particular incluyen: (1) prevención de tal afección, esto es, hacer que la afección no se desarrolle, u ocurra con menos intensidad o en menor grado en un sujeto que puede ser expuesto o predispuesto a la condición pero aún no experimenta o muestra la afección, y (2) inhibición de la afección, esto es, detener el desarrollo o revertir la afección.

10 "Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia posteriormente descrita puede, pero no necesariamente, que la descripción incluya los casos donde se produce la circunstancia y los casos en los que no.

Una "molécula pequeña" es un compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que tiene por lo general un peso molecular menor que aproximadamente 1000, preferiblemente menor que aproximadamente 800 dalton. Las moléculas pequeñas a las que se hace referencia en este documento abarcan oligopéptidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1000.

15 Un "péptido" es una molécula compuesta desde aproximadamente 13 a 50 o más aminoácidos. Un oligopéptido por lo general contiene desde aproximadamente 2 a 12 aminoácido

20 A menos que se indique explícitamente lo contrario, los términos "sal mixta parcial" y "sal mezclada", como se usan en este documento, se usan indistintamente, y, en el caso de un conjugado de polímero (y las composiciones correspondientes que comprenden una pluralidad de tales conjugados de polímeros), se refiere a conjugados y composiciones que comprenden uno o más grupos amino básicos (u otros que contienen nitrógeno básico), donde (i) cualquiera de los grupos amino básicos en el conjugado o la composición del conjugado es ya sea no protonado o protonado y (ii) con respecto a cualquier grupo amino básico protonado dado, el grupo amino básico protonado tendrá uno de dos contraiones diferentes. (El término "sal mixta parcial" se refiere a la característica donde no todos los grupos amino en el compuesto o composición están protonados, por consiguiente, la composición es una sal "parcial", mientras que "mixta" se refiere a la característica de contraiones múltiples). Una sal mixta como se proporciona en este documento abarca hidratos, solvatos, formas amorfas, formas cristalinas, polimorfos e isómeros.

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

30 Un grupo amina que está en "forma protonada" existe como una amina protonada, de modo que el grupo amino está cargado positivamente. Como se usa en este documento, un grupo amina que está protonado también puede estar en forma de una sal de adición de ácido resultante de la reacción de la amina con un ácido tal como un ácido inorgánico o un ácido orgánico.

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

Como se usa en este documento, "psi" significa libras por pulgada cuadrada.

40 Descripción general: conjugados de sales mixtas, métodos de alcoxilación y composiciones de conjugados (y formas de sales mixtas de los mismos) preparadas a partir de los reactivos poliméricos preparados a partir de productos poliméricos que usan los métodos de alcoxilación

45 Sales mixtas: como se indicó anteriormente, en uno o más aspectos de la invención, se proporciona un polímero soluble en agua y un conjugado de agente activo, en el que el conjugado está en forma de una sal mixta. Tales conjugados representan nuevas formas de estado sólido y se basan al menos en parte en el descubrimiento de que, a pesar del tratamiento con bases en su formación, los conjugados precipitan como sales mixtas. Además, se ha descubierto que los conjugados se pueden producir de manera confiable y reproducible como sales mixtas, donde cualquier átomo de nitrógeno básico dado dentro del conjugado (y dentro del componente de agente activo del conjugado) está presente en una de una variedad de formas. Específicamente, los conjugados proporcionados en este documento poseen átomos de nitrógeno básicos de agente activo, por ejemplo, grupos amino, cada uno de los cuales será ya sea protonado o no protonado, donde cualquier grupo amino protonado dado es una sal de ácido que posee uno de los dos aniones diferentes. Además, se ha descubierto que la forma de sal mixta del conjugado tiene varias características inesperadas y ventajosas (esto es, mayor estabilidad contra la degradación del esqueleto del polímero, mayor estabilidad hidrolítica, etc.) cuando se compara con las correspondientes formas de sal de base libre o de ácido simple del conjugado.

55 Métodos de alcoxilación: en este documento también se describe un método que comprende la etapa de alcoxilación en un solvente apropiado un oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado para formar un producto

5 polimérico alcoxilado, en el que el oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado tiene un peso molecular promedio en peso conocido y definido de mayor que 300 Dalton (por ejemplo, mayor que 500 Dalton). Entre otras ventajas, los métodos de alcoxilación descritos en este documento dan como resultado productos poliméricos que son superiores (por ejemplo, en términos de consistencia y pureza) que los productos poliméricos preparados por métodos previamente conocidos. Un polímero formado por los métodos de alcoxilación descritos puede usarse ventajosamente para preparar una sal de ácido mixta como se describe en este documento.

Composiciones de conjugados (y formas de sales mixtas de los mismos) preparadas a partir de los reactivos poliméricos preparados a partir de productos poliméricos usando los métodos de alcoxilación:

10 En este documento se describe una sal mixta de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo, en el que el conjugado se prepara mediante el acoplamiento (en condiciones de conjugación) de un agente activo que contiene amina (por ejemplo, una glicina-iriotecán desprotegida) a un reactivo polimérico (por ejemplo, pentaeritritolil-poli(etilenglicol)-carboximetil succinimida de 4 brazos) en presencia de una base para formar un conjugado, en el que el conjugado es un conjugado de sal mixta (por ejemplo, el conjugado posee átomos de nitrógeno, cada uno de los cuales estarán ya sea protonados o no protonados, donde cualquier grupo amino protonado dado es una sal de ácido que posee uno de los dos aniones diferentes), y además, en el que, 15 opcionalmente, el reactivo polimérico se prepara a partir de un producto de alcoxilación preparado como se describe en este documento.

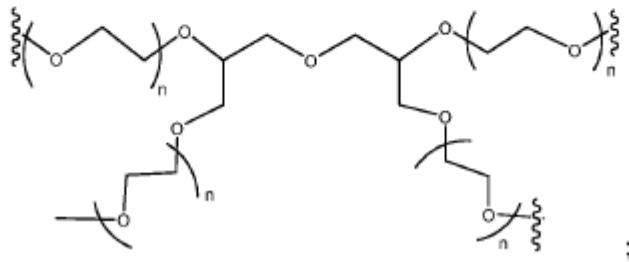
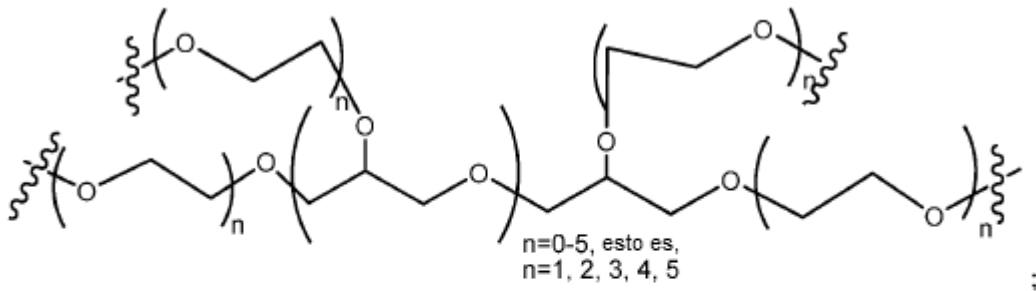
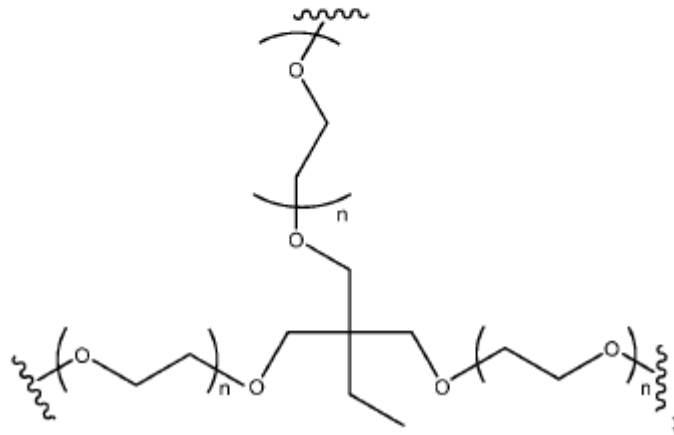
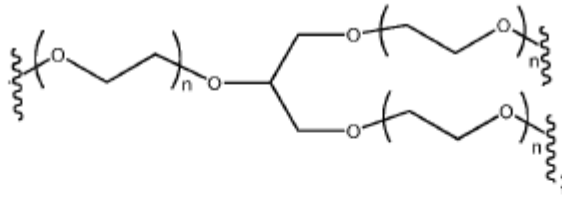
Conjugados - El polímero en general

20 Los conjugados de polímero soluble en agua-agente activo (independientemente de la forma específica tomada, por ejemplo, una forma de base, una forma de sal, una sal mixta, etc.) incluyen un polímero soluble en agua. Por lo general, para formar un conjugado, un polímero soluble en agua, en forma del reactivo polimérico, se acopla (en condiciones de conjugación) a un agente activo en un electrófilo o nucleófilo contenido dentro del agente activo. Por ejemplo, un polímero soluble en agua (de nuevo, en forma del reactivo polimérico que lleva, por ejemplo, un éster activado) se puede acoplar a un agente activo que posee uno o más grupos de amina básicos (u otros átomos de nitrógeno básicos), esto es, una amina que tiene un pK de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 11.5 (determinado después de la conjugación). 25

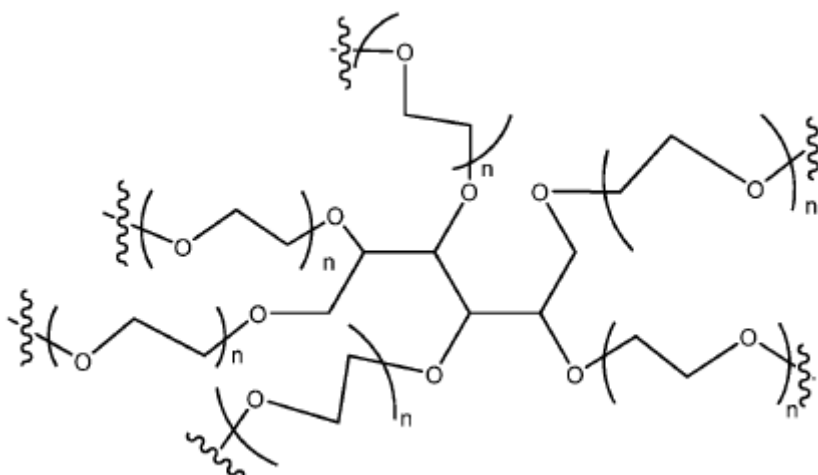
El componente de polímero soluble en agua del conjugado es por lo general un polímero soluble en agua y no peptídico. Los polímeros representativos incluyen poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacárido), poli(ácido α -hidroxi), poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrililmorfolina), o copolímeros o terpolímeros de los mismos. Un polímero soluble en agua particular es polietilenglicol o PEG que comprende la unidad de repetición $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, donde n oscila de aproximadamente 3 a aproximadamente 2700 o incluso mayor, o preferiblemente desde aproximadamente 25 a aproximadamente 1300. Por lo general, el peso molecular promedio en peso del polímero soluble en agua en la sal de ácido mixta parcial oscila de aproximadamente 100 dalton a aproximadamente 150,000 dalton. Los pesos moleculares globales ilustrativos para el conjugado pueden variar desde aproximadamente 800 a aproximadamente 80,000 dalton, o desde aproximadamente 900 a aproximadamente 70,000 dalton. Los intervalos de pesos moleculares representativos adicionales son desde aproximadamente 1,000 a aproximadamente 40,000 dalton, o desde aproximadamente 5,000 a aproximadamente 30,000 dalton, o desde aproximadamente 7500 dalton a aproximadamente 25,000 dalton, o incluso desde aproximadamente 20,000 a aproximadamente 80,000 dalton para realizaciones de mayor peso molecular de las sales parciales mixtas instantáneas. 30 35 40

El polímero soluble en agua puede estar en cualquiera de varias geometrías o formas, incluyendo lineales, ramificadas, bifurcadas. El polímero puede ser lineal o multi-brazo. Los polímeros solubles en agua se pueden obtener comercialmente como simplemente el polímero soluble en agua. Además, los polímeros solubles en agua se pueden obtener convenientemente en una forma activada como un reactivo polimérico (que opcionalmente se puede acoplar a un agente activo sin modificación o activación adicional). Las descripciones de los polímeros solubles en agua y los reactivos poliméricos se pueden encontrar en Nektar Advanced PEGylation Catalog, 2005-2006, "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation" y están disponibles para su compra en NOF Corporation and JenKem Technology USA, entre otros. 45

50 Un polímero ramificado de ejemplo que tiene dos brazos de polímero en un patrón ramificado es el siguiente, a menudo denominado PEG-2 o mPEG-2:



y



En una realización ejemplificada, el polímero soluble en agua es un polímero de 4 brazos como se muestra arriba, donde n puede variar desde aproximadamente 20 a aproximadamente 500, o desde aproximadamente 40 a aproximadamente 500.

- 5 En las realizaciones de multi-brazos descritas en este documento, cada brazo de polímero tiene por lo general un peso molecular que corresponde a uno de los siguientes: 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, 12,000, 15,000, 17,500, 18,000, 19,000, 20,000 Dalton o más. Los pesos moleculares generales para las configuraciones de polímeros multi-brazos descritos en este documento (esto es, el peso molecular del polímero multi-brazos en su conjunto) generalmente corresponden a uno de los siguientes: 800, 1000, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200, 3600, 4000, 5000, 6000, 8000, 10,000, 12,000, 15,000, 16,000, 20,000, 24,000, 25,000, 28,000, 30,000, 32,000, 36,000, 40,000, 45,000, 48,000, 50,000, 60,000, 80,000 o 100,000 o más.

El polímero soluble en agua, por ejemplo, PEG, puede estar unido covalentemente al agente activo a través de un enlazante intermedio. El enlazante puede contener cualquier número de átomos. En términos generales, el enlazante tiene una longitud de átomo que satisface uno o más de los siguientes intervalos: desde aproximadamente 1 átomo a aproximadamente 25 átomos; desde aproximadamente 3 átomos a aproximadamente 12 átomos; desde aproximadamente 6 átomos a aproximadamente 12 átomos; y desde aproximadamente 8 átomos a aproximadamente 12 átomos. Cuando se considera la longitud de la cadena de átomos, solo se consideran los átomos que contribuyen a la distancia total. Por ejemplo, se considera que un enlazante que tiene la estructura, - $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-C}(\text{O})\text{-O}$ - tiene una longitud de cadena de 11 átomos, ya que no se considera que los sustituyentes contribuyan significativamente a la longitud del enlazante. Los enlazantes ilustrativos incluyen compuestos bifuncionales tales como aminoácidos (por ejemplo, alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, serina, cisteína, sarcosina, valina y lisina). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o un aminoácido de origen no natural. Los enlazantes apropiados también incluyen oligopéptidos.

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

Nuevo método de alcoxilación para composiciones de polímeros mejoradas

Como se indicó anteriormente, los polímeros solubles en agua que tienen utilidad en (por ejemplo) la preparación de conjugados con agentes activos (así como las formas de sal y sales mixtas de los mismos) se pueden obtener comercialmente. Sin embargo, como se describe en este documento con más detalle, se proporcionan métodos de preparación polímeros solubles en agua, métodos que distinguen los métodos descritos anteriormente de preparación de polímeros solubles en agua, que son particularmente apropiados para preparar conjugados con agentes activos (así como formas de sal y sales mixtas de los mismos).

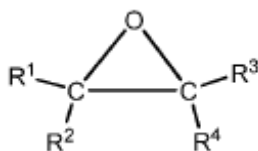
40 A este respecto, se describe un método, el método que comprende la etapa de alcoxilación en un solvente apropiado un oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado para formar un producto polimérico alcoxilado, en el que el oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado tiene un peso molecular promedio en peso conocido y definido de más de 300 Dalton (por ejemplo, mayor que 500 Dalton).

La etapa de alcoxilación en el nuevo método de alcoxilación

La etapa de alcoxilación se lleva a cabo usando condiciones de alcoxilación, de manera que la adición secuencial de monómeros se efectúa a través de reacciones repetidas de un compuesto de oxirano. Cuando el oligómero que se puede alcoxilar tiene inicialmente uno o más grupos funcionales hidroxilo, uno o más de estos grupos hidroxilo en el oligómero que se puede alcoxilar se convertirán en un alcóxido reactivo por reacción con una base fuerte. Luego, un compuesto de oxirano reacciona con un grupo funcional que se puede alcoxilar (por ejemplo, un alcóxido reactivo), por lo que no solo se añade al alcóxido reactivo, sino que lo hace de una manera que también termina en otro alcóxido reactivo. Después de esto, las reacciones repetidas de un compuesto de oxirano en el extremo alcóxido reactivo del compuesto de oxirano añadido y reaccionado previamente producen efectivamente una cadena de polímero.

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

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



en el que (con respecto a esta estructura):

R¹ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando alquilo);

R² se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando alquilo);

R³ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando alquilo); y

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo (preferiblemente alquilo inferior cuando alquilo).

Con respecto a la fórmula del compuesto de oxirano anterior, se prefiere particularmente que cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ sea H, y se prefiere que solo uno de R¹, R², R³ y R⁴ sea alquilo (por ejemplo, metilo y etilo) y los sustituyentes restantes son H. Los compuestos de oxirano de ejemplo son óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de 1,2-butileno. La cantidad de compuesto de oxirano añadida para dar como resultado condiciones óptimas de alcoxilación depende de una serie de factores, que incluyen la cantidad de oligómero que se puede alcoxilar de partida, el tamaño deseado del material polimérico alcoxilado resultante y el número de grupos funcionales que se pueden alcoxilar en el oligómero que se puede alcoxilar. De este modo, cuando se desea un material polimérico alcoxilado más grande, relativamente más compuesto de oxirano está presente en las condiciones de alcoxilación. De manera similar, si (Oa) representa la cantidad de compuesto de oxirano necesaria para alcanzar un tamaño dado de "crecimiento" del polímero en un solo grupo funcional que se puede alcoxilar, entonces un oligómero que se puede alcoxilar que lleva dos grupos funcionales que se pueden alcoxilar requiere 2x (Oa), un oligómero que se puede alcoxilar que lleva tres grupos funcionales que se pueden alcoxilar requieren 3x (Oa), un oligómero que se puede alcoxilar que lleva cuatro grupos funcionales que se pueden alcoxilar requiere 4x (Oa) y así sucesivamente. En todos los casos, un experto en el arte puede determinar una cantidad apropiada de compuesto de oxirano requerida para las condiciones de alcoxilación teniendo en cuenta el peso molecular deseado del material polimérico alcoxilado y siguiendo la experimentación rutinaria.

Las condiciones de alcoxilación incluyen la presencia de una base fuerte. El propósito de la base fuerte es desprotonar cada hidrógeno ácido (por ejemplo, el hidrógeno de un grupo hidroxilo) presente en el oligómero que se puede alcoxilar y formar una especie iónica alcóxido (o una especie iónica para grupos funcionales que se pueden alcoxilar no hidroxilo). Las bases fuertes preferidas para uso como parte de las condiciones de alcoxilación son: metales alcalinos, tales como potasio metálico, sodio metálico y mezclas de metales alcalinos, tales como aleaciones de sodio-potasio; hidróxidos, tales como NaOH y KOH; y alcóxidos (por ejemplo, presentes después de la adición de un compuesto de oxirano). Se pueden usar otras bases fuertes y las puede identificar por un experto en el arte. Por ejemplo, una base dada se puede usar como una base fuerte en este documento si la base fuerte puede formar una especie iónica alcóxido (o una especie iónica para grupos funcionales que se pueden alcoxilar no hidroxilo) y también proporciona un catión que no entorpece las especies iónicas alcóxido, como para dificultar (o efectivamente dificultar a través de una reacción poco práctica) la reacción de las especies iónicas de alcóxido con la molécula de oxirano. La base fuerte está presente en una cantidad generalmente pequeña y calculada, cuya cantidad puede caer en uno o más de los siguientes intervalos: desde 0.001 a 10.0 por ciento en peso basado en el

peso de la mezcla de reacción total; y desde 0.01 a aproximadamente 6.0 por ciento en peso basado en el peso de la mezcla de reacción total.

5 Las condiciones de alcoxilación incluyen una temperatura apropiada para que se produzca la alcoxilación. Las temperaturas de ejemplo que pueden ser apropiadas para que se produzca la alcoxilación incluyen aquellas que caen en uno o más de los siguientes intervalos: desde 10°C a 260°C; desde 20°C a 240°C; desde 30°C a 220°C; desde 40°C a 200°C; desde 50°C a 200°C; desde 80°C a 140°C; y desde 100°C a 120°C.

10 Las condiciones de alcoxilación incluyen una presión apropiada para que se produzca la alcoxilación. Las presiones de ejemplo que pueden ser apropiadas para que ocurra la alcoxilación incluyen aquellas que caen en uno o más de los siguientes intervalos: desde 10 psi a 1000 psi; desde 15 psi a 500 psi; desde 20 psi a 250 psi; desde 25 psi a 100 psi. Además, la presión de alcoxilación puede ser aproximadamente la presión atmosférica a nivel del mar (por ejemplo, 14.696 libras por pulgada cuadrada +/- 10%).

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

15 Las condiciones de alcoxilación pueden incluir el uso de un solvente apropiado. De manera óptima, el sistema en el que se producen las condiciones de alcoxilación no incluirá ningún componente (incluido ningún solvente) que se pueda desprotonar (o que permanezca sustancialmente protonado en las condiciones de pH, temperatura, y así sucesivamente, bajo las cuales se producirán las condiciones de alcoxilación). Los solventes apropiados para la alcoxilación incluyen solventes orgánicos seleccionados del grupo que consiste en tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), tolueno, benceno, xilenos, mesitileno, tetracloroetileno, anisol, dimetilacetamida y mezclas
20 de los anteriores. Los solventes menos ideales (pero aun así contemplados) para uso como parte de las condiciones de alcoxilación son acetonitrilo, fenilacetoneitrilo y acetato de etilo; en algunos casos, las condiciones de alcoxilación no incluirán como un solvente cualquiera de acetonitrilo, fenilacetoneitrilo y acetato de etilo.

25 Cuando las condiciones de alcoxilación se llevan a cabo en la fase líquida, las condiciones de alcoxilación se llevan a cabo de manera que tanto el oligómero que se puede alcoxilar como el material polimérico alcoxilado deseado formado a partir de la alcoxilación del oligómero que se puede alcoxilar no solo tengan solubilidades similares (y, preferiblemente, sustancialmente la misma solubilidad) en el solvente apropiado usado, pero también son sustancialmente solubles en el solvente apropiado. Por ejemplo, el oligómero que se puede alcoxilar será sustancialmente soluble en el solvente usado en las condiciones de alcoxilación y el material polimérico alcoxilado resultante también será sustancialmente soluble en las condiciones de alcoxilación.

30 Esta solubilidad sustancialmente igual del oligómero alcoxilado y el material polimérico alcoxilado en un solvente apropiado contrasta con la solubilidad de una molécula precursora (usada, por ejemplo, en la preparación del oligómero alcoxilado previamente aislado) en el solvente apropiado, en el que la molécula precursora puede tener una solubilidad más baja (e incluso sustancialmente más baja) en el solvente apropiado que el oligómero alcoxilado y/o el material polimérico alcoxilado. Solo de ejemplo, tanto el oligómero alcoxilado como el material polimérico
35 alcoxilado tendrán un núcleo de pentaeritritol y ambos serán sustancialmente solubles en tolueno, pero el propio pentaeritritol tiene una solubilidad limitada en tolueno.

40 Se prefiere particularmente que el solvente empleado en las condiciones de alcoxilación sea tolueno. La cantidad de tolueno usada para la reacción es mayor del 25% en peso y menor que 75% en peso de la mezcla de reacción, en base al peso de la mezcla de reacción después de completar la adición del compuesto de oxirano. Un experto en el arte puede calcular la cantidad de partida del solvente teniendo en cuenta el peso molecular deseado del polímero, el número de sitios para los cuales tendrá lugar la alcoxilación, el peso del oligómero que se puede alcoxilar usado, y así sucesivamente.

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

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

50 Las condiciones de alcoxilación tienen lugar en un recipiente de reacción apropiado, por lo general un recipiente de reactor de acero inoxidable.

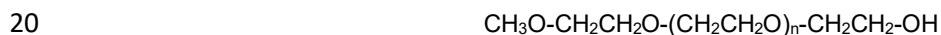
La molécula oligómera y/o precursora que se puede alcoxilar carece de un grupo isocianato unido a un carbono que porta un hidrógeno alfa que es aceptable. El oligómero que se puede alcoxilar y/o la molécula precursora previamente preparados carecen de un grupo isocianato.

El oligómero que se puede alcoxilar en el nuevo método de alcoxilación

El oligómero que se puede alcoxilar usado en el nuevo método de alcoxilación debe tener al menos un grupo funcional que se puede alcoxilar. El oligómero que se puede alcoxilar, sin embargo, puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más grupos funcionales que se pueden alcoxilar, con una preferencia por un oligómero que se puede alcoxilar que tiene desde uno a seis grupos funcionales que se pueden alcoxilar.

5 Como se ha indicado anteriormente, cada grupo funcional que se puede alcoxilar dentro del oligómero que se puede alcoxilar se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, ácido carboxílico, amina, tior, aldehído, cetona, y nitrilo. En aquellos casos en que hay más de un grupo funcional que se puede alcoxilar dentro del oligómero que se puede alcoxilar, es típico que cada grupo funcional que se puede alcoxilar sea el mismo (por ejemplo, cada grupo funcional que se puede alcoxilar dentro del oligómero que se puede alcoxilar es hidroxilo), aunque existen casos de diferentes grupos funcionales que se pueden alcoxilar dentro del mismo oligómero que se puede alcoxilar se contemplan también. Cuando el grupo funcional que se puede alcoxilar es hidroxilo, se prefiere que el hidroxilo sea un hidroxilo primario.

15 El oligómero que se puede alcoxilar puede tomar cualquiera de una serie de posibles geometrías. Por ejemplo, el oligómero que se puede alcoxilar puede ser lineal. En un ejemplo de un oligómero que se puede alcoxilar lineal, un extremo del oligómero que se puede alcoxilar lineal es un grupo funcional relativamente inerte (por ejemplo, un grupo protegido en el extremo) y el otro extremo es un grupo funcional que se puede alcoxilar (por ejemplo, hidroxilo). Un oligómero que se puede alcoxilar de ejemplo de esta estructura es metoxi-PEG-OH, o mPEG en breve, en el que un extremo es el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se da a continuación.



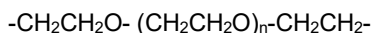
(en el que, solo para la estructura inmediatamente anterior, n es un número entero desde 13 a 100).

Otro ejemplo de una geometría lineal para la cual puede tomar el oligómero que se puede alcoxilar es un polímero orgánico lineal que lleva grupos funcionales que se pueden alcoxilar (ya sea iguales o diferentes) en cada extremo. Un oligómero que se puede alcoxilar de ejemplo de esta estructura es alfa-, omega-dihidroxiipoli(etilenglicol), o



(en el que, solo para la estructura inmediatamente anterior, n es un número entero de 13 a 100),

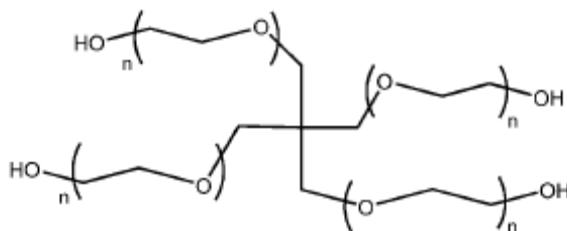
que se puede representar en forma breve como HO-PEG-OH donde se entiende que el símbolo -PEG representa la siguiente unidad estructural:



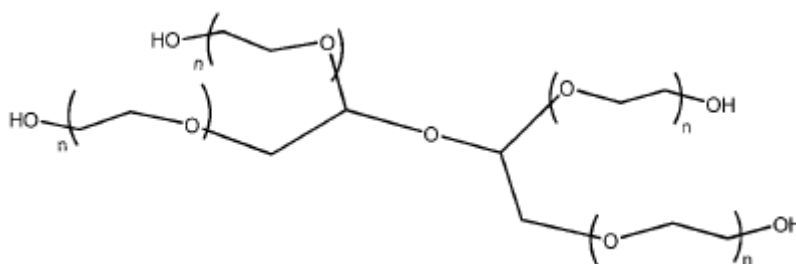
30 (en el que, solo para la estructura inmediatamente anterior, n es un número entero de 13 a 100),

Otra geometría para la cual puede tener el oligómero que se puede alcoxilar es una estructura "multi-brazos" o ramificada. Con respecto a tales estructuras ramificadas, uno o más átomos en el oligómero que se puede alcoxilar sirve como un "átomo de punto de ramificación", a través del cual dos, tres, cuatro o más (pero por lo general dos, tres o cuatro) conjuntos distintos de monómeros o "brazos" repetidos están conectados (ya sea directamente o a través de uno o más átomos). Como mínimo, una estructura de "multi-brazos" como se usa en este documento tiene tres o más brazos distintos, pero puede tener hasta cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más brazos, siendo preferidas las estructuras multi-brazos de 4 a 8 brazos (tal como una estructura de 4 brazos, una estructura de 5 brazos, una estructura de 6 brazos y una estructura de 8 brazos).

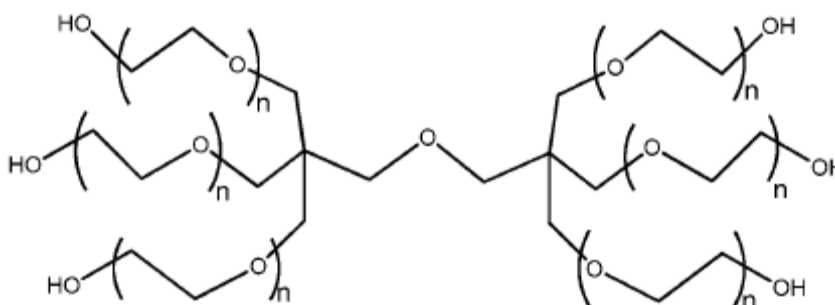
A continuación se proporcionan estructuras de multi-brazos de ejemplo para el oligómero que se puede alcoxilar:



en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n es desde 1 a 50, por ejemplo, desde 10 a 50, (o se define de otra manera tal que el peso molecular de la estructura es desde 300 Dalton a 9,000 Dalton (por ejemplo, desde aproximadamente 500 Dalton a 5,000 Dalton);

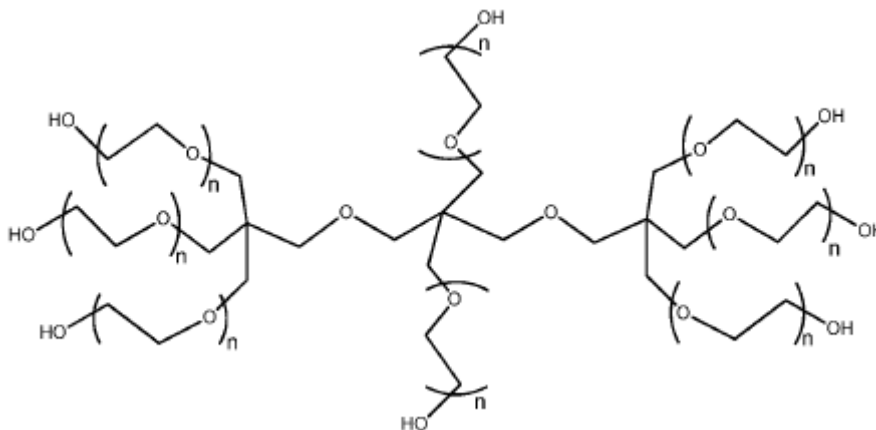


en la que (solo para la estructura inmediatamente precedente) el valor promedio de n es desde 2 a 50, por ejemplo, desde 10 a 50 (o se define de otra manera tal que el peso molecular de la estructura es desde 300 Dalton a 9,000 Dalton (por ejemplo, desde aproximadamente 500 Dalton a 5,000 Dalton);



5

en el que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n es desde 2 a 35, por ejemplo, desde 8 a aproximadamente 40 (o se define de otra manera tal que el peso molecular de la estructura es desde 750 Dalton a 9,500 Dalton (por ejemplo, desde 500 Dalton a 5,000 Dalton); y



10 en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n es de 2 a 35, por ejemplo, de 5 a 35, (o se define de otra manera tal que el peso molecular de la estructura es desde 1.000 Dalton a 13,000 Dalton (por ejemplo, desde 500 Dalton a 5,000 Dalton).

15 Para cada una de las cuatro estructuras inmediatamente anteriores, se prefiere que el valor de n, en cada caso, sea sustancialmente el mismo. De este modo, se prefiere que cuando se consideran todos los valores de n para un oligómero que se puede alcoxilar dado, todos los valores de n para ese oligómero que se puede alcoxilar estén dentro de tres desviaciones estándar, más preferiblemente dentro de dos desviaciones estándar, y aún más preferiblemente dentro de una desviación estándar.

20 En términos del peso molecular del oligómero que se puede alcoxilar, el oligómero que se puede alcoxilar tendrá un peso molecular promedio en peso conocido y definido. Para uso en este documento, un peso molecular promedio en peso solo se puede conocer y definir para un oligómero que se puede alcoxilar cuando el oligómero que se puede alcoxilar se aísla del medio sintético a partir del cual se generó. Los pesos moleculares promedio en peso de ejemplo para el oligómero que se puede alcoxilar caerán en uno o más de los siguientes intervalos: mayor de 300 Dalton; mayor de 500 Dalton; desde 300 Dalton a 15,000 Dalton; desde 500 Dalton a 5,000 Dalton; desde 300 Dalton a 10,000 Dalton; desde 500 Dalton a 4,000 Dalton; desde 300 Dalton a 5,000 Dalton; desde 500 Dalton a

3,000 Dalton; desde 300 Dalton a 2,000 Dalton; desde 500 Dalton a 2,000 Dalton; desde 300 Dalton a 1.000 Dalton; desde 500 Dalton a 1.000 Dalton; desde 1.000 Dalton a 10,000 Dalton; desde 1.000 Dalton a 5,000 Dalton; desde 1.000 Dalton a 4,000 Dalton; desde 1.000 Dalton a 3,000 Dalton; desde 1.000 Dalton a 2,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 15,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 5,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 10,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 4,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 3,000 Dalton; desde 1,500 Dalton a 2,000 Dalton; desde 2,000 Dalton a 5,000 Dalton; desde 2,000 Dalton a 4,000 Dalton; y desde 2,000 Dalton a 3,000 Dalton.

El oligómero que se puede alcoxilar preferiblemente se aísla previamente. Por aislado previamente se entiende que el oligómero que se puede alcoxilar existe en el exterior y se separa del medio sintético a partir del cual se generó (más por lo general fuera de las condiciones de alcoxilación usadas para preparar el oligómero que se puede alcoxilar) y se puede almacenar opcionalmente durante un período de tiempo relativamente largo u opcionalmente almacenar en un tiempo más corto sin cambiar sustancialmente para su uso posterior. De este modo, un oligómero que se puede alcoxilar se aísla previamente si, por ejemplo, está alojado en un entorno inerte. A este respecto, un oligómero alcoxilado previamente aislado se puede alojar en un recipiente que carece sustancialmente (por ejemplo, menos de 0.1% en peso) de un compuesto de oxirano. También, un oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado no cambia su peso molecular más del 10% en el transcurso de 15 días. De este modo, el concepto de "previamente aislado" contrasta con (por ejemplo) una situación en la que se permite que una reacción de alcoxilación continua e ininterrumpida pase de una molécula precursora a una estructura que corresponde a un oligómero que se puede alcoxilar, a una estructura que corresponde a una material polimérico alcoxilado; el concepto de "previamente aislado" requiere que el oligómero que se puede alcoxilar exista aparte de las condiciones a partir de las cuales se formó. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, el oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado se someterá a una etapa de alcoxilación una vez que se añade, como una etapa separada, a las condiciones de alcoxilación.

Fuentes del oligómero que se puede alcoxilar en el nuevo método de alcoxilación

El oligómero que se puede alcoxilar se puede obtener por medios sintéticos. A este respecto, el oligómero que se puede alcoxilar se prepara por (a) alcoxilación de una molécula precursora que tiene un peso molecular de menos de 300 Dalton (por ejemplo, menos de 500 Dalton) para formar una mezcla de reacción que comprende un oligómero o prepolímero que se puede alcoxilar, y (b) aislamiento del oligómero que se puede alcoxilar de la mezcla de reacción. La etapa de alcoxilación de la molécula precursora sigue en gran medida las condiciones y los requisitos de la etapa de alcoxilación previamente discutida. La etapa de aislamiento del oligómero que se puede alcoxilar se puede llevar a cabo usando cualquier etapa conocida en la técnica, pero puede incluir permitir que todo el compuesto de oxirano se consuma en la reacción, realizando activamente una etapa de apagado, separando la mezcla de reacción final mediante enfoques conocidos en la técnica (incluidos, por ejemplo, destilación de todos los materiales volátiles, eliminación del subproducto de la reacción sólida por filtración o lavado y empleando medios cromatográficos).

Además, el oligómero que se puede alcoxilar se puede obtener de fuentes comerciales. Las fuentes comerciales de ejemplo incluyen NOF Corporation (Tokio, Japón), que proporciona oligómeros que se pueden alcoxilar con los nombres poli(etilenglicol) SUNBRIGHT DKH®, glicerina SUNBRIGHT® GL, tri-poli(etilenglicol) éter, pentaeritritol SUNBRIGHT PTE®, tetra-poli(etilenglicol) éter, di-glicerina SUNBRIGHT® DG, tetra-poli(etilenglicol) éter, y hexa-glicerina SUNBRIGHT HGEO®, octa-poli(etilenglicol) éter. Los oligómeros alcoxilables preferidos incluyen aquellos que tienen las estructuras de pentaeritritol SUNBRIGHT PTE®-2000, tetra-poli(etilenglicol) éter (que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2,000 Dalton) y di-glicerina SUNBRIGHT® DG-2000, tetra-poli(etilenglicol) éter (que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2,000 Dalton).

Las moléculas precursoras pueden ser cualquier molécula pequeña (por ejemplo, un peso molecular menor que el peso molecular promedio en peso del oligómero que se puede alcoxilar) que tiene uno o más grupos funcionales que se pueden alcoxilar.

Las moléculas precursoras de ejemplo incluyen polioles, que son moléculas pequeñas (por lo general de un peso molecular inferior a 300 Dalton, por ejemplo, inferior a 500 Dalton) que tienen una pluralidad de grupos hidroxilo disponibles. Dependiendo del número deseado de brazos de polímero en el oligómero o prepolímero que se puede alcoxilar, el poliol que sirve como molécula precursora por lo general comprenderá de 3 a aproximadamente 25 grupos hidroxilo, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 22 grupos hidroxilo, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 grupos hidroxilo. Los polioles preferidos incluyen oligómeros o polímeros de glicerol, tales como hexaglicerol, pentaeritritol u oligómeros o polímeros de los mismos (por ejemplo, dipentaeritritol, tripentaeritritol, tetrapentaeritritol y formas etoxiladas de pentaeritritol) y alcoholes derivados del azúcar, tales como el sorbitol, arabanitol, y manitol. También, muchos polioles disponibles en el mercado, tales como diversos isómeros de inositol (esto es 1,2,3,4,5,6-hexahidroxociclohexano), 2,2-bis(hidroximetil)-1-butanol, (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS), 2-[bis(2-hidroxi)etil]amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, ácido {[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino}acético (Tricina), ácido 2-[[3-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]propil]amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, 2-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]etanosulfónico (TES), ácido 4-[[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]amino]-1-butanósulfónico, y 2-[bis(2-hidroxi)etil]amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol clorhidrato pueden servir como una molécula precursora aceptable. En aquellos casos en los que la molécula precursora tenga un grupo ionizable o grupos que interferirán

con la etapa de alcoxilación, esos grupos ionizables deben protegerse o modificarse antes de llevar a cabo la etapa de alcoxilación.

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

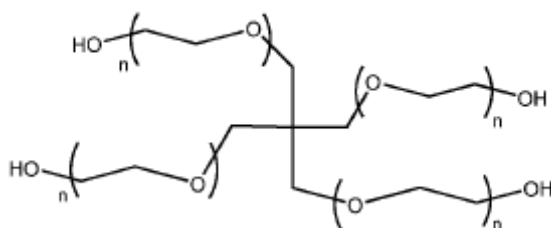
Se prefiere que ni el oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado ni el producto polimérico alcoxilado tengan un grupo funcional que se puede alcoxilar (por ejemplo, grupo hidroxilo) de la molécula precursora.

Los materiales poliméricos alcoxilados generados por el nuevo método de alcoxilación

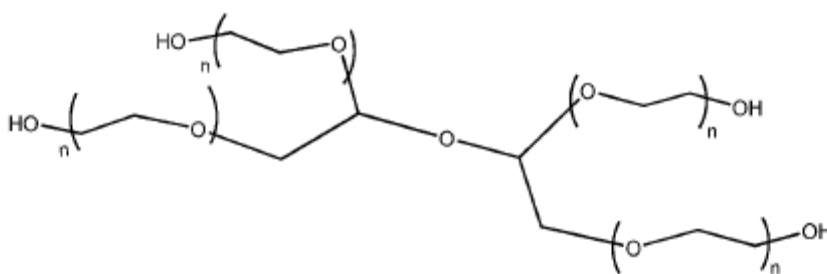
10 El material polimérico alcoxilado preparado según los métodos descritos en este documento tendrá una arquitectura básica correspondiente a la estructura del oligómero que se puede alcoxilar (esto es, un oligómero que se puede alcoxilar lineal da como resultado un material polimérico alcoxilado lineal, un oligómero que se puede alcoxilar de cuatro brazos da como resultado un material polimérico alcoxilado de cuatro brazos, etcétera). Como consecuencia, el material polimérico alcoxilado tomará cualquiera de una serie de posibles geometrías, incluidas lineales, ramificadas y de multi-brazos.

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

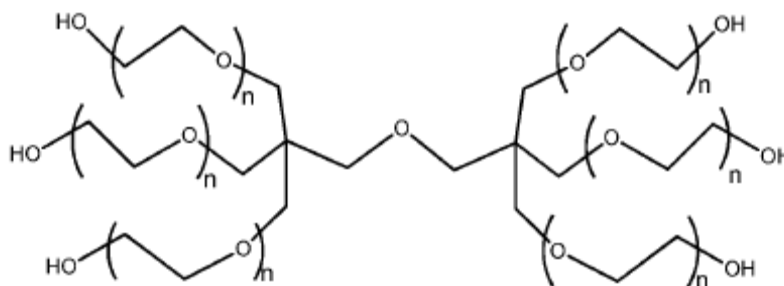
Las estructuras ramificadas de ejemplo para el material polimérico alcoxilado se proporcionan a continuación:



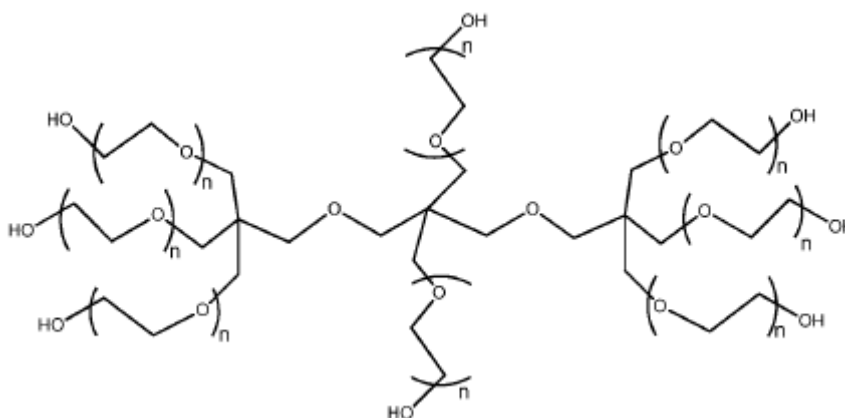
20 en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n satisface uno o más de los siguientes intervalos: desde 10 a 1.000; desde 10 a 500; desde 10 a 250; desde 50 a 1000; desde 50 a 250; y desde 50 a 120 (o de otro modo definido de modo que el peso molecular de la estructura sea desde 2,000 Dalton a 180,000 Dalton, por ejemplo, desde 2,000 Dalton a 120,000 Dalton);



25 en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n satisface uno o más de los siguientes intervalos: desde 10 a 1.000; desde 10 a 500; desde 10 a 250; desde 50 a 1.000; desde 50 a 250; y desde 50 a 120 (o de otro modo definido de modo que el peso molecular de la estructura sea desde 2,000 Dalton a 180,000 Dalton, por ejemplo, desde 2,000 Dalton a 120,000 Dalton);



- 5 en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n satisface uno o más de los siguientes intervalos: desde 10 a 750; desde 40 a 750; desde 50 a 250; y desde 50 a 120 (o de otro modo definido de modo que el peso molecular de la estructura sea desde 3,000 Dalton a 200,000 Dalton, por ejemplo, desde 12,000 Dalton a 200,000 Dalton); y



en la que (solo para la estructura inmediatamente anterior) el valor promedio de n satisface uno o más de los siguientes intervalos: desde 10 a 600 y desde 35 a 600 (o de otro modo definido de modo que el peso molecular de la estructura sea desde 4,000 Dalton a 215,000 Dalton, por ejemplo, desde 12,000 Dalton a 215,000 Dalton).

- 10 Para cada una de las cuatro estructuras proporcionadas inmediatamente, se prefiere que el valor de n , en cada caso, sea sustancialmente el mismo. De este modo, se prefiere que cuando se consideren todos los valores de n para un material polimérico alcoxilado dado, todos los valores de n para ese material polimérico alcoxilado, oligómero o prepolímero que se puede alcoxilar estén dentro de tres desviaciones estándar, más preferiblemente dentro de dos desviaciones estándar, y aún más preferiblemente dentro de una desviación estándar.
- 15 En términos del peso molecular del material polimérico alcoxilado, el material polimérico alcoxilado tendrá un peso molecular promedio en número conocido y definido. Para su uso en este documento, un peso molecular promedio en número solo se puede conocer y definir para el material que se aísla del medio sintético a partir del cual se generó.

El peso molecular total del producto polimérico alcoxilado puede ser un peso molecular apropiado para el propósito previsto. Un peso molecular aceptable para cualquier propósito determinado se puede determinar mediante prueba y error mediante la experimentación de rutina. Los pesos moleculares de ejemplo para el producto polimérico alcoxilado tendrán un peso molecular promedio en número que cae dentro de uno o más de los siguientes intervalos:

20 desde 2,000 Dalton a 215,000 Dalton; desde 5,000 Dalton a 215,000 Dalton; desde 5,000 Dalton a 150,000 Dalton; desde 5,000 Dalton a 100,000 Dalton; desde 5,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 6,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 7,500 Dalton a 80,000 Dalton; desde 9,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 10,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 12,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 15,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 20,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 25,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 30,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 40,000 Dalton a 80,000 Dalton; desde 6,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 7,500 Dalton a 60,000 Dalton; desde 9,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 10,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 12,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 15,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 20,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 25,000 Dalton a 60,000 Dalton; desde 30,000 Dalton a 60,000; desde 6,000 Dalton a 40,000 Dalton; desde 9,000 Dalton a 40,000 Dalton; desde 10,000 Dalton a 40,000 Dalton; desde 15,000 Dalton a 40,000 Dalton; desde 19,000 Dalton a 40,000 Dalton; desde 15,000 Dalton a 25,000 Dalton; y desde 18,000 Dalton a 22,000 Dalton.

Para cualquier material polimérico alcoxilado dado, se puede llevar a cabo una etapa opcional para transformar adicionalmente el material polimérico alcoxilado de manera que lleve un grupo reactivo específico para formar un reactivo polimérico. De este modo, usando técnicas bien conocidas en la técnica, el material polimérico alcoxilado

35

puede funcionalizarse para incluir un grupo reactivo (por ejemplo, ácido carboxílico, éster activo, amina, tior, maleimida, aldehído, cetona, y así sucesivamente).

En la realización de una etapa opcional para transformar adicionalmente el producto polimérico alcoxilado de manera que lleve un grupo reactivo específico, dicha etapa opcional se lleva a cabo en un solvente apropiado. Un experto en el arte puede determinar si algún solvente específico es apropiado para cualquier etapa de reacción dada. Sin embargo, a menudo, el solvente es preferiblemente un solvente no polar o un solvente polar. Los ejemplos no limitantes de solventes no polares incluyen benceno, xilenos y tolueno. Los solventes polares de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, dioxano, tetrahidrofurano (THF), alcohol t-butílico, DMSO (dimetilsulfóxido), HMPA (hexametilfosforamida), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida) y (N-metilpirrolidina).

10 Composiciones adicionales del material polimérico alcoxilado

En este documento se describen composiciones que comprenden el material polimérico alcoxilado, que incluyen no solo cualquier composición que comprende el material polimérico alcoxilado, sino también composiciones en las que el material polimérico alcoxilado se transforma adicionalmente en, por ejemplo, un reactivo polimérico, así como composiciones de conjugados formados a partir del acoplamiento de dichos reactivos poliméricos con un agente activo. Entre otras cosas, un beneficio del método descrito en este documento es la capacidad de lograr composiciones que contienen material polimérico alcoxilado de alta pureza. Las composiciones se pueden caracterizar por tener: contenido sustancialmente bajo de ambas impurezas de alto peso molecular (por ejemplo, especies que contienen polímeros que tienen un peso molecular mayor que el peso molecular del material polimérico alcoxilado deseado) y bajo contenido de impurezas de diol de bajo peso molecular (esto es, HO-PEG-OH), cualquiera de los tipos de impurezas (y preferiblemente ambos tipos de impurezas) que totalizan menos del 8% en peso, y más preferiblemente menos del 2% en peso. Además o alternativamente, las composiciones también se pueden caracterizar por tener una pureza de material polimérico alcoxilado (así como composiciones que comprenden reactivos poliméricos formados a partir del material polimérico alcoxilado, y composiciones de conjugados formados a partir de la conjugación de tales reactivos poliméricos y un agente activo) mayor del 92% en peso, mayor del 93% en peso, o mayor del 94% en peso, mayor del 95% en peso, preferiblemente mayor del 96% en peso, y más preferiblemente mayor del 97% en peso. La cromatografía de permeación en gel (GPC) y la cromatografía de filtración en gel (GFC) se pueden usar para caracterizar el material polimérico alcoxilado. Esos métodos cromatográficos permiten la separación de la composición a sus componentes según el peso molecular. Los ejemplos de trazas de productos de GFC descritos en el ejemplo 8 y el ejemplo 9 se proporcionan como la figura 7 y la figura 8

Usos de ejemplo de los materiales poliméricos alcoxilados y composiciones formadas a partir de estos

El material polimérico alcoxilado proporcionado en este documento así como los productos poliméricos alcoxilados que se han modificado adicionalmente para llevar un grupo reactivo específico (en lo que sigue denominado "reactivo polimérico") son útiles para la conjugación con, por ejemplo, agentes activos. Los grupos preferidos de los agentes biológicamente activos apropiados para la reacción con los reactivos poliméricos descritos en este documento son grupos electrófilos y nucleófilos. Los grupos de ejemplo incluyen aminas primarias, ácidos carboxílicos, alcoholes, tioles, hidrazinas e hidrazidas. Tales grupos apropiados para reaccionar con los reactivos poliméricos descritos en este documento son conocidos para los expertos en el arte. De este modo, en este documento se describe un método para hacer un conjugado que comprende la etapa de poner en contacto, en condiciones de conjugación, un agente activo con un reactivo polimérico descrito en este documento.

Las condiciones de conjugación apropiadas son las condiciones de tiempo, temperatura, pH, concentración del reactivo, grupo (s) funcional (es) reactivo (s), grupos funcionales disponibles en el agente activo, solvente, suficiente para efectuar la conjugación entre un reactivo polimérico y un agente activo. Como se conoce en la técnica, las condiciones específicas dependen, entre otras cosas, del agente activo, el tipo de conjugación deseada, la presencia de otros materiales en la mezcla de reacción, y así sucesivamente. Una persona con experiencia ordinaria en el arte puede determinar las condiciones suficientes para efectuar la conjugación en cualquier caso particular, mediante una lectura de la divulgación en este documento, referencia a la literatura relevante, y/o mediante experimentación rutinaria

Por ejemplo, cuando el reactivo polimérico contiene un éster activo de N-hidroxisuccinimida (por ejemplo, succinimidil succinato, succinimidil propionato y succinimidil butanoato), y el agente activo contiene un grupo amina, la conjugación se puede realizar a un pH desde aproximadamente 7.5 a aproximadamente 9.5 a temperatura ambiente. Además, cuando el reactivo polimérico contiene un grupo reactivo de vinilsulfona o un grupo maleimida y el agente farmacológicamente activo contiene un grupo sulfhidrilo, la conjugación se puede realizar a un pH desde aproximadamente 7 a aproximadamente 8.5 a temperatura ambiente. Además, cuando el grupo reactivo asociado con el reactivo polimérico es un aldehído o cetona y el agente farmacológicamente activo contiene una amina primaria, la conjugación se puede realizar mediante aminación reductora en la que la amina primaria del agente farmacológicamente activo reacciona con el aldehído o cetona del polímero. Teniendo lugar a pH desde aproximadamente 6 a aproximadamente 9.5, la aminación reductora da como resultado inicialmente un conjugado en el que el agente farmacológicamente activo y el polímero están unidos a través de un enlace imina. El tratamiento posterior del conjugado que contiene un enlace imina con un agente reductor apropiado, como el NaCNBH_3 , reduce

la imina a una amina secundaria. Para obtener información adicional sobre estas y otras reacciones de conjugación, se hace referencia a Hermanson "Bioconjugate Techniques," Academic Press, 1996.

5 Las condiciones de conjugación de ejemplo incluyen llevar a cabo la reacción de conjugación a un pH desde aproximadamente 4 a aproximadamente 10, y a, por ejemplo, a pH de aproximadamente 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, o 10.0. Se deja que la reacción proceda desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 72 horas, preferiblemente desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, y más preferiblemente desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. La temperatura bajo la cual puede tener lugar la conjugación está por lo general, aunque no necesariamente, en el intervalo desde aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C, y es a menudo a temperatura ambiente o menos. Las reacciones de conjugación a menudo se llevan a cabo usando una solución reguladora de fosfato, acetato de sodio o un sistema similar.

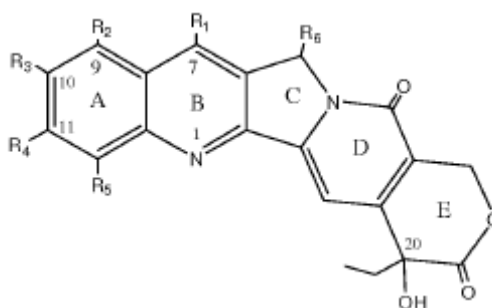
10 Con respecto a la concentración del reactivo, un exceso del reactivo polimérico se combina por lo general con el agente activo. En algunos casos, sin embargo, se prefiere tener cantidades estequiométricas de grupos reactivos en el reactivo polimérico a los grupos reactivos del agente activo. De este modo, por ejemplo, un mol de un reactivo polimérico que lleva cuatro grupos reactivos se combina con cuatro moles de agente activo. Las relaciones de ejemplo de grupos reactivos del reactivo polimérico a agente activo incluyen relaciones molares de aproximadamente 1: 1 (grupo reactivo del reactivo polimérico: agente activo), 1:0.1, 1:0.5, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, o 1:10. Se permite que la reacción de conjugación continúe hasta que sustancialmente no se produzca más conjugación, lo que generalmente se puede determinar al monitorear el progreso de la reacción a lo largo del tiempo.

20 El progreso de la reacción se puede controlar extrayendo alícuotas de la mezcla de reacción en diversos puntos de tiempo y analizando la mezcla de reacción mediante métodos cromatográficos, SDS-PAGE o espectrometría de masas MALDI-TOF, RMN, IR o cualquier otro método analítico apropiado. Una vez que se alcanza una meseta con respecto a la cantidad de conjugado formado o la cantidad del reactivo polimérico no conjugado restante, se supone que la reacción está completa. Por lo general, la reacción de conjugación toma desde minutos a varias horas (por ejemplo, desde 5 minutos a 24 horas o más). La mezcla de producto resultante se prefiere, pero no necesariamente se purifica, para separar el exceso de agente activo, base fuerte, agentes de condensación y subproductos de reacción y solventes. Los conjugados resultantes luego se pueden caracterizar usando métodos analíticos tales como métodos cromatográficos, métodos espectroscópicos, MALDI, electroforesis capilar y/o electroforesis en gel. Los conjugados de polímero-agente activo se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas.

30 Con respecto a un agente activo, el material polimérico alcoxilado y un reactivo polimérico preparado a partir del material polimérico alcoxilado se pueden combinar en condiciones de conjugación apropiadas para dar como resultado un conjugado. A este respecto, los agentes activos de ejemplo pueden ser un agente activo seleccionado del grupo que consiste en un fármaco de molécula pequeña, un oligopéptido, un péptido y una proteína. El agente activo para uso en este documento puede incluir, pero no se limitan a, los siguientes: adriamicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), amiodarona, amitriptilina, azitromicina, benzfetamina, bromofeniramina, cabinoxamina, calcitonina, clorambucil, cloroprocaína, cloroquina, clorfenamina, clorpromazina, cinarizina, claritromicina, clomifeno, ciclobenzaprina, ciclopentolato, ciclofosfamida, dacarbazina, daunomicina, demeclociclina, dibucaína, diciclomina, dietilproprión, diltiazem, dimenhidrinato, difenhidramina, disopiramida, doxepina, doxiciclina, doxilamina, dispiramida, EDTA, eritromicina, flurazepam, violeta de genciana, hidroxicloproquina, imipramina, insulina, irinotecán, levometadilo, lidocaína, loxarina, mecloretamina, melfalán, metadona, metotimiperazina, metotrexato, metoclopramida, minociclina, naftifina, nifedipina, nizatidina, orfenadrina, oxibutinina, oxitetraciclina, fenoxibenzamina, fentolamina, procainamida, procaína, prometazina, prometazina, proparacina, propoxicina, propoxifeno, ranitidina, tamoxifeno, terbinafina, tetracaína, tetraciclina, tramadol, triflupromazina, trimeprazina, trimetilbenzamida, trimipramina, tripelenamina, troleandomicina, tiramina, mostaza de uracilo, verapamilo y vasopressina.

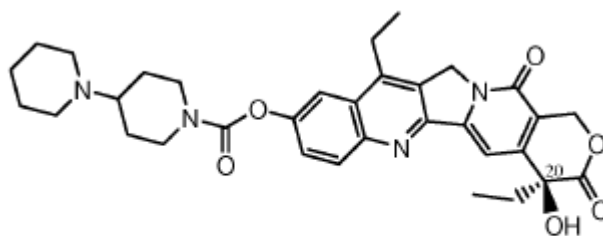
45 Agentes activos de ejemplo incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en acravistina, amoxapina, astemizol, atropina, azitromicina, benzapril, benztropina, beperidina, bupracaina, buprenorfina, buspirona, butorfanol, cafeína, camptotecina y moléculas que pertenecen a la familia de las camptotecinas, ceftriaxona, clorpromazina, ciprofloxacina, cladribina, clemastina, clindamicina, clofazimina, clozapina, cocaína, codeína, ciproheptadina, desipramina, dihidroergotamina, difenidol, difenoxilato, dipiridamol, docetaxel, doxapram, ergotamina, famciclovir, fentanilo, flavoxato, fludarabina, flufenazina, fluvastina, ganciclovir, granisteron, guanetidina, haloperidol, homatropina, hidrocodona, hidromorfona, hidroxizina, hiosciamina, imipramina, itraconazol, keterolac, ketoconazol, levocarbastina, levorфона, lincomicina, lomefloxacina, loperamida, losartán, loxapina, mazindol, meclizina, meperidina, mepivacaína, mesoridazina, metdilazina, metenamina, metimazol, metotrimeperazina, metisergida, metronidazol, minoxidil, mitomicina c, molindona, morfina, nafzodona, nalbufina, ácido naldíxico, nalmefeno, naloxona, naltrexona, nafazolina, nedocromil, nicotina, norfloxacina, ofloxacina, ondasteron, oxycodona, oximorfona, paclitaxel, pentazocina, pentoxifilina, perfenazina, fisostigmina, pilocarpina, pimozida, pramoxina, prazosina, proclorperazina, promacina, prometazina, quinidina, quinina, alcaloides de la rauwolfia, riboflavina, rifabutina, risperidona, rocuronio, escopolamina, sufentanilo, tacrina, terazosina, terconazol, terfenadina, tiordazina, tiotixeno, ticlodipina, timolol, tolazamida, tolmetina, trazodona, trietilperazina, trifluopromacina, trihexilfenidilo, trimeprazina, trimipramina, tubocurarina, vecuronio, vidarabina, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

- Otros agentes activos de ejemplo incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en acetazolamida, acravistina, aciclovir, adenosina fosfato, alopurinol, alprazolam, amoxapina, amrinona, apraclonidina, azatadina, aztreonam, bisacodilo, bleomicina, bromofeniramina, buspirona, butoconazol, camptotecina y las moléculas dentro de la familia de la camptotecina, carboxamina, cefamandol, cefazol, cefixima, cefmetazol, cefonicida, cefoperazona, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxima, ceftriaxona, cefapirina, cloroquina, clorfeniramina, cimetidina, cladarabina, clotrimazol, cloxacilina, didanosina, dipiridamol, doxazosina, doxilamina, econazol, enoxacina, estazolam, etionamida, famciclovir, famotidina, fluconazol, fludarabina, ácido fólico, ganciclovir, hidroxiclороquina, yodoquinol, isoniazida, itraconazol, cetoconazol, lamotrigina, lansoprazol, lorcetadina, losartán, mebendazol, mercaptopurina, metotrexato, metronidazol, miconazol, midazolam, minoxidil, nafzodona, ácido naldíxico, niacina, nicotina, nizatidina, omeperazol, oxaprozina, oxiconazol, papaverina, pentostatina, fenazopiridina, pilocarpina, piroxicam, prazosina, primaquina, pirazinamida, pirimetamina, piroxidina, quinidina, quinina, ribaverina, rifampina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfasoxazol, terazosina, tiabendazol, tiamina, tioguanina, timolol, trazodona, triamptereo, triazolam, trimetadiona, trimetoprima, trimetrexato, triplenamina, tropicamida, y vidarabina.
- Otros agentes activos de ejemplo incluyen los que pertenecen a la familia de moléculas de camptotecina. Por ejemplo, el agente activo puede poseer la estructura general:



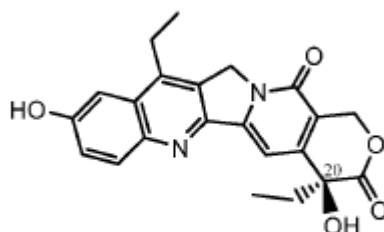
- en la que R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno; halo; acilo; alquilo (por ejemplo, alquilo C1-C6); alquilo sustituido; alcoxi (por ejemplo, alcoxi C1-C6); alcoxi sustituido; alqueno; alquino; cicloalquilo; hidroxilo; ciano; nitro; azido;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

Un agente activo de ejemplo de acuerdo con las reivindicaciones es irinotecán.



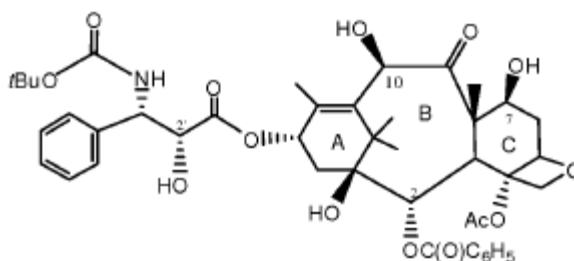
Irinotecán

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



7-etil-10-hidroxi-camptotecina

Otra clase de ejemplo de agentes activos incluye aquellos que pertenecen a la familia de moléculas de taxano. Un agente activo de ejemplo de esta clase de moléculas es el docetaxel en el que el H del hidroxilo en el grupo hidroxilo 2' está implicado en la formación del conjugado de polímero multi-brazos preferido:



5

Los reactivos poliméricos descritos en este documento se pueden unir, ya sea covalentemente o no covalentemente, a varias entidades que incluyen películas, separación química y superficies de purificación, soportes sólidos, superficies metálicas tales como el oro, titanio, tantalio, niobio, aluminio, acero, y sus óxidos, óxido de silicio, macromoléculas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, y así sucesivamente) y moléculas pequeñas. Además, los reactivos poliméricos también se pueden usar en sensores bioquímicos, interruptores bioelectrónicos, y compuertas. Los reactivos poliméricos también se pueden emplear como portadores para la síntesis de péptidos, para la preparación de superficies recubiertas con polímeros e injertos poliméricos, para preparar conjugados polímero-ligando para la partición de afinidad, para preparar hidrogeles reticulados o no reticulados, y para preparar aductos de cofactor de polímero para biorreactores.

10

15

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

20

Los excipientes farmacéuticamente aceptables de ejemplo, sin limitación, aquellos seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, surfactantes, soluciones reguladoras, ácidos, bases y combinaciones de los mismos

25

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

30

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

35

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

Un antioxidante también puede estar presente en la composición. Los antioxidantes se usan para prevenir la oxidación, evitando así el deterioro del conjugado u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes

apropiados para usar en una o más realizaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio y combinaciones de los mismos

5 Un surfactante puede estar presente como un excipiente. Los surfactantes de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80", y pluronics tales como F68 y F88 (ambos de los cuales disponibles de BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos; esteroides, tales como el colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, zinc y otros cationes apropiados.

10 Los ácidos o bases pueden estar presentes como un excipiente en la composición. Los ejemplos no limitantes de ácidos que se pueden usar incluyen aquellos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico y combinaciones de los mismos. Ejemplos de bases apropiadas incluyen, sin limitación, bases seleccionadas del grupo que consiste en hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

15 La cantidad de conjugado (esto es, el conjugado formado entre el agente activo y el reactivo polimérico) en la composición variará dependiendo de varios actores, pero será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición se almacene en un recipiente de dosis unitaria (por ejemplo, un vial). Además, la preparación farmacéutica puede alojarse en una jeringa. Una dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar experimentalmente mediante la administración repetida de cantidades crecientes del conjugado para determinar qué cantidad produce un punto final clínicamente deseado

20 La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición variará dependiendo de la actividad del excipiente y las necesidades particulares de la composición. Por lo general, la cantidad óptima de cualquier excipiente individual se determina a través de la experimentación rutinaria, esto es, preparando composiciones que contienen cantidades variables del excipiente (que oscilan de baja a alta), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el rango en el que el rendimiento óptimo se logra sin efectos adversos significativos.

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

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

35 Las composiciones farmacéuticamente aceptables abarcan todos los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son apropiadas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse así como líquidos. Los ejemplos de diluyentes apropiados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada y combinaciones de los mismos. Con respecto a las composiciones farmacéuticas líquidas, se prevén soluciones y suspensiones.

40 Las composiciones de una o más realizaciones de la presente invención se administran por lo general, aunque no necesariamente, mediante inyección y, por lo tanto, son generalmente soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica también puede tomar otras formas tales como jarabes, cremas, pomadas, comprimidos y polvos. También se incluyen otros modos de administración, tales como pulmonar, rectal, transdérmica, transmucosa, oral, intratecal, subcutánea, intraarterial, y así sucesivamente.

45 También se describe en este documento un método para administrar un conjugado como se proporciona en este documento a un paciente que padece una afección que responde al tratamiento con el conjugado. El método comprende administrar a un paciente, generalmente mediante inyección, una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado (preferiblemente proporcionado como parte de una composición farmacéutica). Como se describió previamente, los conjugados se pueden administrar inyectados por vía parenteral mediante inyección intravenosa. Los tipos de formulación apropiados para administración parenteral incluyen soluciones listas para inyección, polvos secos para combinación con un solvente antes de su uso, suspensiones listas para inyección, composiciones secas insolubles para combinación con un vehículo antes de su uso, y emulsiones y concentrados líquidos para dilución antes de la administración, entre otros.

55 El método de administración se puede usar para tratar cualquier afección que pueda remediarse o prevenirse mediante la administración del conjugado. Los expertos en el arte apreciarán qué afecciones se pueden tratar

efectivamente con un conjugado específico. Ventajosamente, el conjugado se puede administrar al paciente antes, simultáneamente o después de la administración de otro agente activo.

La dosis real que se administrará variará dependiendo de la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como la gravedad de la afección que se está tratando, el criterio del profesional de la salud y el conjugado que se administra.

5 Los expertos en el arte conocen las cantidades terapéuticamente eficaces y/o se describen en los textos de referencia pertinentes y en la bibliografía. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz oscilará desde aproximadamente 0.001 mg a 100 mg, preferiblemente en dosis desde 0.01 mg/día a 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis desde 0.10 mg/día a 50 mg/día. Una dosis dada se puede administrar periódicamente hasta, por ejemplo, los síntomas relacionados disminuyen y/o se eliminan por completo.

10 La dosis unitaria de cualquier conjugado dado (de nuevo, preferiblemente se proporciona como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una variedad de programas de dosificación, según el criterio del médico, las necesidades del paciente, y así sucesivamente. El programa de dosificación específico será conocido por los expertos en el arte o se puede determinar experimentalmente usando métodos de rutina. Los horarios de dosificación de ejemplo incluyen, sin limitación, la administración una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se ha alcanzado el punto final clínico, se detiene la dosificación de la composición.

Una ventaja de la administración de ciertos conjugados descritos en este documento es que las porciones de polímero solubles en agua se pueden escindir cuando se incluye un enlace hidrolíticamente degradable entre el residuo de la unidad estructural de agente activo y el polímero soluble en agua. Dicho resultado es ventajoso cuando la eliminación del cuerpo es potencialmente un problema debido al tamaño del polímero. De manera óptima, la escisión de cada porción de polímero soluble en agua se facilita mediante el uso de enlaces fisiológicamente escindibles y/o enzimáticamente degradables, tales como enlaces que contienen amida, carbonato o éster. De esta manera, la eliminación del conjugado (a través de la escisión de porciones individuales de polímero soluble en agua) se puede modular seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que proporcionaría las propiedades deseadas de eliminación. Un experto en el arte puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional escindible. Por ejemplo, un experto en el arte, usando experimentación rutinaria, puede determinar un tamaño molecular apropiado y un grupo funcional escindible, preparando primero una variedad de derivados poliméricos con diferentes pesos de polímeros y grupos funcionales escindibles, y luego obteniendo el perfil de eliminación (por ejemplo, a través de muestras periódicas de sangre u orina) administrando el derivado de polímero a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/u orina. Una vez que se ha obtenido una serie de perfiles de eliminación para cada conjugado probado, se puede identificar un conjugado apropiado.

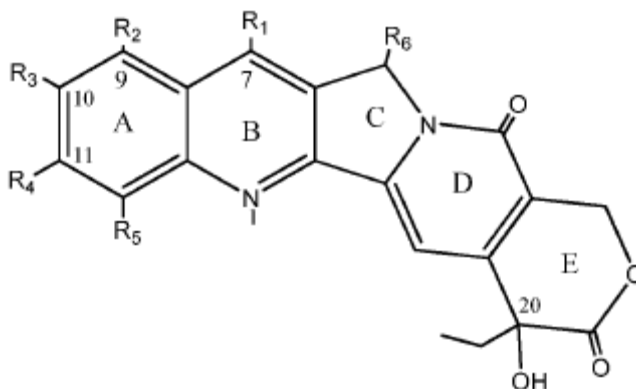
Sales mixtas - Consideraciones con respecto al agente activo, "D"

Como se indicó anteriormente, los conjugados de polímeros solubles en agua y las composiciones que contienen estos conjugados se pueden proporcionar como sales mixtas. En el contexto de composición y conjugado de sal mixta, el agente activo es un fármaco de molécula pequeña, un oligopéptido, un péptido o una proteína que, cuando se conjuga con el polímero soluble en agua, contiene al menos un átomo de nitrógeno básico, tal como un grupo amina (por ejemplo, una amina u otro grupo que contiene nitrógeno básico que no está conjugado con el polímero soluble en agua). En la sal mixta, los átomos de nitrógeno básicos son cada uno individualmente ya sea protonados o no protonados, donde los átomos de nitrógeno protonados existen como sales de ácidos de dos aniones diferentes.

Los agentes activos que contienen al menos un grupo amina o un átomo de nitrógeno básico apropiado para proporcionar una sal de ácido mixta como se describe en este documento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: adriamicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), amiodarona, amitriptilina, azitromicina, benzfetamina, bromofeniramina, cabinoxamina, calcitonina, clorambucil, cloroprocaína, cloroquina, clorfenamina, clorpromazina, cinarizina, claritromicina, clomifeno, ciclobenzaprina, ciclopentolato, ciclofosfamida, dacarbazina, daunomicina, demeclociclina, dibucaína, diclomina, dietilproprión, diltiazem, dimenhidrinato, difenhidramina, disopiramida, doxepina, doxiciclina, doxilamina, dispiramida, EDTA, eritromicina, flurazepam, violeta de genciana, hidroxiclороquina, imipramina, insulina, irinotecán, levometadilo, lidocaína, loxarina, mecloretamina, melfalán, metadona, metotimiperazina, metotrexato, metoclopramida, minociclina, naftifina, nicardipina, nizatidina, orfenadrina, oxibutinina, oxitetraciclina, fenoxibenzamina, fentolamina, procaïnāmida, procaína, promazina, prometazina, proparacaína, propoxicina, propoxifeno, ranitidina, tamoxifeno, terbinafina, tetracaína, tetraciclina, tramadol, triflupromazina, trimeprazina, trimetilbenzamida, trimipramina, tripelenamina, troleandomicina, tiramina, mostaza de uracilo, verapamilo y vasopressina.

Los agentes activos adicionales incluyen aquellos que comprenden uno o más heterociclos que contienen nitrógeno, tales como acravistina, amoxapina, astemizol, atropina, azitromicina, benzapril, benzotropina, beperidina, bupracaina, buprenorfina, buspirona, butorfanol, cafeína, camptotecina y moléculas que pertenecen a la familia de las camptotecinas, ceftriaxona, clorpromazina, ciprofloxacina, cladaribina, clemastina, clindamicina, clofazimina, clozapina, cocaína, codeína, ciproheptadina, desipramina, dihidroergotamina, difenidol, difenoxilato, dipiridamol, doxapram, ergotamina, famciclovir, fentanilo, flavoxato, fludarabina, flufenazina, fluvastina, ganciclovir, granisteron, guanetidina, haloperidol, homatropina, hidrocodona, hidromorfona, hidroxizina, hiosciamina, imipramina, itraconazol,

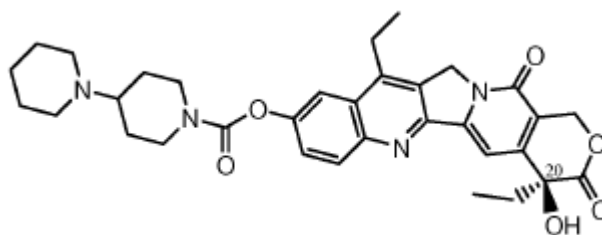
- 5 keterolac, ketoconazol, levocarbustina, levorfona, lincomicina, lomefloxacina, loperamida, losartán, loxapina, mazindol, meclizina, meperidina, mepivacaína, mesoridazina, metdilazina, metenamina, metimazol, metotrimeperazina, metisergida, metronidazol, minoxidil, mitomicina c, molindona, morfina, nafzodona, nalbufina, ácido naldíxico, nalmefeno, naloxona, naltrexona, nafazolina, nedocromil, nicotina, norfloxacina, ofloxacina, ondansteron, oxicodona, oximorfona, pentazocina, pentoxifilina, perfenazina, fisostigmina, pilocarpina, pimozida, pramoxina, prazosina, proclorperazina, promacina, prometazina, quinidina, quinina, alcaloides de la rauwolfia, riboflavina, rifabutina, risperidona, rocuronio, escopolamina, sufentanilo, tacrina, terazosina, terconazol, terfenadina, tiordazina, tiotixeno, ticlodipina, timolol, tolazamida, tolmetina, trazodona, trietilperazina, trifluopromacina, trihexilfenidilo, trimeprazina, trimipramina, tubocurarina, vecuronio, vidarabina, vinblastina, vincristina y vinorelbina.
- 10 Los agentes activos adicionales incluyen aquellos que comprenden un anillo de nitrógeno aromático tal como acetazolamida, acravistina, aciclovir, adenosina fosfato, alopurinal, alprazolam, amoxapina, amrinona, apraclonidina, azatadina, aztreonam, bisacodilo, bleomicina, bromofeniramina, buspirona, butoconazol, camptotecina y las moléculas dentro de la familia de la camptotecina, carbinoxamina, cefamandol, cefazol, cefixima, cefmetazol, cefonicida, cefoperazona, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxima, ceftriaxona, cefapirina, cloroquina, clorfeniramina, cimetidina, cladarabina, clotrimazol, cloxacilina, didanosina, dipiridamol, doxazosina, doxilamina, econazol, enoxacina, estazolam, etionamida, famciclovir, famotidina, fluconazol, fludarabina, ácido fólico, ganciclovir, hidroxiclороquina, yodoquinol, isoniazida, itraconazol, cetoconazol, lamotrigina, lansoprazol, lorcetadina, losartán, mebendazol, mercaptopurina, metotrexato, metronidazol, miconazol, midazolam, minoxidil, nafzodona, ácido naldíxico, niacina, nicotina, nizatidina, omeperazol, oxaprozina, oxiconazol, papaverina, pentostatina, fenazopiridina, pilocarpina, piroxicam, prazosina, primaquina, pirazinamida, pirimetamina, piroxidina, quinidina, quinina, ribaverina, rifampina, sulfadiazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfasoxazol, terazosina, tiabendazol, tiamina, tioguanina, timolol, trazodona, triamptereo, triazolam, trimetadiona, trimetoprima, trimetrexato, triplenamina, tropicamida, y vidarabina
- 20 Un agente activo preferido es uno que pertenece a la familia de moléculas de camptotecina. Por ejemplo, el agente activo puede poseer la estructura general:
- 25



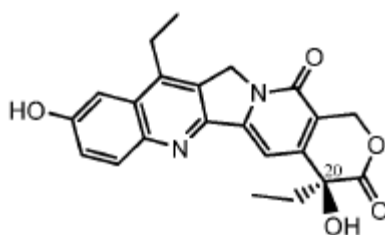
- 30 en la que R¹-R⁵ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; halo; acilo; alquilo (por ejemplo, alquilo C1-C6); alquilo sustituido; alcoxi (por ejemplo, alcoxi C1-C6); alcoxi sustituido; alqueno; alquino; cicloalquilo; hidroxilo; ciano; nitro; azido; amido; hidracina;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

En referencia a la estructura anterior, aunque no se muestran, los análogos que tienen un grupo hidroxilo en otra posición que no sea la posición 20 (por ejemplo, posición 10-, u 11-, etc.) se prefieren de manera similar.

De acuerdo con las reivindicaciones, el agente activo es irinotecán (la estructura se muestra a continuación).



El agente activo puede ser 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), un metabolito de irinotecán, cuya estructura se muestra a continuación.



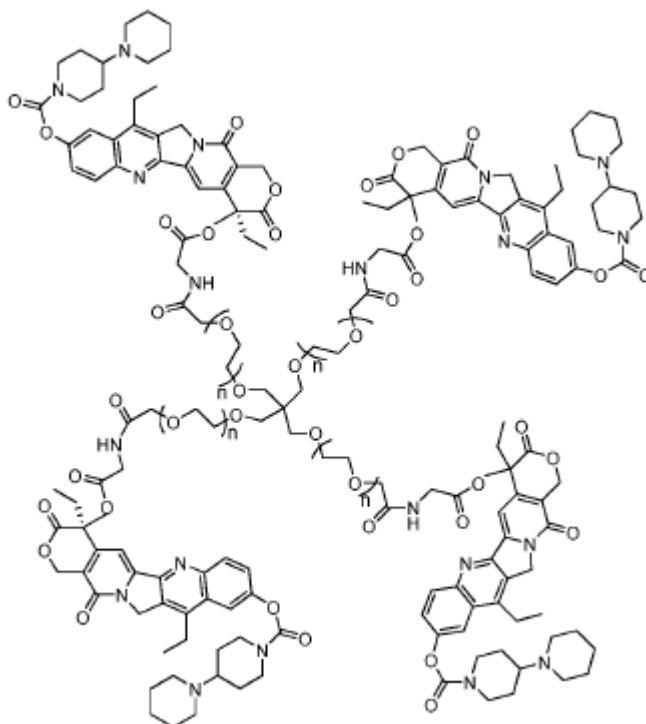
5 Sales mixtas - Consideraciones con respecto a los conjugados

Los conjugados ilustrativos de sales mixtas de un polímero soluble en agua y un agente activo pueden poseer cualquiera de una serie de características estructurales como las descritas anteriormente. Es decir, el conjugado puede poseer una estructura lineal, esto es, tener una o dos moléculas de agente activo unidas covalentemente a un polímero soluble en agua lineal, por lo general en cada extremo del polímero soluble en agua lineal. Alternativamente, el conjugado puede poseer una estructura bifurcada, ramificada o multi-brazos.

Un ejemplo de conjugado de polímero multi-brazos corresponde a la siguiente estructura generalizada: $R(-Q \text{ POLY}_1-X-D)_q$, en la que R es un radical orgánico que posee desde aproximadamente 3 a aproximadamente 150 átomos de carbono, Q es un enlazante (preferiblemente hidrolíticamente estable y puede ser $-O-$, $-S-$, $-NH-C(O)-$ y $-C(O)-NH-$, POLY_1 es un polímero soluble en agua, no peptídico, X es un espaciador que comprende un enlace hidrolizable, D es una unidad estructural de agente activo, y q oscila de 3 a 25 (por ejemplo, de 3 a 10, tal como cualquiera de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

Otro conjugado de polímero multi-brazos de ejemplo corresponde a la siguiente estructura generalizada: $R(-QPOLY_1-CH_2C(O)-NH-CH_2-C(O)-O-D)_q$, en la que: R es un radical orgánico que posee de 3 a 150 átomos de carbono; Q es un enlazante, en el que R, cuando se toma junto con Q para formar $R(-Q-)_q$, es un residuo de un poliol o un politiol después de la eliminación de protones hidroxilo o tiol "q", respectivamente, para formar un punto de unión para POLY_1 ; POLY_1 , es un polímero soluble en agua seleccionado del grupo que consiste en poli(alquilenglicol), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquil-metacrilamida), poli(hidroxialquil-metacrilato), poli(ácido α -hidroxilo), poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolona, poli(N-acriloilmorfolina), y copolímeros o terpolímeros de los mismos; D es una camptotecina unida en su posición de 10, 11 o 20 anillos; y q tiene un valor de 3 a 50 (por ejemplo, 3 a 10, tal como cualquiera de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

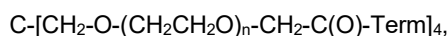
Una estructura de conjugado de polímero multi-brazos ilustrativa corresponde a la siguiente estructura:



La estructura anterior se denomina en este documento de manera abreviada como "PEG-Gly-Irinotecan de 4 brazos" (pentaeritritolil- PEG-carboximetilglicina irinotecán de 4 brazos); un nombre más completo corresponde a "irinotecán unido a pentaeritritolil-4-brazo- (PEG-1- metilen-2-oxo-vinilamino acetato)". Los grupos amino y/o nitrógeno básicos en la porción de agente activo del conjugado se muestran arriba solo en forma neutra, con el entendimiento de que el conjugado posee las características de una sal mixta parcial como se describe en detalle en este documento. Como se puede ver en la estructura anterior, el reactivo de pentaeritritolil PEG de 4 brazos modificado con carboximetilo posee un enlazante de glicina que interviene entre la porción de polímero y el agente activo, irinotecán.

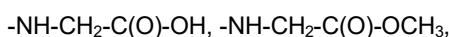
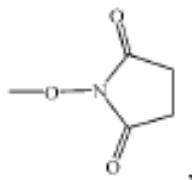
En ciertos casos, debido a conversiones incompletas, menos del 100% de rendimiento y otras complicaciones inevitables encontradas rutinariamente durante síntesis químicas, en particular de materiales a base de polietilenglicol multi-brazos, composiciones de ejemplo que comprenden "PEG-Gly-Irinotecan de 4 brazos" se puede caracterizar como composiciones que comprenden conjugados de cuatro brazos según las reivindicaciones, en las que al menos el 90% de los conjugados de cuatro brazos en la composición:

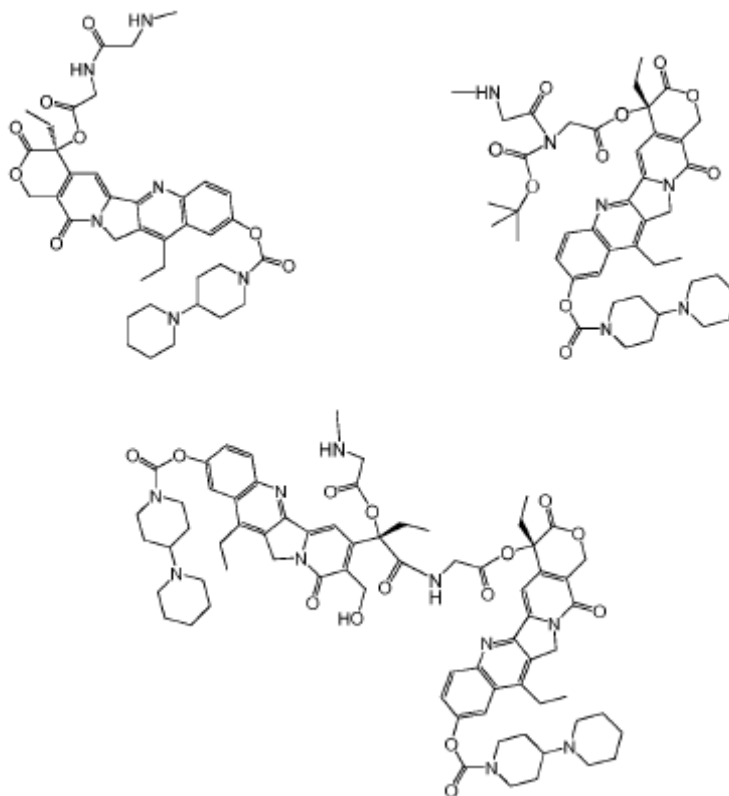
(i) tienen una estructura abarcada por la fórmula,



en la que

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





y -NH-CH₂-C(O)-O-Irino ("GLY-irin"), en la que Irino es un residuo de irinotecán; y

(ii) para cada Term en al menos el 90% de los conjugados de cuatro brazos en la composición, al menos el 90% de los mismos son -NH-CH₂-C(O)-O-Irino.

- 5 Por lo general, aunque no necesariamente, el número de brazos de polímero corresponderá al número de moléculas de agente activo unidas covalentemente al núcleo del polímero soluble en agua. Es decir, en el caso de un reactivo polimérico que tiene un cierto número de brazos de polímero (por ejemplo, correspondiente a la variable "q"), cada uno con un grupo funcional reactivo (por ejemplo, carboxi, éster activado tal como éster de succinimidilo, carbonato de benzotriazolilo, y así sucesivamente) en su extremo, el número optimizado de agentes activos (tal como el irinotecán) que se puede unir covalentemente al mismo en el conjugado correspondiente es más deseablemente "q".
- 10 Es decir, se considera que el conjugado optimizado tiene un valor de carga de fármaco de 1.00 (q) (o 100%). En una realización preferida, el conjugado de polímero multi-brazos se caracteriza por un grado de carga de fármaco de 0.90(q) (o 90%) o mayor. Las cargas de fármaco preferidas satisfacen uno o más de los siguientes: 0.92(q) o mayor; 0.93(q) o mayor; 0.94(q) o mayor; 0.95(q) o mayor; 0.96(q) o mayor; 0.97(q) o mayor; 0.98(q) o mayor; y 0.99(q) o mayor. Más preferiblemente, la carga de fármaco para un conjugado de polímero multi-brazos es del cien por ciento.
- 15 Una composición que comprende una sal de ácido mixta de conjugado de polímero soluble en agua multi-brazos puede comprender una mezcla de conjugados moleculares que tienen un agente activo unido al núcleo del polímero, que tiene dos moléculas de agente activo unidas al núcleo del polímero, que tiene tres agentes activos unidos al núcleo del polímero, y así sucesivamente, hasta e incluyendo un conjugado que tiene agentes activos "q" unidos al núcleo del polímero. La composición resultante tendrá un valor total de carga de fármaco, promediada sobre las especies conjugadas contenidas en la composición. Idealmente, la composición comprenderá una mayoría, por ejemplo, mayor del 50%, pero más preferiblemente mayor del 60%, aún más preferiblemente mayor del 70%, aún más preferiblemente mayor del 80%, y más preferiblemente mayor del 90% de los conjugados de polímeros completamente cargados del fármaco (esto es, tienen moléculas de agente activo "q" para los brazos "q", una única molécula de agente activo para cada brazo).
- 20
- 25

Como ilustración, en un caso en el que el conjugado de polímero multi-brazos contiene cuatro brazos de polímero, el valor idealizado del número de moléculas de fármaco unidas covalentemente por polímero multi-brazos es cuatro, y, con respecto a la descripción de promedio en el contexto de una composición de dichos conjugados, habrá un valor (esto es, un porcentaje) de moléculas de fármaco cargadas en un polímero multi-brazos que oscila desde

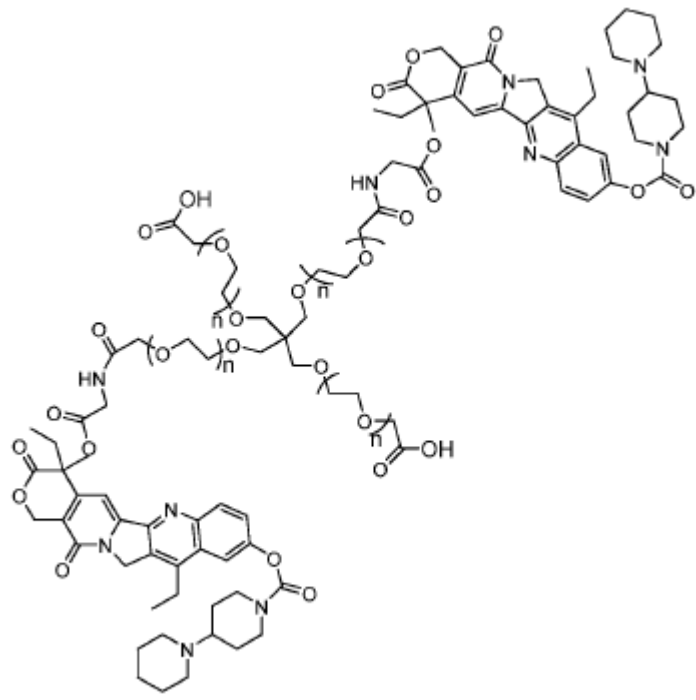
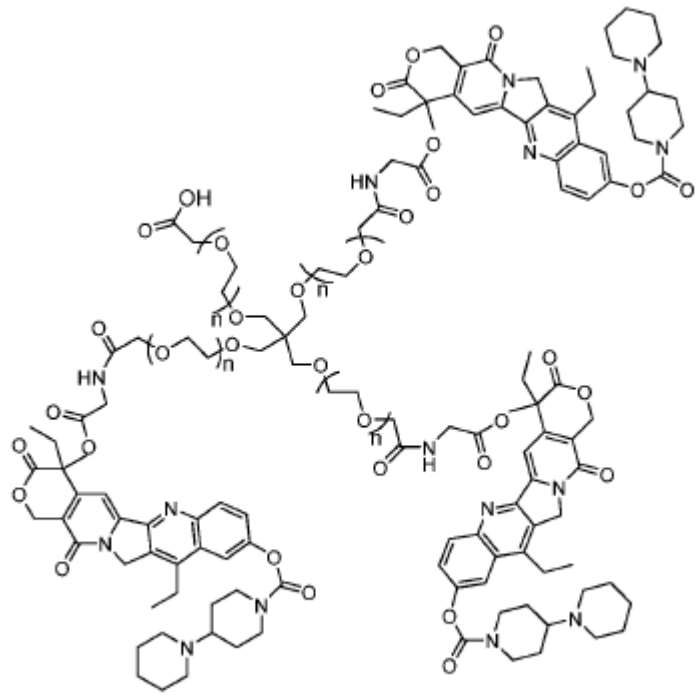
30 aproximadamente 90% a aproximadamente 100% del valor idealizado. Es decir, el número promedio de moléculas de fármaco unidas covalentemente a un polímero de cuatro brazos dado (como parte de una composición de polímero de cuatro brazos) es por lo general del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100% del

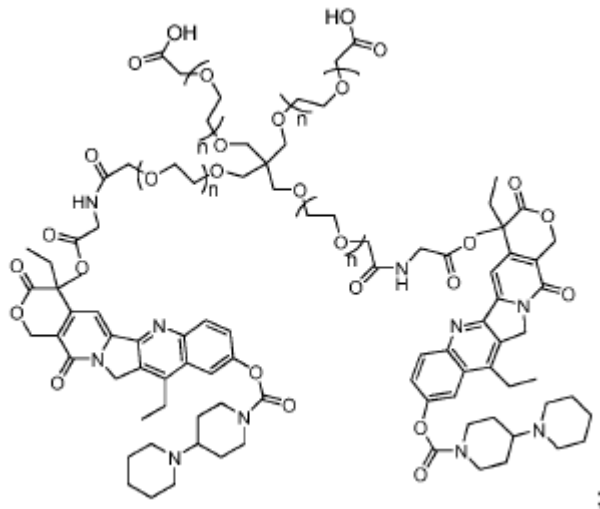
valor completamente cargado. Esto corresponde a un número promedio de D por conjugado de polímero multi-brazos que oscila desde aproximadamente 3.60 a 4.0.

5 En otra realización más, para una composición de conjugado de polímero multi-brazos, por ejemplo, donde el número de brazos de polímero oscila desde aproximadamente 3 a aproximadamente 8, por ejemplo, mayor del 50%, pero más preferiblemente mayor del 60%, aún más preferiblemente mayor del 70%, aún más preferiblemente mayor del 80% y más preferiblemente mayor del 90%) de las especies presentes en la composición son aquellas que tienen un número idealizado de moléculas de fármaco unidas al núcleo del polímero ("q") o aquellas que tienen una combinación de moléculas de fármaco ("q") y ("q-1") unidas al núcleo del polímero.

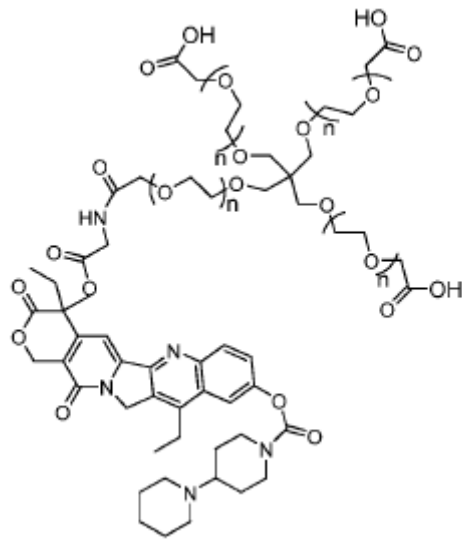
10 En ciertos casos, se prepara un conjugado de polímero multi-brazos tal como se describe en este documento, donde el conjugado resultante presenta un alto grado de sustitución o carga de fármaco en el contexto de los intervalos proporcionados anteriormente. Los conjugados ilustrativos preparados de este modo generalmente tendrán un valor de carga de fármaco de al menos el 90%, y pueden poseer por lo general valores de carga de fármaco mayores del 91%, o mayores del 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, y en algunos casos, al 100% del valor completamente cargado. En particular, los conjugados de polímeros multi-brazos preparados a partir de materiales de partida poliméricos de multi-brazos que se preparan, por ejemplo, de acuerdo con la metodología de alcoxilación proporcionada en este documento, pueden mostrar valores de sustitución del fármaco más altos, debido, al menos en parte, a la pureza del material de partida polimérico. Como ejemplo, el PEG-CM-SCM de 4 brazos (por ejemplo, que tiene un peso molecular mayor de aproximadamente 10 kilo dalton) preparado a partir de PEG-OH de 4 brazos preparado según el método de alcoxilación proporcionado en este documento, puede poseer, en promedio, un mayor nivel de pureza con respecto a las especies de polímeros particulares presentes en el material reactivo PEG-CM-SCM de 4 brazos que el obtenido con otros materiales de partida de PEG-OH de 4 brazos disponibles en el mercado (por ejemplo, que tienen menos impurezas de polímero de bajo peso molecular). El nivel de pureza de un material de partida de PEG de multi-brazos, especialmente los de peso molecular más alto, puede contribuir a la pureza del producto conjugado final en el caso de que los materiales poliméricos no deseados presentes en el material de partida polimérico sean "transportados" en las siguientes etapas de transformación. En particular, al emplear metodologías de síntesis que tienen etapas de reacción de alto rendimiento, por ejemplo, carboximetilación, el acoplamiento a un agente activo tal como glicina-irinotecán desprotegido, el uso de un material de partida polimérico que tiene una cantidad relativamente alta de impurezas poliméricas, puede afectar la pureza y los valores de carga del fármaco de las especies conjugadas resultantes, en ciertos casos por varios por cientos. Además, la presencia de incluso un pequeño porcentaje de especies de conjugado de polímero de bajo peso molecular en el conjugado de sal mixta final puede conducir a una biodisponibilidad reducida, ya que los conjugados de pequeño peso molecular se eliminarán más rápidamente. Los conjugados de polímeros preparados a partir de materiales de partida preparados usando el método de alcoxilación descrito en este documento pueden, por lo tanto, presentar una mayor biodisponibilidad que los conjugados de polímeros preparados a partir de materiales de partida de brazos múltiples disponibles en el mercado que contienen hasta, por ejemplo, 20% (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20%), de bajo peso molecular u otras impurezas de polímeros.

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

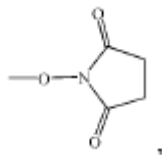




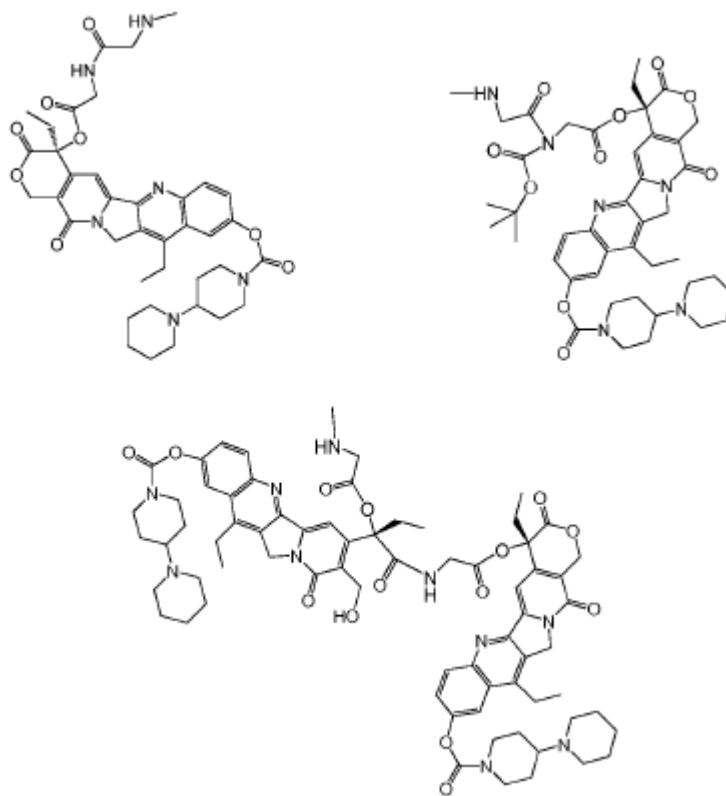
y



- 5 Para un extremo de brazo de polímero dado que se muestra arriba que tiene un ácido carboxílico (y por lo tanto no está covalentemente unido al fármaco, por ejemplo, irinotecán), otros extremos posibles que se extienden desde el brazo de 4 brazos-PEG-CM (-CH₂C(O)-) incluyen OH, -OCH₃,



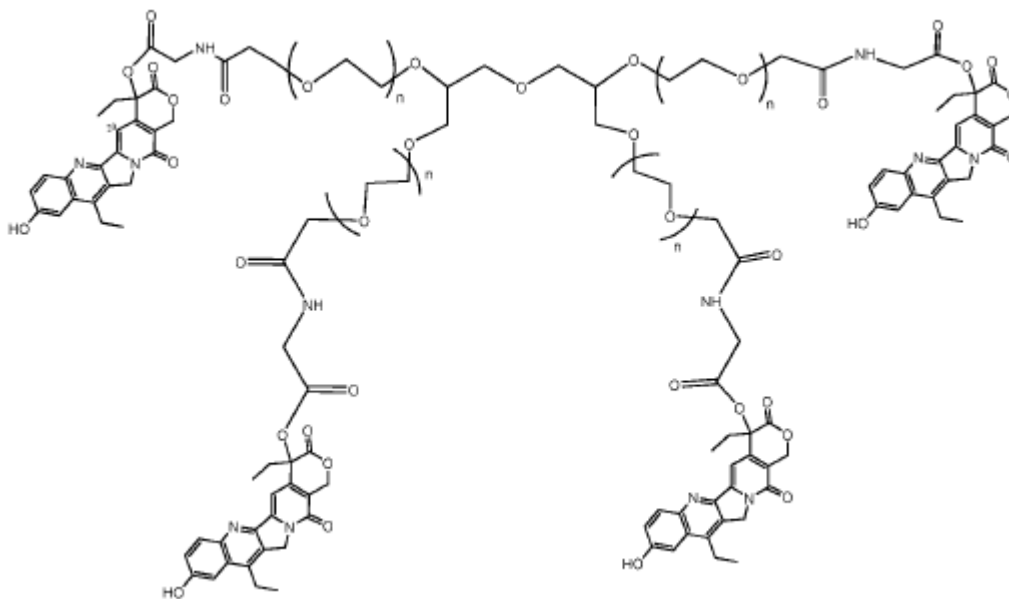
-NH-CH₂-C(O)-OH, NH-CH₂-C(O)-OCH₃,



Las composiciones de conjugado de polímero multi-brazos proporcionadas en este documento pretenden abarcar cualquiera y todas las formas estereoisoméricas de los conjugados comprendidos en tales composiciones. En una realización particular del conjugado, la estereoquímica en C-20 de irinotecán, cuando está en forma conjugada tal como en composiciones de PEG-Gly-Irino de 4 brazos, permanece intacta, esto es, C-20 conserva su configuración (S) en su forma conjugada. Véase, por ejemplo, el ejemplo 4.

Otra estructura de multi-brazos preferida es un pentaeritritolil PEG de 4 brazos modificado con carboximetilo que tiene un enlazante de glicina que interviene entre la porción de polímero y el agente activo (la porción de polímero y el enlazante se muestran arriba), donde el agente activo es 7-etil-10-hidroxi-camptotecina. De nuevo, en este documento se describen conjugados en los que el polímero multi-brazos (i) está completamente cargado, además de tener (ii) tres moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo, (iii) dos moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente a las mismas, y (iv) una molécula de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unida covalentemente al núcleo del polímero de cuatro brazos.

Otra estructura representativa más de conjugado multi-brazos es un dímero de glicerol de 4 brazos modificado con carboximetilo (3,3'-oxidipropano-1,2-diol) PEG que tiene moléculas 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) covalentemente unidas al núcleo del polímero. Conjugados en los que el núcleo del polímero multi-brazos está completamente cargado con el fármaco (esto es, tiene cuatro moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo), o está menos cargado por completo (esto es, tiene uno, dos o tres moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina unidas covalentemente al mismo) se describen en este documento. El conjugado que tiene el fármaco (esto es, 7-etil-10-hidroxi-camptotecina) unido covalentemente a cada brazo de polímero se muestra a continuación.

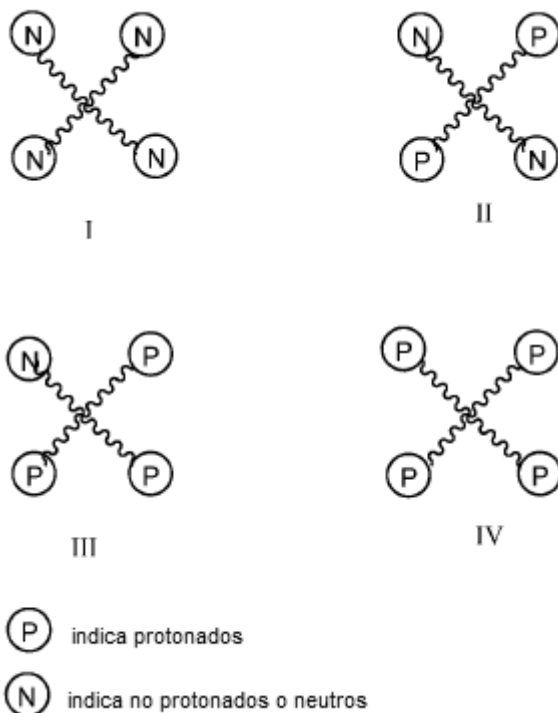


En otra realización ilustrativa más, el conjugado es una estructura de multi-brazos que comprende un dímero de glicerol (3,3'-oxidipropano-1,2-diol) PEG de 4 brazos modificado con carboximetilo que tiene moléculas de irinotecán unidas covalentemente al núcleo del polímero. Se incluyen en este documento las realizaciones en las que el núcleo del polímero multi-brazos está completamente cargado con el fármaco (esto es, que tiene cuatro moléculas de irinotecán unidas covalentemente al mismo), o está menos cargado por completo (esto es, que tiene una, dos o tres moléculas de irinotecán unidas covalentemente al mismo).

Parámetros de las sales mixtas

Las composiciones en cuestión pueden ser, entre otras cosas, sales de ácidos mixtas parciales. Es decir, los conjugados de sales mixtas se proporcionan en una composición tal que los átomos de nitrógeno básicos en el conjugado (así como en la composición a granel) pueden estar presentes individualmente en formas protonadas o no protonadas con los átomos de nitrógeno protonados (denominados como sales de ácidos) que tienen uno de los dos contraiones diferentes. Un anión corresponde a la base conjugada de un ácido inorgánico fuerte tal como un ácido hidrogenado, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido nitroso; el otro anión corresponde a la base conjugada de un ácido orgánico fuerte tal como el trifluoroacetato. Las composiciones de sales de ácidos mixtas objeto se preparan de forma estable y reproducible.

Una sal de ácido mixta como se proporciona en este documento se caracteriza en términos de sus propiedades a granel o macro. Es decir, los átomos de nitrógeno básicos (esto es, los grupos amino) en el conjugado existen individualmente en forma neutra (no protonada) o protonada, las formas protonadas asociadas con uno de los dos posibles contraiones diferentes. Mientras que las presentes composiciones se caracterizan en base a sus propiedades globales, diferentes especies moleculares individuales están contenidas dentro de la composición a granel. Tomando el conjugado de polímero de 4 brazos de ejemplo descrito en el ejemplo 1, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, el producto de sal de ácido mixta contiene cualquiera de varias especies moleculares individuales. Una especie molecular es una en la que cada brazo de polímero contiene una molécula de irinotecán que está en forma neutra, esto es, su grupo amino está no protonado. Véase la estructura I a continuación. Otra especie molecular es una en la que cada brazo de polímero contiene una molécula de irinotecán en forma protonada. Véase la estructura IV a continuación. Una especie molecular adicional es aquella en la que tres de los brazos de polímero contienen una molécula de irinotecán que está en forma protonada, y un brazo de polímero contiene una molécula de irinotecán en forma neutra (estructura III). En otra especie molecular, dos de los cuatro brazos de polímero contienen una molécula de irinotecán en forma neutra (esto es, su grupo amino no está protonado), y dos de los cuatro brazos de polímero contienen una molécula de irinotecán que está en forma protonada (estructura II). Dentro de todas las especies moleculares descritas anteriormente, con la excepción de la primera forma "totalmente neutra", es posible que haya subespecies de moléculas que contengan diferentes combinaciones de contraiones. El siguiente esquema ilustra varias combinaciones posibles; La siguiente tabla indica posibles combinaciones de sales de ácido protonado correspondientes a cada estructura.



I No P	combinaciones II P, P	combinaciones III P, P, P	combinaciones IV P, P, P, P
todo desprotonado, esto es, lo mismo	TFA, TFA, Cl, Cl	TFA, TFA, TFA Cl, Cl, Cl TFA, Cl, Cl, TFA, TFA	Cl, Cl, Cl, Cl TFA, TFA, TFA, TFA Cl, TFA, TFA, TFA Cl, Cl, TFA, TFA, Cl, Cl, Cl

5 Como se demuestra en el ejemplo 1 y en el ejemplo 6, se obtienen ciertos conjugados de profármacos poliméricos de ejemplo como sales de ácidos mixtas de ambos ácido clorhídrico y ácido trifluoroacético. En el ejemplo 1, el ácido clorhídrico se introduce mediante el uso de una forma de sal de ácido de la molécula de agente activo para formar el conjugado polímero resultante, mientras que el ácido trifluoroacético se introduce en la mezcla de reacción en una etapa de desprotección (aunque se puede usar cualquier ácido fuerte). Tras la unión covalente del agente activo (o agente activo modificado como se ilustra en el ejemplo 1) al reactivo polimérico soluble en agua, y el tratamiento con una base, incluso en los casos en que se llevan a cabo etapas de purificación adicionales, el conjugado resultante se obtiene de forma inesperada y reproducible como una sal de ácido mixta parcial que tiene propiedades sorprendentes y beneficiosas, que se describirá con mayor detalle a continuación. Incluso después de repetidas purificaciones, se ha descubierto que existe una asociación persistente y repetible del ácido inorgánico fuerte, ácido clorhídrico y ácido trifluoroacético de ejemplo en el conjugado resultante. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2, la tabla 1 y el ejemplo 6, la tabla 2.

10 Los conjugados de sal de ácido mixta descritos en este documento contienen preferiblemente proporciones e intervalos bastante bien definidos de cada componente (esto es, base libre, sal de ácido inorgánico, sal de ácido orgánico). Las características del producto de sal de ácido mixta, por supuesto, pueden variar dependiendo de los cambios en las condiciones de síntesis empleadas. Al observar las composiciones preparadas según el método descrito en el ejemplo 1, la sal de ácido mixta de conjugado de polímero se recupera consistentemente al tener la mayor cantidad molar relativa de átomos de nitrógeno básicos en forma protonada en comparación con los nitrógenos de base libre (o no protonados) (calculado con respecto a los átomos de nitrógeno básicos en el agente activo). De este modo, si todos los nitrógenos básicos en la porción de agente activo del conjugado no están protonados, el por ciento en moles correspondiente sería 100. En una realización, la composición de sal mixta parcial se caracteriza por tener la mayor cantidad molar relativa de sal de TFA (en comparación con la sal de

clorhidrato y base libre). La composición de sal mixta parcial se puede caracterizar porque comprende por lo general una cantidad molar relativa menor de sal hidroháluro (en comparación con la sal de TFA), e incluso menos de nitrógenos no protonados (base libre). La composición de sal mixta parcial puede comprender aproximadamente 30 a 75 por ciento en moles de sal de TFA, aproximadamente 15 - 45 por ciento en moles de sal de ácido hidrogenado y 2 a 55 por ciento en moles de base libre. Por supuesto, estas cantidades relativas pueden variar con las variaciones en las condiciones del procedimiento para obtener la sal de ácido mixta. Por ejemplo, en otra realización más, el por ciento en moles de sal de ácido trifluoroacético oscila desde aproximadamente 45 a 70, el por ciento en moles de sal de ácido clorhídrico oscila desde aproximadamente 20 a 38, y el por ciento en moles de base libre oscila desde aproximadamente 10 a 35. En general, para los primeros lotes de conjugados preparados, los grupos de nitrógeno básico de agente activo (por ejemplo, amino) dentro del conjugado están presentes en el por ciento en moles más alto como la sal del ácido trifluoroacético, en el segundo por ciento en moles más alto como la sal del ácido clorhídrico, y en el tercer o más alto por ciento en moles como la base libre. En ciertas realizaciones, los porcentajes en moles de sal de clorhidrato y base libre en el conjugado son aproximadamente los mismos. Tomando las cantidades molares relativas promedio de sal de ácido trifluoroacético, sal de clorhidrato y base libre en el conjugado sobre lotes probados, en promedio, el producto contenía aproximadamente 50 por ciento en moles de sal de ácido trifluoroacético, aproximadamente 30 por ciento en moles de sal de ácido clorhídrico y aproximadamente 20 por ciento en moles de base libre.

Pasando ahora al ejemplo 6, se puede ver que se han preparado conjugados de sal de ácido mixtas, donde las cantidades molares relativas de cada una de la sal de TFA, sal de clorhidrato y material no protonado entre los cuatro lotes diferentes presentan un alto nivel de consistencia. De manera similar a los resultados del ejemplo 1, la sal de ácido mixta del conjugado de polímero se recupera consistentemente al tener la mayor cantidad molar relativa de átomos de nitrógeno básicos en forma protonada en comparación con los nitrógenos de base libre (o no protonados) (calculados con respecto a los átomos de nitrógeno básicos en el agente activo). En los lotes resumidos en la tabla 2, las composiciones de sales mixtas parciales tienen la mayor cantidad molar relativa de sal de HCl en comparación con la sal de TFA y la base libre. En otra realización particular más, la composición de sal mixta parcial se puede caracterizar porque comprende por lo general una cantidad molar relativa menor de sal de TFA en comparación con la sal de HCl, e incluso menos de nitrógenos no protonados (base libre). La composición de sal mixta parcial comprenderá al menos aproximadamente 25 por ciento en moles de TFA. Los intervalos de ejemplo de sal de TFA dentro de la composición de sal mixta pueden variar desde aproximadamente 20-45 por ciento en moles, o desde aproximadamente 24-38 por ciento en moles, o incluso desde aproximadamente 35 a 65 por ciento en moles. Con respecto a la sal de clorhidrato, la composición puede poseer desde aproximadamente 30 a 65 por ciento en moles clorhidrato, o desde aproximadamente 32 a 60 por ciento en moles clorhidrato, o preferiblemente, desde aproximadamente 35 a 57 por ciento en moles de clorhidrato.

En general, se encontró que los conjugados de sal de ácido mixta descritos en este documento poseen mayor estabilidad que ya sea la sal de HCl pura o las formas de base libre del conjugado. Véase, por ejemplo, el ejemplo 3 y la figura 1, que ilustra los resultados de los ensayos de estabilidad al estrés en composiciones que contienen cantidades variadas de formas de sal y base libre de un conjugado ejemplar, 4-brazo-PEG-GLY-IRT. Se observó una correlación positiva entre el aumento de la estabilidad hacia la hidrólisis y el aumento del porcentaje molar de sal en el producto conjugado final. Sobre la base de las pendientes de los gráficos, se puede determinar que a medida que aumenta el contenido de base libre, disminuye la estabilidad del producto. Se observó una correlación entre la disminución del producto y el aumento de irinotecán a lo largo del tiempo, lo que condujo a una determinación de que el modo de descomposición observado en las condiciones empleadas fue la hidrólisis de enlace éster.

La figura 2 ilustra además que la estabilidad (o resistencia) contra la degradación hidrolítica es mayor para los conjugados que poseen un mayor grado de grupos de aminas protonadas (esto es, sal de ácido). Por ejemplo, se observó que el producto conjugado que contenía 14 por ciento molar o más de base libre era notablemente menos estable frente a la hidrólisis que el correspondiente producto rico en sal de ácido.

Adicionalmente, como se ilustra en la figura 3, el producto rico en la sal de clorhidrato parece ser más susceptible a la escisión del esqueleto de polímero soluble en agua que la forma de sal mixta que contiene una cantidad medible de base libre. De hecho, la descomposición del conjugado de sal mixta parece atribuirse principalmente a la liberación hidrolítica del fármaco en lugar de la escisión del esqueleto de polímero. Sin embargo, tal descomposición del esqueleto parece ser relevante solo en condiciones de estrés acelerado.

Dado que los dos modos de descomposición observados parecen mostrar tendencias opuestas con respecto a la estabilidad o resistencia a la degradación en comparación con el contenido de sal/base libre, esto puede (pero no necesariamente) indicar una región preferida de la composición de sal que posee una mayor estabilidad que cualquiera de los extremos de sal completa o base libre completa. Además, basándose en estudios preliminares, la sal mixta parece poseer una estabilidad algo mayor que ya sea la forma de la base libre o la sal de clorhidrato, lo que indica de este modo su superioridad inesperada sobre cualquiera de las formas tradicionales de base pura o sal única de las mismas.

Además, las formas de sales mixtas del conjugado se preparan con una alta consistencia de lote a lote, es decir, que tienen relaciones molares relativamente consistentes de trifluoroacetato, haluro (u otro anión de ácido inorgánico

apropiado) y base libre en el producto conjugado final. Como puede verse en la tabla 1 del ejemplo 2, aproximadamente el 50 por ciento en moles de los grupos de nitrógeno básico del fármaco están asociados con el ácido trifluoroacético. Este porcentaje de moles se observa de manera bastante consistente de lote a lote. De manera similar, aproximadamente el 30 por ciento en moles de los grupos amino conjugado de fármacos (u otro nitrógeno básico) se asocian de manera bastante consistente con el ácido clorhídrico, esto es, se proporciona como la sal HCl. De ello se deduce que la forma de base libre de los grupo amino del fármaco (u otro nitrógeno básico) en el conjugado también se prepara de forma estable y reproducible. Volviendo a los resultados proporcionados en el ejemplo 6, basado en un método de fabricación ligeramente revisado, se puede ver que a pesar de las diferencias en las cantidades molares relativas reales de las especies protonadas y no protonadas, y dentro de las especies protonadas, TFA versus sal de clorhidrato, sales de ácidos mixtas fueron reproducidos de forma reproducible.

Estos resultados colectivos indican las ventajas inesperadas de una sal mixta parcial de un conjugado de agente polimerizante soluble en agua (en una realización, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos) sobre la base libre sola o cualquier sal en la ausencia del otro. La sal mezclada parece tener mayor estabilidad que ya sea la base libre o la sal de clorhidrato, indicando de este modo sus ventajas aparentes sobre cualquiera de las formas de base o sal puras más habituales.

Conjugados de sales mixtas - Métodos de formación

Una sal de ácido mixta de un conjugado de polímero soluble en agua se puede preparar fácilmente a partir de materiales de partida disponibles en el mercado en vista de la guía presentada en este documento, junto con lo que se conoce en la técnica. Como se describió anteriormente, el conjugado de agente de polímero de sal mixta comprende un polímero soluble en agua unido covalentemente a una o más moléculas de agente activo, cada una de las cuales posee uno o más átomos de nitrógeno básico, tal como un grupo amino, cuando están en forma conjugada. Los grupos amina en el conjugado resultante pueden ser grupos amino primarios, secundarios o terciarios.

Los reactivos poliméricos solubles en agua lineales, ramificados y de multi-brazos están disponibles a partir de una serie de fuentes comerciales, como se describe anteriormente. Alternativamente, los reactivos de PEG tales como un polímero de PEG reactivo de multi-brazos se pueden preparar sintéticamente como se describe en este documento.

La sal de ácido mixta parcial se puede formar usando técnicas de acoplamiento químico conocidas para la unión covalente de polímeros activados, tal como un PEG activado, a un agente biológicamente activo (véase, por ejemplo, POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, American Chemical Society, Washington, DC (1997); y las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2009/0074704 y 2006/0239960). La selección de grupos funcionales, enlazantes y grupos protectores apropiados para lograr una sal de ácido mixta de acuerdo con la invención dependerá, en parte, de los grupos funcionales en el agente activo y en el material de partida del polímero y será evidente para un experto en el arte, basado en el contenido de la presente divulgación. En vista de ciertas características de la sal de ácido mixta parcial, el método comprende la provisión de un agente activo que contiene amina (u otro nitrógeno básico) en forma de una sal de adición de ácido inorgánico, y una etapa de tratamiento con ácido trifluoroacético. Alternativamente, el producto conjugado o un intermedio en la ruta sintética se puede hacer reaccionar con un ácido inorgánico para formar una sal de adición de ácido inorgánico en una etapa posterior en el procedimiento, para introducir así un segundo contraión (además del trifluoroacetato) en la reacción. La referencia a un "agente activo" en el contexto del método de síntesis pretende abarcar un agente activo opcionalmente modificado para poseer un enlazante covalentemente unido al mismo, para facilitar la unión al polímero soluble en agua.

En general, el método comprende las etapas de (i) desproteger una sal de ácido inorgánico de un agente activo que contiene amina (u otro nitrógeno básico) en forma protegida por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para formar una sal de ácido mixta desprotegida, (ii) acoplar la sal de ácido inorgánico desprotegida de la etapa (i) con un reactivo polimérico soluble en agua en presencia de una base para formar un conjugado de polímero-agente activo, y (iii) recuperación del conjugado de polímero-agente activo. La composición de conjugado de polímero-agente activo resultante se caracteriza por tener uno o más grupos amino (u otros que contienen nitrógeno básico) presentes en una combinación de forma de base libre, sal de ácido y sal de TFA. Por lo tanto, el producto comprende tanto sal de ácido inorgánico como sal de trifluoroacetato, así como una proporción de grupos básicos en el conjugado que están en forma de base no protonada o libre. De este modo, las cantidades molares combinadas de sal de ácido inorgánico y sal de ácido trifluoroacético son menores que el número total de amino básico u otros nitrógenos contenidos en el producto conjugado.

En cuanto a una de las clases preferidas de agentes activos, las camptotecinas, dado que el grupo 20-hidroxilo de los compuestos dentro de la familia de las camptotecinas está impedido estéricamente, es difícil lograr una reacción de conjugación de una sola etapa con rendimientos significativos. Como resultado, un método preferido es hacer reaccionar el grupo 20-hidroxilo del material de partida bioactivo, por ejemplo, clorhidrato de irinotecán, con un enlazante corto o unidad estructural espaciadora que lleva un grupo funcional apropiado para la reacción con un polímero soluble en agua. Dicho enfoque es aplicable a muchas moléculas pequeñas, particularmente aquellas que tienen un sitio de unión covalente que es inaccesible para un reactivo polimérico entrante. Los enlazantes preferidos

para la reacción con un grupo hidroxilo para formar un enlace éster incluyen t-BOC-glicina u otros aminoácidos tales como alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina que tienen un grupo amino protegido y un grupo ácido carboxílico disponible (Véase Zalipsky et al., "Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols", Eur. Polym. J., Vol. 19, No. 12, pp. 1177-1183 (1983)). También se pueden usar otras unidades estructurales espaciadoras o enlazantes que tienen un grupo ácido carboxílico disponible u otro grupo funcional reactivo con un grupo hidroxilo y que tienen un grupo amino protegido en lugar de los aminoácidos descritos anteriormente.

Los grupos protectores lábiles típicos incluyen t-BOC y FMOC (9-fluorenilmetiloxycarbonilo). El t-BOC es estable a temperatura ambiente y se elimina fácilmente con soluciones diluidas de ácido trifluoroacético y diclorometano. El FMOC es un grupo protector de base lábil que se elimina fácilmente con soluciones concentradas de aminas (generalmente 20-55% de piperidina en N-metilpiperidona).

En el presente ejemplo, el grupo carboxilo de la glicina N-prottegida reacciona con el grupo 20-hidroxilo del clorhidrato de irinotecán (u otra camptotecina apropiada, tal como la 7-etil-10-hidroxi-camptotecina, o cualquier otro agente activo) en presencia de un agente de acoplamiento (por ejemplo, dicitohexilcarbodiimida (DCC)) y un catalizador de base (por ejemplo, dimetilaminopiridina (DMAP) u otra base apropiada) para proporcionar un agente activo modificado con enlazante protegido en N, por ejemplo, t-Boc-glicina-irinotecán clorhidrato. Aunque se ejemplifica clorhidrato, se pueden usar otras sales de ácidos inorgánicos. Preferiblemente, cada etapa de reacción se lleva a cabo bajo una atmósfera inerte.

En una etapa posterior, el grupo protector de amino, t-BOC (N-tert-butoxicarbonilo), se elimina por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) en condiciones de reacción apropiadas. Es en esta etapa que el ácido trifluoroacético se introduce por lo general en la mezcla de reacción. El producto es un agente activo modificado con el enlazante, por ejemplo, 20-TFA/HCl de glicina-irinotecán. Las condiciones de reacción ilustrativas se describen en el ejemplo 1, y pueden optimizarse adicionalmente mediante optimización de rutina por parte de un experto en el arte. Opcionalmente, las cantidades molares de ácido inorgánico y ácido trifluoroacético en el producto desacoplado se determinan mediante un método analítico apropiado, como HPLC o cromatografía iónica, para permitir una mayor precisión y consistencia del producto en la etapa de acoplamiento.

El agente activo desprotegido (opcionalmente modificado con enlazante), por ejemplo, 20-TFA/HCl de glicina-irinotecán, luego se acopla a un reactivo polimérico deseado, por ejemplo, pentaeritritolil-PEG-succinimida de 4 brazos (o cualquier otro homólogo de éster activado de manera similar) en presencia de un agente de acoplamiento (por ejemplo, hidroxibenciltriazol (HOBT)) y una base (por ejemplo, DMAP, trimetilamina, trietilamina, etc.) para formar el conjugado deseado. En una realización del método, la cantidad de base añadida en la etapa de conjugación está en un intervalo desde aproximadamente 1.0 a 2.0 veces, o desde aproximadamente 1.0 a 1.5 veces, o desde aproximadamente 1.0 a 1.05 veces, la suma de los moles de TFA y los moles de ácido inorgánico determinados para el material de partida, en este caso, 20-TFA/HCl de glicina-irinotecán. En virtud de ajustar la cantidad de base al contenido de sal de ácido del 20-TFA/HCl de glicina-irinotecán, se mantiene una proporción relativamente consistente de TFA, ácido inorgánico (por ejemplo, HCl) y la base en la etapa de acoplamiento, para formar así un conjugado parcial de sal de ácido mixta que tiene un rango consistentemente estrecho de contenido de TFA y ácido inorgánico. Preferiblemente, la sal de ácido parcial mixta resultante se prepara de manera reproducible de modo que las cantidades molares relativas de sal de adición inorgánica, sal de ácido trifluoroacético y base libre en la composición del conjugado no varían más de aproximadamente el 25%, e incluso más preferiblemente no más desde aproximadamente el 15%, de un lote a otro. Para los fines de hacer tal determinación, la medida de consistencia anterior se determina sobre al menos cinco lotes (por ejemplo, de 5 a 7), donde los lotes fallidos que son claramente atípicos se excluyen del cálculo.

Aunque la etapa de conjugación se realiza en presencia de un exceso de base, es sorprendente descubrir que el conjugado resultante se forma de manera estable como una sal de ácido mixta parcial, esto es, tal que una cantidad significativa de amino básico u otros grupos que contienen nitrógeno en el conjugado están protonados en lugar de estar en forma de base libre. Los rendimientos de reacción para la reacción de acoplamiento son por lo general altos, mayor de aproximadamente el 90% (por ejemplo, aproximadamente el 95% en promedio).

El conjugado de sal de ácido mixta parcial se recupera, por ejemplo, por precipitación con éter (por ejemplo, metil tert-butil éter, dietil éter) u otro solvente apropiado. El producto se puede purificar adicionalmente por cualquier método apropiado. Los métodos de purificación y aislamiento incluyen precipitación seguida de filtración y secado, así como cromatografía. Los métodos cromatográficos apropiados incluyen cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía instantánea Biotage. Un método preferido de purificación es la recristalización. Por ejemplo, la sal de ácido mixta parcial se disuelve en un sistema solvente único o mixto apropiado (por ejemplo, isopropanol/metanol), y luego se deja cristalizar. La recristalización se puede realizar varias veces, y los cristales también se pueden lavar con un solvente apropiado en el que sean insolubles o solo ligeramente solubles (por ejemplo, metil tert-butil éter o metil-tert-butil éter/metanol). El producto purificado puede opcionalmente ser secado al aire o al vacío. Incluso después de una purificación repetida, el producto se recupera por lo general como una sal de ácido mixta en lugar de como la base libre. Incluso después de un tratamiento adicional con una base, el conjugado permaneció en forma de una sal de ácido mixta parcial que tiene las características descritas en este documento.

El conjugado resultante es una sal mixta parcial, esto es, cuando ciertos átomos de nitrógeno básicos están en forma de base neutra o libre y otros átomos de nitrógeno básicos, por ejemplo, grupos amina, están protonados. Los grupos amina protonados están en forma de sales de ácidos con diferentes aniones, un anión correspondiente a la base conjugada de un ácido inorgánico, el otro anión es trifluoroacetato (o la base conjugada de un ácido orgánico como se describió anteriormente). Como se usa en este documento, una sal mixta parcial se refiere al producto a granel en lugar de referirse necesariamente a especies moleculares individuales contenidas dentro del producto a granel. De este modo, dependiendo de la estructura del conjugado particular, las especies moleculares individuales contenidas dentro de la sal mixta pueden contener grupos amina que están en base libre y en forma protonada como se describe anteriormente. Alternativamente, una sal mixta puede contener una mezcla de especies moleculares (por ejemplo, que tienen todos los grupos amina en forma de base libre, que tienen todos los grupos amina en forma protonada, ya sea como la sal de un ácido inorgánico, la sal del ácido trifluoroacético u otro ácido orgánico apropiada, o una mezcla de ambos, diversas combinaciones de los anteriores, etc.), de manera que las características del producto a granel son como se describen en este documento. En el caso de que el conjugado sea un conjugado de polímero que comprenda solo un grupo de amina de agente activo, la sal mixta debe ser necesariamente tal que el producto a granel sea una mezcla de especies moleculares para llegar a una sal mixta como se describe en general en este documento.

Preferiblemente, el producto de sal de ácido mixta se almacena en condiciones apropiadas para proteger el producto de la exposición a uno o más de oxígeno, humedad y luz. Se puede emplear cualquiera de una serie de condiciones de almacenamiento o protocolos de envasado para proteger adecuadamente el producto de sal de ácido durante el almacenamiento. En una realización, el producto se envasa en una atmósfera inerte (por ejemplo, argón o nitrógeno) mediante su colocación en una o más bolsas de polietileno, y se coloca en una bolsa sellable con calor de poliéster revestida de aluminio.

Los porcentajes en moles representativos de sal de TFA, sal de ácido clorhídrico y base libre determinados sobre varios lotes de PEG-Gly-Irino de 4 brazos se resumen en la tabla 1 (Ejemplo 2) y la tabla 2 (Ejemplo 6). Como puede verse, inesperadamente, incluso después del tratamiento con base y purificación repetida, el producto conjugado se aísla no como una sola especie conjugada no protonada, sino como una sal de ácido mixta.

Sales mixtas - Composiciones farmacéuticas que contienen conjugados de sal mixta

Los conjugados de sal de ácido mixta parcial pueden estar en forma de una formulación o composición farmacéutica ya sea para uso veterinario o médico humano. Una formulación ilustrativa comprenderá por lo general un conjugado de sal de ácido mixta parcial en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico, estabilizante o similar. El (los) portador (es) deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser excesivamente perjudiciales para el receptor/paciente. El conjugado de sal de ácido mixta parcial está opcionalmente contenido en forma de dosis a granel o unidad en un recipiente o receptáculo que incluye un empaque que protege el producto de la exposición a la humedad y al oxígeno.

La composición farmacéutica puede incluir excipientes/aditivos o portadores poliméricos, por ejemplo, polivinilpirrolidonas, celulosas derivadas tales como la hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, Ficolls (un azúcar polimérico), hidroxietilalmidón (HES), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutiléter- β -ciclodextrina), polietilenglicoles y pectina. Las composiciones pueden incluir además diluyentes, soluciones reguladoras, aglutinantes, desintegrantes, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo antioxidantes), agentes saborizantes, agentes enmascaradores del sabor, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de sodio), agentes antimicrobianos (por ejemplo, cloruro de benzalconio), edulcorantes, agentes antiestáticos, surfactantes (por ejemplo, polisorbatos tal como "TWEEN 20" y "TWEEN 80", y pluronics tal como F68 y F88, disponibles en BASF), ésteres de sorbitán, lípidos (por ejemplo, fosfolípidos tal como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas), ácidos grasos y ésteres grasos, esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA, zinc y otros cationes apropiados). Otros excipientes farmacéuticos y/o aditivos apropiados para su uso en las composiciones según la invención se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), y en the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y en "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Third Ed., Ed. A.H. Kibbe, Pharmaceutical Press, 2000.

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

En una realización particular, la sal de ácido mixta, por ejemplo, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, se proporciona en forma liofilizada en un vial estéril de un solo uso para uso por inyección. En una realización, la cantidad de producto conjugado contenida en el vial de un solo uso es el equivalente a una dosis de 100 mg de irinotecán. Más particularmente, la composición liofilizada incluye PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos combinados con solución reguladora de lactato a pH 3.5. Es decir, la composición liofilizada se prepara combinando PEG-Gly-Irino-20K de 4

- 5 brazos, por ejemplo, en una cantidad equivalente a una dosis de 100 mg de irinotecán, con aproximadamente 90 mg de ácido láctico, y el pH de la solución ajustada a 3.5 por ya sea adición de ácido o base. La solución resultante se liofiliza luego en condiciones estériles y el polvo resultante se almacena a -20 °C antes de su uso. Antes de la infusión intravenosa, la composición liofilizada se combina con una solución de dextrosa, por ejemplo, una solución de dextrosa al 5% (p/p).
- 10 La cantidad de sal de ácido mixta (esto es, el agente activo) en la formulación variará dependiendo del agente activo específico empleado, su actividad, el peso molecular del conjugado y otros factores tal como la forma de dosificación, la población de pacientes objetivo, y otras consideraciones, y en general se determinarán fácilmente por un experto en el arte. La cantidad de conjugado en la formulación será la cantidad necesaria para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, por ejemplo, un agente anticancerígeno alcaloide tal como irinotecán o SN-38, a un paciente que lo necesite para lograr al menos uno de los efectos terapéuticos asociados con el compuesto, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer. En la práctica, esto variará ampliamente dependiendo del conjugado particular, su actividad, la gravedad de la condición a tratar, la población de pacientes y la estabilidad de la formulación. Las composiciones generalmente contendrán desde aproximadamente 1% en peso a
- 15 aproximadamente 99% en peso de conjugado, por lo general desde aproximadamente 2% a aproximadamente 95% en peso de conjugado, y más por lo general desde aproximadamente 5% a 85% en peso de conjugado, y también dependerán sobre las cantidades relativas de excipientes/aditivos contenidos en la composición. Más específicamente, la composición contendrá por lo general al menos aproximadamente uno de los siguientes porcentajes de conjugado: 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, o más en peso.
- 20 Las composiciones apropiadas para administración oral se pueden proporcionar como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, comprimidos y comprimidos para deshacer en la boca, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del conjugado como polvo o gránulos; o una suspensión en un licor acuoso o líquido no acuoso tal como un jarabe, un elixir, una emulsión o una corriente de aire.
- 25 Las formulaciones apropiadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del conjugado de sal de ácido mixta, que se puede formular para ser isotónica con la sangre del receptor.
- Las formulaciones de pulverización nasal comprenden soluciones acuosas purificadas del conjugado de polímero multi-brazos con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales.
- 30 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con un portador apropiado tal como manteca de cacao, o grasas hidrogenadas o ácidos carboxílicos grasos hidrogenados.
- Las formulaciones oftálmicas se preparan mediante un método similar al del aerosol nasal, excepto que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferiblemente para que coincidan con los del ojo.
- 35 Las formulaciones tópicas comprenden el conjugado de polímero multi-brazos disuelto o suspendido en uno o más medios, tales como aceite mineral, petróleo, polihidroxicóholes u otras bases usadas para formulaciones tópicas. La adición de otros ingredientes accesorios como se indicó anteriormente puede ser deseable.
- También se describen formulaciones farmacéuticas que son apropiadas para la administración como un aerosol, por ejemplo, por inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o suspensión del conjugado de polímero multi-brazos deseado o una sal del mismo. La formulación deseada se puede colocar en una cámara pequeña y nebulizarse. La nebulización se puede realizar mediante aire comprimido o energía ultrasónica para formar una pluralidad de gotitas líquidas o partículas sólidas que comprenden los conjugados o sales de los mismos.
- 40
- Sales mixtas - Métodos de uso de conjugados de sal mixta**
- 45 Las sales de ácido mixtas descritas en este documento se pueden usar para tratar o prevenir cualquier afección que responda al agente activo no modificado en cualquier animal, particularmente en mamíferos, incluidos los seres humanos. Una sal de ácido mixta representativa, pentaeritritolil-PEG-glicina-irinotecán de 4 brazos, que comprende el agente anticancerígeno, irinotecán, es particularmente útil en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- 50 Los conjugados de sales de ácidos mixtas parciales, en particular, aquellos en los que el fármaco de molécula pequeña es un agente anticancerígeno tal como un compuesto de camptotecina como se describe en este documento (por ejemplo, irinotecán o 7-etil-10-hidroxi-camptotecina) u otro oncolítico, son útiles en el tratamiento de tumores de tipo sólido tal como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer gástrico, melanoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer del conducto biliar, cáncer cerebral, cáncer cervical, cáncer del seno maxilar, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, enfermedad de Hodgkin, cáncer adrenocortical. Otros cánceres tratables con la sal de ácido mixta incluyen linfomas, leucemias, rhabdomyosarcoma y neuroblastoma. Como se indicó anteriormente, los conjugados de sales mixtas son particularmente efectivos para apuntar y acumularse en tumores sólidos. Los conjugados de sales mixtas
- 55 también son útiles en el tratamiento del HIV y otros virus.

También se ha demostrado que los conjugados representativos, tales como pentaeritritolil-PEG-glicina-irinotecán de 4 brazos, son particularmente ventajosos cuando se usan para tratar pacientes que tienen cánceres que se muestran refractarios al tratamiento con uno o más agentes anticancerosos.

5 Los métodos de tratamiento descritos en este documento comprenden administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o formulación de sal de ácido mixta parcial como se describe en este documento.

10 Los métodos adicionales incluyen el tratamiento de (i) cáncer de mama metastásico que es resistente a las terapias basadas en antraciclina y/o taxano, (ii) cáncer de ovario resistente al platino, (iii) cáncer cervical metastásico y (iv) cáncer colorrectal en pacientes con el estado del gen mutado K-Ras mediante la administración de una composición parcial de sal de ácido mixta.

En el tratamiento del cáncer de mama metastásico, se puede administrar una sal de ácido mixta de un conjugado tal como pentaeritritolil-PEG-glicina-irinotecán de 4 brazos a un paciente con cáncer de mama metastásico localmente avanzado en una cantidad terapéuticamente eficaz, donde el paciente no ha tenido más de dos tratamientos previos (no exitosos) con antraciclina y/o quimioterapia basada en taxanos.

15 Para tratar el cáncer de ovario resistente al platino, se puede administrar una composición como se proporciona en este documento a un paciente con cáncer de ovario metastásico o localmente avanzado en una cantidad terapéuticamente eficaz, donde el paciente ha mostrado progresión tumoral durante la terapia basada en platino, con un intervalo libre de progresión de menos de seis meses.

20 En otro enfoque más, se puede administrar una sal de ácido mixta (por ejemplo, tal como la del ejemplo 1) a un sujeto con cáncer colorrectal localmente avanzado, donde el tumor o tumores colorrectales tienen una mutación en el oncogén K-Ras (tipos de mutantes K -Ras) de manera que el tumor no responde a los inhibidores de EGFR, tal como el cetuximab. Los sujetos son aquellos que han fallado una terapia previa que contenía 5-FU, y también son irinotecán ingenuos.

25 Una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz de cualquier sal de ácido mixta específica variará de conjugado a conjugado, paciente a paciente, y dependerá de factores tales como el estado del paciente, la actividad del agente activo particular empleado, el tipo del cáncer, y la vía de administración.

30 Para agentes activos de tipo camptotecina, tales como irinotecán o 7-etil-10-hidroxi-camptotecina, se prefieren dosis desde aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 mg de camptotecina/kg de peso corporal, preferiblemente desde aproximadamente 10.0 a aproximadamente 60 mg/kg. Cuando se administra junto con otros agentes farmacéuticamente activos, incluso menos de la sal de ácido mixta puede ser terapéuticamente eficaz. Para la administración de una sal de ácido mixta de irinotecán, la cantidad de dosis de irinotecán oscilará por lo general entre aproximadamente 50 mg/m² y aproximadamente 350 mg/m².

35 Los métodos de tratamiento también incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o formulación de sal de ácido mixta como se describe en este documento (por ejemplo, cuando el agente activo es una molécula de tipo camptotecina) junto con un segundo agente anticancerígeno. Preferiblemente, tales conjugados a base de camptotecina, por supuesto, en forma de una sal de ácido mixta, se administran en combinación con 5-fluorouracilo y ácido folínico como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,403,569.

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

Experimental

45 La práctica de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de síntesis orgánica, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas están completamente descritas en la literatura. Los reactivos y materiales están disponibles en el mercado a menos que se indique específicamente lo contrario. Véase, por ejemplo, M. B. Smith and J. March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 6th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 2007), *supra*, and *Comprehensive Organic*
50 *Functional Group Transformations II*, Volumes 1-7, Second Ed.: A Comprehensive Review of the Synthetic Literature 1995-2003 (Organic Chemistry Series), Eds. Katritzky, A.R., et al., Elsevier Science.

55 En los siguientes ejemplos, se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados C y la presión está en o cerca de la presión atmosférica al nivel del mar.

Los siguientes ejemplos ilustran ciertos aspectos y ventajas de la presente invención.

Abreviaturas

	Ar	argón
	CM	carboximetil o carboximetileno (-CH ₂ COOH)
5	DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
	DCM	Diclorometano
	DMAP	4- (N, N-dimetilamino) piridina
	GLY	Glicina
	HCl	ácido clorhídrico
10	RP-HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa
	IPA	alcohol isopropílico
	IRT	irinotecán
	IPC	cromatografía de par iónico
	MeOH	Metanol
15	MTBE	metil tert-butil éter
	MW	peso molecular
	RMN	resonancia magnética nuclear
	PEG	polietilenglicol
	RT	Temperatura ambiente
20	SCM	succinimidilcarboximetilo (-CH ₂ -COO-N-succinimidilo)
	TEA	triethylamina
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano

Materiales y métodos

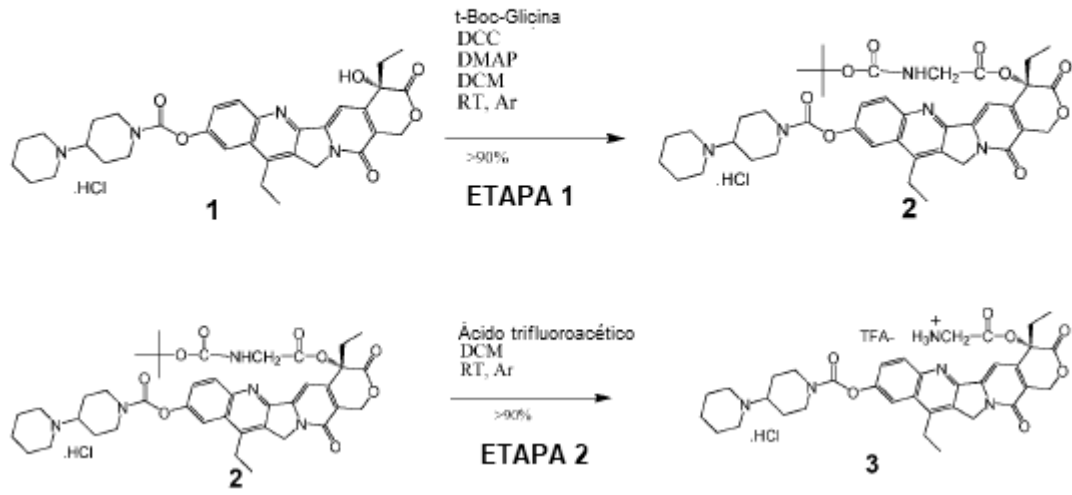
25 Se obtuvo 4-ARM-PEG_{20K}-OH a base de pentaeritrito de NOF Corporation (Japón). 4-ARM-PEG_{20K}-OH posee la siguiente estructura (en la que cada n es aproximadamente 113): C- (CH₂O-(CH₂CH₂O)_nH)₄.

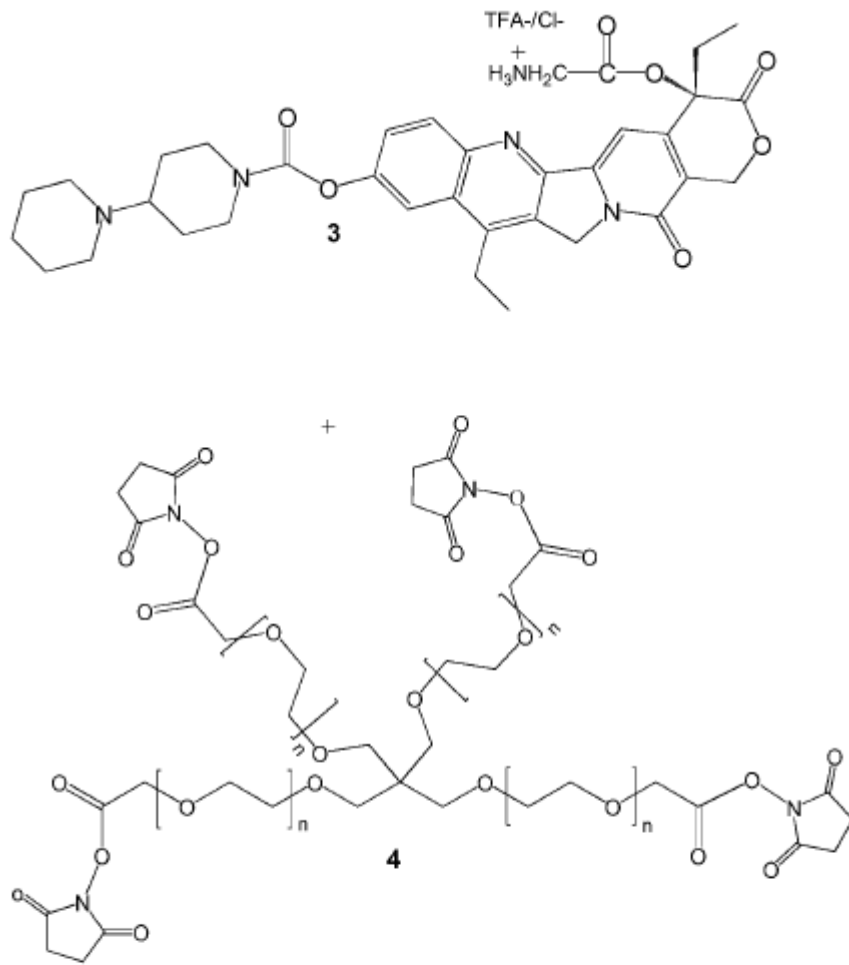
Todos los datos de ¹HMRN se generaron mediante un espectrómetro de RMN de 300 o 400 MHz fabricado por Bruker.

Ejemplo 1

30 Preparación 1: preparación de sal de ácido mixta de irinotecán unido a pentaeritritolil-4-brazos-(PEG-1-metileno-2-oxo-vinilamino acetato) -20K "4-brazo-PEG-GLY-irino-20k

Esquema de reacción:





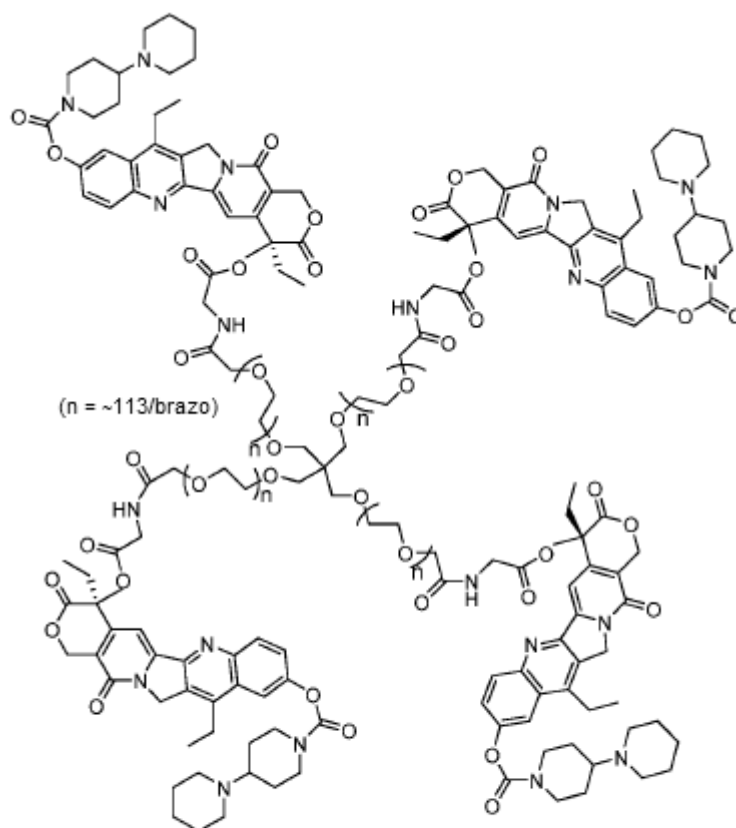
4

TEA
DCM/DMF
RT, Ar

Aislado a partir de MeOH/IPA (x3)

>90%

ETAPA 3



TFA/HCl

5

Todos los solventes usados en la síntesis fueron anhidros.

Etapa 1. Conjugación de t-boc-glicina a Irinotecán • Sal De HCl (> 95% de rendimiento)

- 5 Se cargaron irinotecán·HCl·trihidrato (1 mol o 677 g) y DMF (10 L) en un destilador a 60 °C. Tras la disolución del irinotecán·HCl·trihidrato en DMF, se aplicó lentamente un vacío completo para eliminar el agua del irinotecán·HCl·trihidrato por destilación azeotrópica a 60 °C. Tras la formación de sólidos a partir del DMF residual, se cargó heptano (hasta 60 L) en el destilador para eliminar el DMF residual a 40 - 50 °C. Tras la eliminación de heptano mediante inspección visual, se detuvo la destilación azeotrópica y se dejó enfriar el sólido (irinotecán·HCl) a 17 ± 2 °C. Para la reacción de acoplamiento, se cargaron en el destilador t-boc-glicina (1.2 mol), 4-DMAP (0.1 mol) disuelta en DCM (1 L) y DCM (19 L). Una vez que la mezcla se dispersó visualmente bien, se añadió DCC fundido (1.5 moles) y se permitió que la reacción continuara. La reacción se llevó a cabo bajo una capa de argón o nitrógeno, con una mezcla suficiente y la temperatura del recipiente a 17 ± 2 °C.
- 10

- Después de un tiempo de reacción de 2-4 horas, se extrajo una muestra para medir el porcentaje de área de pico de irinotecán (IRT) residual mediante cromatografía. Se determinó que el irinotecán residual estaba presente en una cantidad de no más del 5%. La DCU formada durante la reacción de acoplamiento se eliminó por filtración y se lavó con DCM. Los filtrados resultantes que contenían sal de t-boc-glicina-irinotecán·HCl en bruto se combinaron y se concentraron por debajo de 45 °C bajo vacío para eliminar DCM. Cuando aproximadamente el 75% de su volumen inicial se eliminó por destilación, luego se añadió IPA al concentrado para alcanzar el volumen inicial, y la mezcla se destiló aún más hasta que el volumen de condensado alcanzó aproximadamente el 25% de su volumen inicial. La solución transparente resultante se enfrió a temperatura ambiente, seguido de su adición a heptano con mezcla. La mezcla se mezcló durante un tiempo adicional de 0.5 a 1 hora, tiempo durante el cual se formó un precipitado. El precipitado se drenó y se filtró para obtener una torta húmeda, y luego se lavó con heptano (hasta 6 L). La torta húmeda se secó al vacío para producir polvo de t-boc-glicina-irinotecán para usar en la etapa 2. Rendimiento >95%.
- 15
- 20

Etapa 2. Desprotección de t-boc-glicina-Irinotecán

El t-boc-glicina-irinotecán (1 mol) de la etapa 1 se disolvió en DCM con agitación para formar una solución visualmente homogénea. A esta solución se le añadió TFA (15.8 moles) durante un período de 5 a 10 minutos y la solución resultante se agitó durante aproximadamente 2 horas. El material de partida residual se midió por RP-HPLC y se determinó que era menos del aproximadamente el 5%. Luego se añadió acetonitrilo a la solución de reacción para formar una solución visualmente homogénea a RT. Esta solución se añadió luego a MTBE (46.8 kg) agitándose suficientemente a 35 °C para promover la cristalización. Opcionalmente para reducir el uso de MTBE, el DCM en la solución de reacción se reemplazó con acetonitrilo por destilación a una temperatura de 15 a 40 °C. Después del intercambio de solvente, la solución que contenía el producto se añadió en aproximadamente un 50% menos de volumen de MTBE (23 kg) agitándose suficientemente a la temperatura de cristalización (35 °C). La mezcla se continuó durante media a una hora. El sólido resultante se filtró y la torta se lavó con MTBE.

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

Etapa 3. PEGilación de Glicina-irinotecán usando PEG-CM-SCM de 4 brazos

El polvo de sal de glicina-irinotecán·TFA/HCl de la etapa 2 se le añadió a un recipiente de reacción al que se añadió DCM (aproximadamente 23 L). La mezcla se agitó durante aproximadamente 10 a 30 minutos para permitir que la sal de glicina-irinotecán·TFA/HCl se dispersara en DCM. Luego se añadió lentamente trietilamina (aproximadamente 1.05 moles (HCl + TFA) moles en polvo de sal de TFA/HCl de glicina-irinotecán), a una velocidad que mantuvo la temperatura del recipiente a 24 °C o menos. La mezcla resultante se agitó durante 10 a 30 minutos para permitir la disolución de la base libre de GLY-IRT (irinotecán modificado con glicina).

Aproximadamente el 80% de la cantidad total (6.4 kg) de PEG-SCM de 4 brazos se añadió al recipiente de reacción durante un período de hasta 30 minutos. Después de la disolución del reactivo PEG, se controló el progreso de la reacción mediante IPC. (En el caso de que la cantidad de GLY-IRT no conjugado fuera mayor del 5% cuando la reacción parecía haber alcanzado una meseta, el 20% restante de PEG-SCM de 4 brazos se añadió al recipiente de reacción, y se controló el progreso de la reacción hasta que se observó un valor constante de GLY-IRT sin reaccionar).

El producto en bruto se precipitó añadiendo la solución de reacción a MTBE (113.6 L) agitado a temperatura ambiente durante un período de 1-1.5 horas, seguido de agitación. La mezcla resultante se transfirió a un filtro-secador con un agitador para eliminar el licor madre. El precipitado (producto en bruto) se secó parcialmente al vacío a aproximadamente entre 10 y 25 °C con una mínima agitación intermitente.

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

Se tomaron tres muestras representativas de la torta húmeda lavada, y se midieron los niveles de NHS usando RMN. La torta húmeda se secó al vacío.

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

Ejemplo 2

45 Caracterización del producto "PEG-GLY-IRINO-20K de 4 brazos" como una sal mixta

El producto del ejemplo 1 se analizó mediante cromatografía iónica (análisis IC). Véase la tabla 1 a continuación para ver los resultados analíticos de IC para varios lotes de productos de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos.

Tabla 1

Porcentaje de mol de irinotecán unido a PEG			
Lote No.	Sal TFA	Sal HCl	Base libre
010	59	36	5 (bajo)

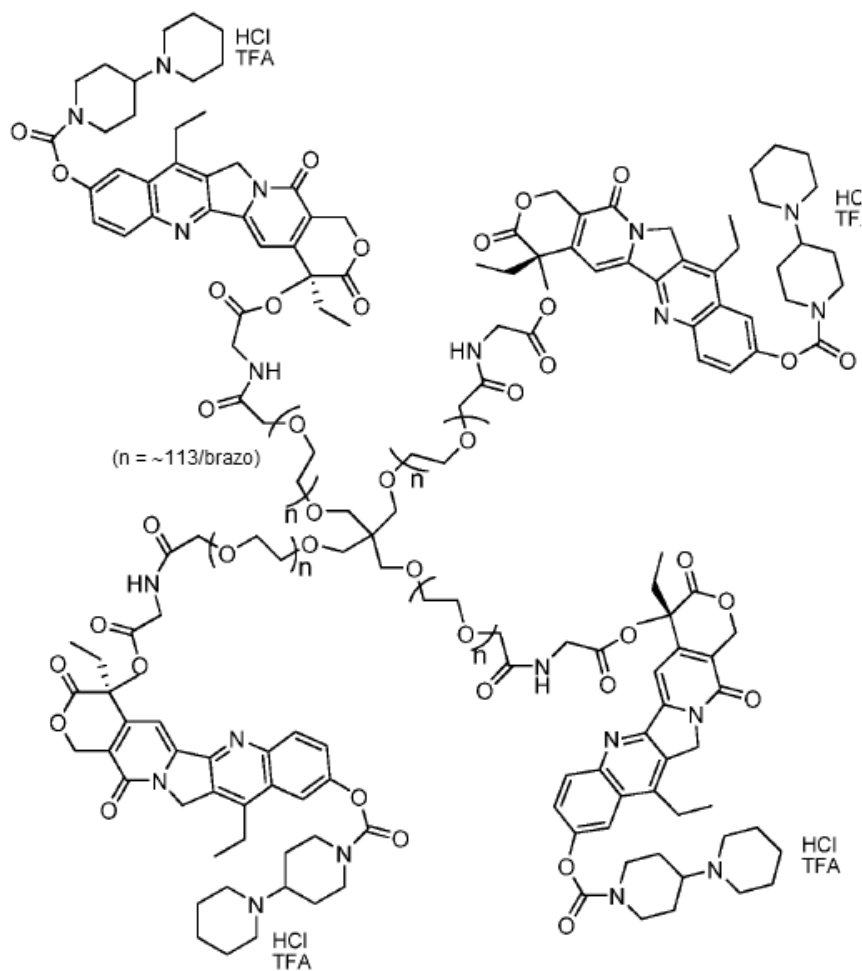
ES 2 723 026 T3

020	64 (alto)	30	6
030	27 (bajo)	24	4 9(alto)
040	53	26	21
050	54	26	20
060	57	28	15
070	53	33	14
080	53	27	20
090	44	19	36
100	33	41	26
Promedio de los últimos 7 lotes	50	29	22

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

10

La estructura generalizada del producto se muestra a continuación, donde las unidades estructurales de irinotecán se muestran en forma de base libre, y en asociación con HCl y TFA, como una indicación de la sal mixta.



VI

Ejemplo 3

Estudios de estabilidad de estrés de PEG-GLY-IRINO-20K de 4 brazos

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

Estudios de estabilidad de estrés

- 10 El producto formado en el ejemplo 1, PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, compuesto 5, (aproximadamente 1-2 g) se pesó en bolsas de 'Whirl Top' de PEG PE y se colocó en otra bolsa 'Whirl Top' con el fin de simular las condiciones de envasado de API. En un estudio (resultados mostrados en la figura 1), las muestras se colocaron en una cámara ambiental a 25 °C/60% de RH durante 4 semanas. En otro estudio, las muestras se colocaron en una cámara ambiental a 40 °C/75% de RH durante varios meses (los resultados se muestran en la figura 2 y la figura 3). A lo largo de los estudios, se tomaron y analizaron muestras periódicamente.

Resultados

- 15 Los resultados de los estudios se muestran en la figura 1, la figura 2 y la figura 3. En la figura 1, los porcentajes de área máxima de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos para muestras almacenadas a 25 °C y 60% de humedad relativa se representan en función del tiempo. Los datos que se muestran son para muestras que consisten en > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, triángulos), 94% de sal total (6% de base libre, cuadrados) y 52% de sal total (48% de base libre, círculos). Las pendientes de los gráficos indican que a medida que aumenta el contenido de base libre, la estabilidad del producto disminuye. Bajo las condiciones de estrés empleadas (esto es, a 25 °C durante hasta 28 días), la caída en el área del pico de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos se correlacionó bien con el aumento de irinotecán libre, lo que indica que el modo de descomposición es principalmente a través de hidrólisis del enlace éster para liberar irinotecán. Según los resultados observados, parece que una mayor cantidad de base libre en el
- 20

producto conduce a una estabilidad disminuida hacia la hidrólisis. De este modo, el producto que contiene un mayor grado de irinotecán protonado parece tener una mayor estabilidad frente a la hidrólisis que el producto que contiene irinotecán menos protonado (basado en el porcentaje de moles).

5 La figura 2 y la figura 3 muestran otro conjunto de datos obtenidos de la muestra que contiene > 99% de sal de HCl (<1% de base libre, cuadrados) y una muestra que consta de 86% de sales totales (14% de base libre, diamantes) que se almacenaron a 40 °C y 75% de humedad relativa. La figura 2 muestra el aumento de irinotecán libre durante 3 meses para ambas muestras. Estos datos son consistentes con los datos del estudio descrito anteriormente (resumido en la figura 1), que muestra que el producto con un mayor contenido de base libre es menos estable con respecto a la hidrólisis. La figura 3 muestra el aumento en especies de PEG más pequeñas para las mismas 10 muestras durante 3 meses. El aumento en especies de PEG más pequeñas es indicativo de la descomposición del esqueleto de PEG para proporcionar múltiples especies de PEG. Los datos indican que el producto correspondiente a la sal de HCl es más propenso a la descomposición del esqueleto de PEG que la muestra de sal mixta que contiene un 14% de base libre. De este modo, aunque no pretende limitarse a ninguna teoría, parece que mientras que la sal mixta parcial se degrada principalmente por la liberación hidrolítica del fármaco, la sal de clorhidrato parece degradarse por un mecanismo diferente, esto es, la degradación del esqueleto polimérico. Sobre la base de 15 estos resultados preliminares, el producto de sal mixta parcial parece preferirse a la sal de clorhidrato.

En resumen, los dos modos de descomposición observados presentan tendencias opuestas con respecto al contenido de sal/base libre. Inesperadamente, estos resultados sugieren que hay una región de composición de sal 20 que puede poseer una estabilidad general que se ve reforzada en cualquiera de los extremos tradicionales de sal completa y base libre completa. Los resultados indican además las ventajas imprevistas de una sal mixta parcial de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos sobre la base libre sola o bien la sal en ausencia de la otra. Se demostró que la sal mezclada tiene mayor estabilidad que ya sea la base libre o la sal de clorhidrato, indicando de este modo su superioridad sobre cualquiera de las formas de base o sal puras más habituales.

Ejemplo 4

25 Estudio de quiralidad

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

Como se detalla en la documentación del proveedor, el material de partida del clorhidrato de irinotecán es ópticamente activo, con C-20 en su configuración (S). La posición C-20 en irinotecán contiene un alcohol terciario, que no es fácilmente ionizable, por lo que no se espera que este sitio se racemice, excepto en condiciones extremas 30 (muy ácidas). Para confirmar la quiralidad en el C-20 en PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, se usó un método de HPLC quiral para analizar el irinotecán liberado del producto mediante hidrólisis química.

En base a los cromatogramas resultantes, no se detectó enantiómero (R) para las muestras de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos. Después de la hidrólisis, se confirmó que el irinotecán liberado del conjugado era la configuración (S).

Ejemplo 5

35 Estudio de hidrolisis

Todas las especies de irinotecán PEGiladas se consideran parte de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos; cada especie se hidroliza limpiamente para producir irinotecán con una pureza > 99%. Además, la especie DS4 principal, completamente cargada con el fármaco (fármaco unido covalentemente en cada uno de los cuatro brazos de 40 polímero) y la especie parcialmente sustituida - DS3 (fármaco unido covalentemente en tres brazos del polímero), DS2 (fármaco unido covalentemente en dos de los brazos del polímero) y especies DS1 (fármaco unido covalentemente en un solo brazo de polímero): todas se hidrolizan a la misma velocidad para liberar el fármaco libre, irinotecán.

Se realizaron experimentos para determinar el destino de las especies de PEG que contienen irinotecán en PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos en transesterificación (K_2CO_3 en CH_3OH , 20 °C) y condiciones de hidrólisis acuosa (pH 10, 20 °C). La reacción de transesterificación se completó en > 99% después de 45 minutos. La reacción de hidrólisis acuosa se completó en > 99% en 24 horas. Para ambos tipos de reacción, las reacciones de control con irinotecán se realizaron en condiciones idénticas y se observaron algunos picos de artefactos. Después de ajustar 45 los picos de artefactos, en ambos casos, los irinotecanos producidos tuvieron una pureza cromatográfica de > 99%.

Con base en estos resultados, se concluyó que esencialmente todas las especies PEGiladas en PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos liberan irinotecán. Las superposiciones de las HPLC tomadas a lo largo del tiempo de la reacción de hidrólisis acuosa muestran la conversión de DS4 a DS3 a DS2 a DS1 a irinotecán. Todas estas especies se hidrolizan para liberar irinotecán. Véase la figura 4 que demuestra la liberación de irinotecán por hidrólisis de especies de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos mono, di, tri- y tetra-sustituidas. 50

Se realizaron experimentos adicionales para medir las velocidades de hidrólisis para el componente principal de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos, DS4, y sus intermedios menos sustituidos, DS3, DS2 y DS1 en solución reguladora 55

acuosa (pH 8.4) en presencia de carboxipeptidasa B porcina y en plasma humano. La hidrólisis en solución reguladora acuosa (pH 8.4) en presencia de carboxipeptidasa B porcina fue un intento de realizar una hidrólisis basada en enzimas. El experimento de control a pH 8.4 sin la enzima mostró más tarde que la hidrólisis era impulsada por el pH y, de este modo, principalmente una hidrólisis química. Sin embargo, los datos fueron valiosos para la comparación con los datos obtenidos de la hidrólisis realizada en plasma humano. Estos experimentos demostraron que las velocidades de hidrólisis de los diversos componentes no son significativamente diferentes y se comparan favorablemente con las predicciones teóricas. Los experimentos adicionales midieron las velocidades de hidrólisis para los componentes principales (DS4, DS3, DS2 y DS1) de PEG-Gly-Irino-20K de 4 brazos en plasma humano. Estos experimentos también muestran que los diversos componentes se hidrolizan a la misma velocidad y se comparan favorablemente con las predicciones teóricas.

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

15 Ejemplo 6

Preparación 2: preparación de pentaeritritolil-4-brazo-(irinotecán unido al PEG-1-metilen-2 oxo-vinilamino acetato)-20K "Sal de ácido mixta de PEG-GLY-IRINO-20K de 4 brazos MEZCLA SAL DE ACID

Etapa 1. Síntesis de clorhidrato de Boc-glicina-irinotecán (Gly-IRT HCl)

Parte 1: Secado de trihidrato de clorhidrato de irinotecán (IRT.HCl.3H₂O)

20 Se cargó IRT·HCl·3H₂O (45.05 g, 66.52 mmol) en un reactor. Se cargó N, N-dimetilformamida anhidra (DMF) (666 mL, 14.7 mL/g de IRT·HCl·3H₂O, contenido de agua de DMF NMT 300 ppm) en el reactor. Con agitación lenta, el reactor se calentó a 60 °C (temperatura de la camisa). Después de que el irinotecán (IRT) se disolvió completamente (5-10 minutos), se aplicó vacío lentamente hasta alcanzar 5-10 mbar y se eliminó por destilación el DMF. Cuando el volumen de destilado condensado (DMF) alcanzó 85 - 90% de la carga inicial de DMF, se liberó el vacío. Se introdujo heptano (1330 mL, 30.0 mL/g de IRT·HCl·3H₂O, contenido de agua NMT 50 ppm) en el reactor y la temperatura de la camisa se redujo a 50 °C. El heptano se destiló al vacío (100-150 mbar) hasta que el volumen del destilado fue aproximadamente el 90% de la carga inicial de heptano. Se llevaron a cabo dos ciclos más de destilación de heptano (2 x 1330 mL de carga y destilación de heptano). Se tomó una muestra de la fase de solvente del reactor y se analizó para determinar el contenido de DMF usando GC para asegurar un contenido de DMF de menos del 3% p/p. (En el caso de que el DMF residual fuera > 3.0% p/p, se realizaría un cuarto ciclo de destilación azeotrópica). La lechada resultante se usó para la reacción de acoplamiento (Parte 2).

Parte 2: Reacción de acoplamiento: Preparación de Boc-gly-IRT·HCl

35 Se cargó diclorometano (1330 mL, 29.5 mL de DCM/g de IRT·HCl·3H₂O) en el reactor que contenía la lechada de IRT·HCl seco (1.0 equiv.) en heptanos residuales (la proporción de masa aproximada de heptanos residuales a IRT.HCL era 3) que se estaba agitando. Los contenidos de la reacción se agitaron durante 15 - 30 minutos, y la temperatura del lote se mantuvo a 17 °C. Se cargaron Boc-glicina (14.0 g, 79.91 mmol, 1.2 equiv.) y DMAP (0.81 g, 6.63 mmol, 0.1 equiv.), como sólidos, en el reactor. Se preparó una solución DCM de DCC (1.5 equiv. en 40 mL de diclorometano) y se añadió al reactor durante 15-30 minutos, y la mezcla de reacción resultante se agitó a 17 °C (temperatura del lote) durante 2-3 horas. La reacción se controló por HPLC para asegurar la finalización. Se cargó una solución de enfriamiento prefabricada en la mezcla de reacción para apagar cualquier DCC restante. En resumen, la solución de enfriamiento prefabricada es una solución premezclada de TFA e IPA en diclorometano, preparada mezclando TFA (1.53 mL, 0.034 mL/g IRT·HCl·3H₂O) e IPA (3.05 mL, 0.068 mL/g IRT·HCl·3H₂O) en DCM (15.3 mL, 0.34 mL/g de IRT·HCl·3H₂O), y se añadió al reactor VI durante 5 a 10 minutos cuando la conversión fue de al menos el 97%. Los contenidos se agitaron durante 30-60 minutos adicionales para permitir la apagado. La mezcla de reacción que contiene DCU se filtró a través de un filtro de 1 micra en otro reactor. El filtrado de la reacción se destiló a 1/3 de su volumen al vacío a 35 °C. Se añadió alcohol isopropílico (IPA) (490.5 mL, 10.9 mL/g de IRT·HCl·3H₂O) a la mezcla concentrada y la mezcla se agitó durante 30 - 60 min a 50 °C (temperatura de la camisa). La solución homogénea resultante se concentró por destilación al vacío hasta aproximadamente el 85% del volumen de carga inicial de IPA y el concentrado resultante se enfrió a 20 °C (temperatura de la camisa). La mezcla de reacción en IPA se transfirió durante 60-80 minutos a heptano (1750 mL, 38.8 mL de heptano/g IRT·HCl·3H₂O) a 20 °C. La lechada resultante que contenía el precipitado de Boc-gly-IRT.HCl se agitó durante 60-90 minutos adicionales y el producto se recogió por filtración. El matraz de reacción se enjuagó con heptano (2 x 490 mL, 20.0 mL de heptano/g IRT·HCl·3H₂O) y la torta del producto se lavó con el enjuague. La torta húmeda se secó a una 20 °C a 25 °C al vacío durante un mínimo de 12 horas. Rendimiento: 57.13 g (110%, alto debido a solventes residuales)

55 Etapa 2. Síntesis de clorhidrato de trifluoroacetato de glicina-irinotecán (Gly-IRT HCl-TFA) (desprotección)

A un reactor de tamaño apropiado se le añadió Boc-gly-IRT·HCl seco (41.32 g, 52.5 mmol, de la etapa 1) bajo una atmósfera inerte. Se añadió DCM anhidro (347 mL, 8.4 mL de DCM/g de Boc-gly-IRT·HCl) al reactor y los contenidos

5 se agitaron a 17 °C hasta la disolución completa (15-30 min aproximadamente). Se añadió TFA (61.98 mL, 691.5 mmol, 1.5 mL/g de Boc-gly-IRT·HCl) al matraz durante 15-30 min y la mezcla continuó durante 3.0 horas. La reacción se controló para completarla mediante HPLC (límite: no menos del 97%). La reacción se diluyó con acetonitrilo (347 mL, 8.4 mL de ACN/g de Boc-gly-IRT·HCl). La temperatura de la camisa se ajustó a 15 °C y la mezcla de reacción se concentró al vacío hasta que el volumen residual final del recipiente fue aproximadamente el 85% de la carga inicial de acetonitrilo (295-305 mL aproximadamente). La solución de acetonitrilo resultante se añadió lentamente a un reactor que contenía metiltert-butil éter (MTBE, 1632 mL, 39.5 mL de MTBE/g de Boc-gly-IRT·HCl) durante un período de 30-60 minutos. El producto precipitado se mezcló suavemente durante 30 minutos y se recogió por filtración. El reactor se enjuagó con MTBE (410 mL) y la torta del filtro gly-IRT·HCl/TFA se lavó con el enjuague. El producto se secó al vacío a 17 °C, durante un mínimo de 12 horas. Rendimiento: 42.1 g (102%).

Etapa 3. Síntesis de clorhidrato de trifluoroacetato de PEG-20K-irinotecán de 4 brazos

15 Se cargó Gly-IRT HCl-TFA (10.0 g) en un reactor de 250 mL y se lavó con argón. La temperatura de la camisa se fijó a 20 °C. Se añadieron DCM (166 mL) y TEA (2.94 g). La solución se mezcló durante 10 minutos. Se añadió una carga inicial de PEG20K-SCM de 4 brazos (47.6 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Se tomó una muestra y se analizó por HPLC. Los datos de HPLC mostraron 18% restante de Gly-IRT. Se añadió una segunda carga de PEG20K-SCM de 4 brazos (10.7 g) a la mezcla de reacción y la solución se agitó durante aproximadamente 2 horas. Se extrajo una muestra para análisis por HPLC. Los datos del análisis de HPLC mostraron un 1.5% restante de Gly-IRT. La solución de reacción se añadió luego lentamente a MTBE (828 mL) para precipitar el producto. El precipitado se agitó durante 30 minutos y se recogió por filtración. La torta húmeda se lavó con una mezcla de 30% de metanol/70% de MTBE (830 mL). El producto se cargó luego en un reactor que contenía una mezcla de 30% de metanol/70% de MTBE (642 mL) y la mezcla se agitó a 20 °C durante 20 minutos. La mezcla se filtró y la torta húmeda se lavó en el filtro con una mezcla de 30% de metanol/70% de MTBE (642 mL). El producto se secó a vacío a 20 °C.

25 El producto seco se cargó en un reactor que contenía acetato de etilo (642 mL). La mezcla se calentó a 35 °C para lograr la disolución completa. La solución caliente se filtró, si fuera necesario, para eliminar las partículas sin disolver, y luego se enfrió a 10 °C con agitación. El producto precipitado de PEG20K-glicina-irinotecán-clorhidrato-trifluoroacetato de 4 brazos se filtró y la torta húmeda se lavó en el filtro con una mezcla de 30% de metanol/70% de MTBE (642 mL). El producto se secó luego a vacío a 20 °C. Rendimiento: 54 g (aproximadamente 85%).

30 Se analizaron varios lotes preparados según el procedimiento anterior por cromatografía iónica para la composición de la sal.

Tabla 2

Porcentaje de moles de irinotecán unido a PEG			
Lote No.	Sal de TFA	Sal HCl	Base libre
Lote 1	34	41	25
Lote 2	31	45	24
Lote 3	30	49	21
Lote 4	29	48	23

Tabla 3

Desviaciones medias y estándar para los lotes en la tabla 2					
	Media	SD	2SD	3SD	4SD
TFA, % mol	31	2.4	4.8	7.2	9.6
Cl, % mol	46	3.5	7.1	10.6	14.2
base libre, % mol	23	1.0	1.9	2.9	3.9

5 Como se puede ver a partir de los resultados en la tabla 2, los lotes preparados como se describen muestran proporciones consistentes de sal de TFA, sal de clorhidrato y base libre. Sobre la base de una revisión de la información del lote, parece que un mayor contenido de cloruro en el intermedio de TFA/HCl de glicina-irinotecán conduce a un mayor contenido de cloruro en el producto final de conjugado de sal mixta. Al usar un material de partida tal como el clorhidrato de irinotecán que tiene un contenido de cloruro bastante constante, se puede preparar una sal de TFA/HCl de glicina-irinotecán que tiene un contenido de cloruro bastante constante.

10 En base a una revisión adicional de la información del lote, parece que cuanto mayor sea el número de equivalentes de TEA usados en la etapa 3, menor será el TFA y, en menor medida, el contenido de cloruro en el producto conjugado final de sal mixta. La medición del contenido de cloruro y TFA del producto intermedio, esto es, TFA/HCl de gly-irinotecán, facilitada quizás por una mayor disolución del producto intermedio antes del análisis, por ejemplo, mediante cromatografía iónica, puede permitir una determinación más precisa de la estequiometría. por ejemplo, en la cantidad de trietilamina añadida en la etapa de reacción final.

15 En base a lo anterior, los intervalos preferidos de TFA en el conjugado de sal de ácido mixta son desde aproximadamente 20 a aproximadamente 45 por ciento en moles, preferiblemente desde aproximadamente 22 a 40 por ciento en moles, o desde aproximadamente 24 a 38 por ciento en moles. Con respecto al contenido de clorhidrato, los intervalos preferidos en el conjugado de sal de ácido mixta son desde aproximadamente 30 a 65 por ciento en moles de cloruro, o desde aproximadamente 32 a 60 por ciento en moles de cloruro, o desde aproximadamente 35 a 57 por ciento en moles de cloruro.

Ejemplo 7

20 Estudios de estabilidad de estrés de materiales PEG-GLY-IRINO-20K de 4 brazos que tienen diferentes proporciones de sal

25 Se llevaron a cabo estudios de estabilidad a corto plazo (4 semanas) en PEG20K-gly-irinotecán de 4 brazos que tenía varias concentraciones de sal, como se resume en la tabla 4 a continuación. La sal de clorhidrato "pura" se muestra en la columna del extremo izquierdo, mientras que la forma de la base libre no protonada se muestra en la columna del extremo derecho, con degradaciones variables en el medio. Los estudios se realizaron esencialmente como se describe en el ejemplo 3 en un intervalo de temperaturas (-20 °C sin control de humedad, 5 °C sin control de humedad, 25 °C a 60% de humedad relativa y 40 °C a 75% de humedad relativa).

Tabla 4

Información de muestra					
Muestra	HCl	Intermed.	Representativo	Intermed.	Base libre
Lote No.	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
Cl	0.59%	0.43%	0.26 %	0.11%	NQ
TFA	NQ	0.25%	0.56%	0.07%	NQ
Cl (% mol)	103.8%	75.6%	44.6%	18.9%	NQ
TFA % mol	NQ	13.6%	30.6%	3.9%	NQ
% mol de sal total	103.8%	89.2%	75.2%	22.8%	0%

30 Para la sal de HCl (lote A), en el transcurso de 4 semanas cuando se evaluó en el intervalo de temperaturas, el total de especies relacionadas con el producto cambió de 98.7% a 97.0% a 40 °C, mientras que el irinotecán libre cambió de 0.4% a 1.25%. Para la base libre, (Lote D), en el transcurso de 4 semanas cuando se evaluó en el intervalo de temperaturas, el total de especies relacionadas con el producto cambió de 99.8% a 62.5% a 40 °C, mientras que el irinotecán libre cambió de 0.3% a 31.4 %.

35 Cuando se evaluó en condiciones de baja temperatura, a -20 °C y 5 °C, en el transcurso de 4 semanas, se observó una degradación mínima para cada uno de los materiales. Cuando se evaluó a 25 °C, se observó hidrólisis en cada una de las especies analizadas con el material de base libre que muestra la liberación de fármaco hidrolítica más significativa. Lo mismo se observó a 40 °C, donde las composiciones que tenían la mayor cantidad de base libre demostraron una tasa correspondientemente más alta de hidrólisis de irinotecán. En condiciones de alta temperatura, esto es, a 40 °C, se detectó la escisión del esqueleto de PEG.

Ejemplo 8

Preparación de PEG-20K de 4-brazos- a base de pentaeritritol en una escala de 1.9 kg

5 Materiales y métodos. Se debe usar un grado muy alto de óxido de etileno con el menor contenido de agua que se pueda alcanzar, ya que el contenido de agua conduce a impurezas de diol polimérico. Precaución: El óxido de etileno es un compuesto muy reactivo que puede reaccionar de manera explosiva con la humedad, de este modo, las fugas en el aparato de reacción y transferencia se deben evitar cuidadosamente. También, se debe tener cuidado en las operaciones para incluir que el personal trabaje detrás de escudos protectores o en bunkers.

10 Se calentó a reflujo tolueno anhidro (4 L) durante dos horas en un reactor a presión de acero inoxidable con camisa de dos galones. A continuación, se eliminó por destilación una parte del solvente (3 L) a presión atmosférica. Luego, el tolueno residual se descargó y el reactor se secó durante la noche pasando vapor a través de la camisa del reactor y aplicando una presión reducida de 3 a 5 mm Hg. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (4 L) y PEG-2K de 4 brazos a base de pentaeritritol (pentaeritritol SUNBRIGHT PTE®-2000, peso molecular desde aproximadamente 2,000 Dalton, NOF Corporation; 200 g, 0.100 moles). El solvente se eliminó por destilación a presión reducida, y luego el reactor se enfrió a 30 °C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadieron al reactor un litro de tolueno secado con tamices moleculares (contenido de agua ~5 ppm) y aleación líquida de sodio y potasio (Na al 22%, K al 78%; 1.2 g). El reactor se calentó a 110 °C y se añadió continuamente óxido de etileno (1,800 g) durante tres horas manteniendo la temperatura de reacción a 110 - 120 °C. A continuación, los contenidos del reactor se calentaron durante dos horas a ~100 °C, y luego la temperatura se redujo a ~70 °C. El exceso de óxido de etileno y tolueno se eliminaron por destilación a presión reducida. Después de la destilación, los contenidos del reactor permanecieron bajo presión reducida y se realizó un rociado de nitrógeno para eliminar trazas de óxido de etileno. Se añadió ácido fosfórico (1N) para neutralizar el residuo básico y el producto se secó a presión reducida. Finalmente, el producto se drenó del reactor y se filtró dando, después de enfriar, 1,900 g de un sólido blanco. Se aplicó cromatografía de filtración en gel (GFC) para caracterizar el producto polimérico alcoxilado, PEG-20K de 4 brazos a base de pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes según el peso molecular. Se usó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y un detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO₃ 0.1 M) fue de 0.5 ml/min. El cromatograma de GFC se muestra en la figura 7.

25 El análisis de GFC mostró que el producto PEG-20K de 4 brazos contenía lo siguiente: Producto de MW alto 0.42%, PEG-20K de 4 brazos 99.14%, HO-PEG (10K) -OH 0.44%.

Ejemplo 9

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

35 NOF Corporation es un líder actual en el suministro de PEG comerciales. De este modo, se obtuvo un nuevo PEG-20K de 4 brazos a base de pentaeritritol disponible en el mercado (SUNBRIGHT PTE®-20,000, peso molecular desde aproximadamente 20,000 Dalton, NOF Corporation) y se analizó usando cromatografía de filtración en gel (GFC). Se usó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y un detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO₃ 0.1 M) fue de 0.5 ml/min. El cromatograma de GFC se muestra en la figura 8.

40 El análisis de GFC mostró que este producto comercial PEG-20K de 4 brazos contenía: productos de MW alto 3.93%, PEG-20K de 4 brazos 88.56%, HO-PEG (10K)-OH 3.93%, HO-PEG (5K)-OH 3.58%.

Ejemplo 10

Preparación del oligómero que se puede alcoxilar: PEG-2K de 4 brazos a base de pentaeritritol en una escala de 15 kg

45 Un reactor de presión de acero inoxidable con camisa de veinte galones se lavó dos veces con 95 kg de agua desionizada a 95 °C. Se eliminó el agua de lavado y se secó el reactor durante la noche haciendo pasar vapor a través de la camisa del reactor y aplicando presión reducida (3 - 5 mm Hg). El reactor se llenó con 25 kg de tolueno anhidro y una parte del solvente se eliminó por destilación a presión reducida. Luego el tolueno residual se eliminó y el reactor se mantuvo a presión reducida. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (15 L) y se añadió pentaeritritol (1,020 g). Parte del solvente (~ 8L) se eliminó por destilación a presión reducida, y luego el reactor se enfrió a 30 °C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadió al reactor una aleación líquida de sodio-potasio (Na al 22%, K al 78%; 2.2 g). Se añadió continuamente óxido de etileno anhidro (14,080 g) durante tres horas manteniendo la temperatura de reacción a 150 - 155 °C. A continuación, los contenidos del reactor se calentaron durante 30 minutos a ~ 150 °C y luego la temperatura se redujo a ~ 70 °C. El exceso de óxido de etileno y tolueno se eliminaron por destilación a presión reducida. Después de la destilación, los contenidos del reactor permanecieron bajo presión reducida y se realizó un rociado de nitrógeno para eliminar trazas de óxido de etileno. Finalmente, el producto se drenó del reactor dando 14,200 g de líquido viscoso. Se aplicó

cromatografía de filtración en gel (GFC) para caracterizar el producto, PEG-2K de 4 brazos a base de pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes según el peso molecular. Se usó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y un detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO_3 0.1 M) fue de 0.5 ml/min.

- 5 El análisis por GFC mostró que el producto PEG-2K de 4 brazos tenía una pureza del 100% con impurezas de peso molecular bajo o alto por debajo de los límites detectables.

Ejemplo 11

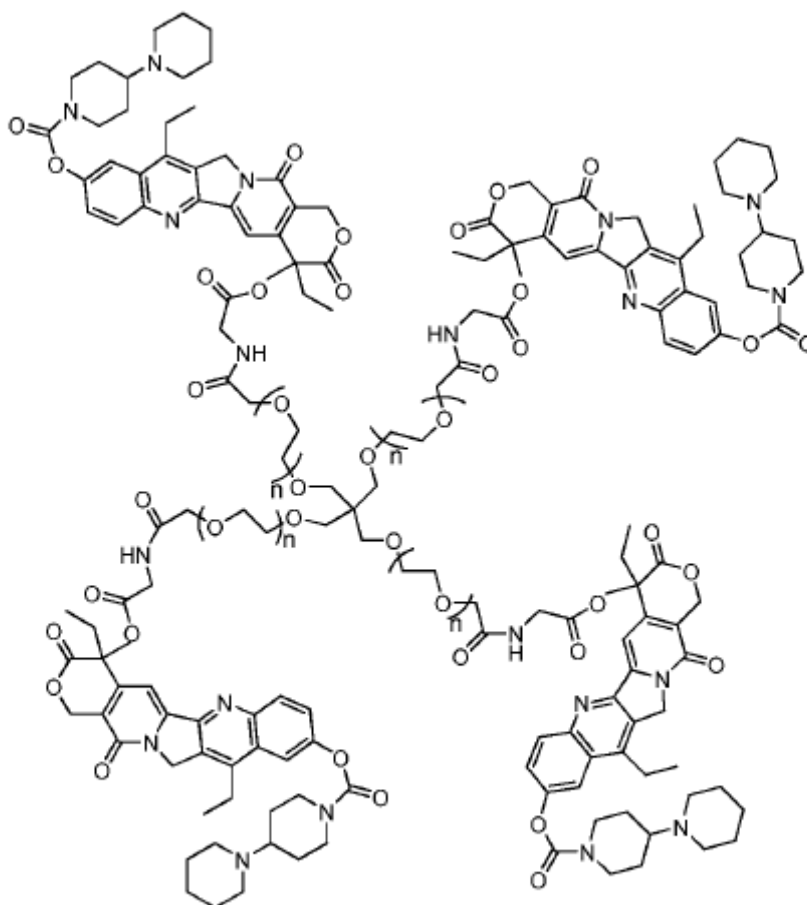
Preparación de PEG-20K de 4 brazos a base de pentaeritritol en una escala de 20 kg

- 10 Un reactor de presión de acero inoxidable con camisa de veinte galones se lavó dos veces con 95 kg de agua desionizada a 95 °C. Se eliminó el agua de lavado y se secó el reactor durante la noche haciendo pasar vapor a través de la camisa del reactor y aplicando presión reducida de 3 - 5 mm Hg. El reactor se llenó con 25 kg de tolueno anhidro y una parte del solvente se eliminó por destilación a presión reducida. Luego el tolueno residual se eliminó y el reactor se mantuvo a presión reducida. A continuación, el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se llenó con tolueno anhidro (21 L) y se añadió oligómero que se puede alcoxilar previamente aislado: se añadió PEG-2K de 4
15 brazos a base de pentaeritritol del ejemplo 10 (2,064 g). Parte del solvente (16 L) se eliminó por destilación a presión reducida, y luego el reactor se enfrió a 30 °C en atmósfera de nitrógeno seco. Se añadieron cuatro litros de tolueno secado con tamices moleculares (contenido de agua ~ 5 ppm) y aleación líquida de sodio y potasio (Na al 22%, K al 78%; 1.7 g), y el reactor se calentó a 110 °C. A continuación, se añadió continuamente óxido de etileno (19,300 g) durante cinco horas manteniendo la temperatura de reacción a 145 - 150 °C. A continuación, los contenidos del
20 reactor se calentaron durante 30 minutos ~ 140 °C, y luego la temperatura se redujo a ~100 °C. Se añadió ácido glacial ácido (100 g) para neutralizar el catalizador. El exceso de óxido de etileno y tolueno se eliminaron por destilación a presión reducida. Después de la destilación, los contenidos del reactor permanecieron bajo presión reducida y se realizó un rociado de nitrógeno para eliminar trazas de óxido de etileno. Finalmente, el producto se drenó del reactor dando 20,100 g de un sólido blanco. Se aplicó cromatografía de filtración en gel (GFC) para
25 caracterizar el producto polimérico alcoxilado, PEG-20K de 4 brazos a base de pentaeritritol. Este método analítico proporcionó un cromatograma de la composición con separación de los componentes según el peso molecular. Se usó un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Shodex KW-803 GFC (300 x 8 mm) y un detector de refractómetro diferencial. El flujo de la fase móvil (NaNO_3 0.1 M) fue de 0.5 ml/min

- 30 El análisis de GFC mostró que el producto PEG-20K de 4 brazos contenía lo siguiente: Producto de MW alto al 0.75%, PEG-20K de 4 brazos al 97.92%, HO-PEG (10K)-OH al 1.08%, HO-PEG(5K)-OH al 0.48%.

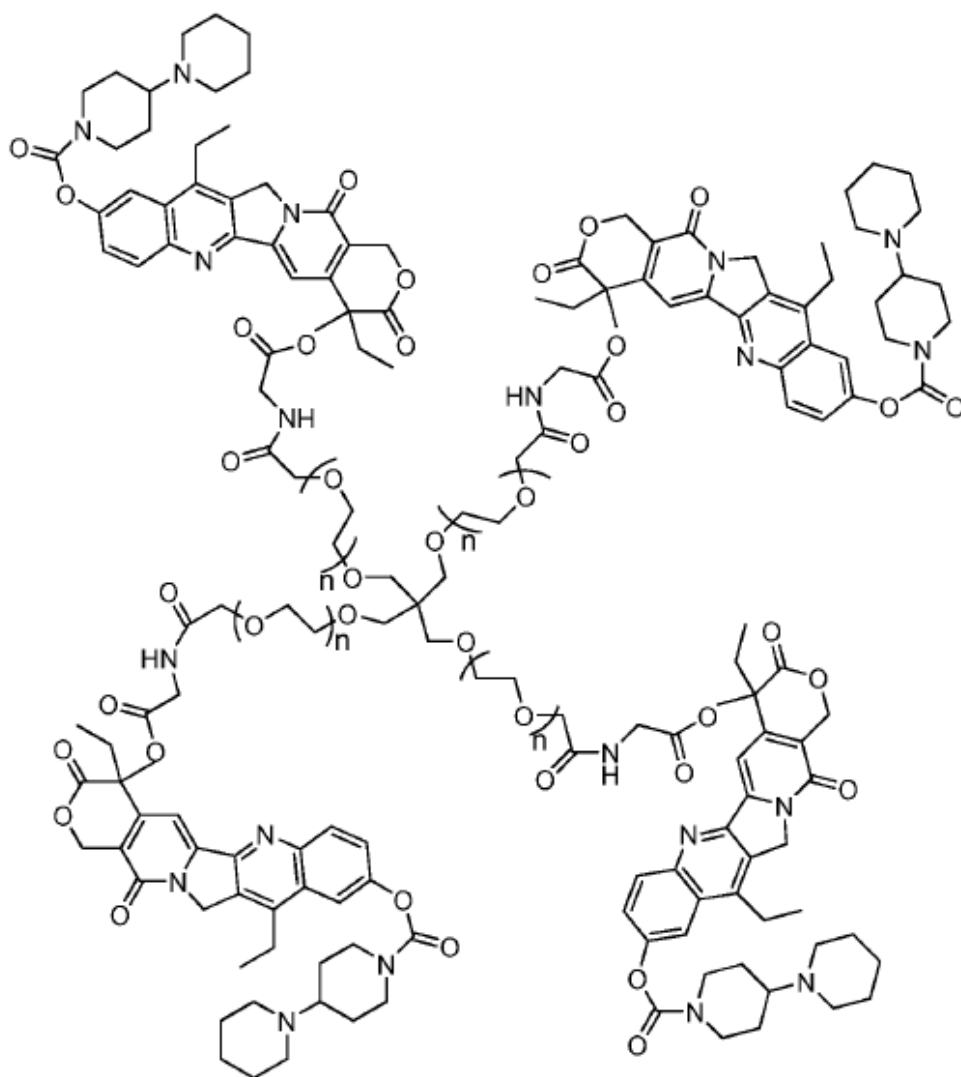
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende sales mixtas de conjugados de polímero soluble en agua-agente activo, en la que el agente activo en el conjugado tiene al menos un grupo amina básico, y además en el que para cada grupo amina dentro del agente activo, el grupo amina está ya sea protonado o no protonado, donde cualquier grupo amina protonado dado es una forma de sal de ácido de un ácido inorgánico o ácido trifluoroacético (TFA), en la que (i) el polímero soluble en agua es un poli(etilenglicol) de multi-brazos, (ii) el agente activo es irinotecán, (iii) el ácido inorgánico es ácido clorhídrico (HCl), (iv) al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, (v) 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de HCl, y (vi) el porcentaje de moles de 5-35 de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el conjugado de polímero soluble en agua-agente activo corresponde a la estructura (I):



(I)

- 15 y n es un número entero que oscila entre aproximadamente 20 y aproximadamente 500, en la que al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, en la que se protonan 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo como la sal de HCl, y en la que 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que 35-65 por ciento en moles de grupos amino del agente activo están protonados como la sal de TFA.
- 20 4. Una sal mixta de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico (TFA/HCl) de la siguiente estructura:



(I)

donde n es un número entero que oscila desde 40 a aproximadamente 500, en la que al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, en la que 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de HCl, y en la que 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

5. Un método de preparación de una sal mixta de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo, que comprende las etapas de:

(a) desprotección de una sal de ácido inorgánico de un agente activo que contiene amina en forma protegida mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para formar una sal mixta de ácido inorgánico desprotegido/TFA,

(b) determinación de las cantidades molares relativas de ácido inorgánico y TFA en la sal de ácido desprotegida formada en la etapa (a),

(c) acoplamiento de la sal mixta de ácido inorgánico desprotegido/TFA de la etapa (a) con un reactivo polimérico soluble en agua en presencia de una base para formar un conjugado de polímero-agente activo, y

(d) recuperación de dicho conjugado de polímero-agente activo, dicho conjugado de polímero-agente activo caracterizado por tener dicho uno o más grupos amina presentes en una combinación de base libre, sal de ácido inorgánico y forma de sal de TFA, en el que (i) el polímero soluble en agua es un poli(etilenglicol) de multi-brazos, (ii) el agente activo es irinotecán, (iii) el ácido inorgánico es ácido clorhídrico (HCl), (iv) el reactivo polimérico soluble en agua es un éster de polietilenglicol activado, (v) al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal TFA, (vi) 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del

agente activo están protonados como la sal HCl, y (vii) 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la base es una amina.

5 7. El método de la reivindicación 6, en el que la base se selecciona de trimetilamina, trietilamina y dimetilaminopiridina.

8. El método de la reivindicación 5, en el que el agente activo que contiene amina en forma protegida es t-boc-glicina irinotecán.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que la cantidad de base en la etapa (c) oscila de 1.00 a 2.00 (moles de TFA + moles de ácido).

10 10. Un método de preparación de una sal mixta de un conjugado de polímero soluble en agua-agente activo, que comprende las etapas de:

(i) desprotección de t-Boc glicina-irinotecán.HCl por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para formar glicina-irinotecán HCl desprotegida,

15 (ii) acoplamiento de la glicina-irinotecán HCl desprotegida con pentaeritrolil-polietilenglicol-carboximetil succinimida de 4 brazos en presencia de una base en condiciones efectivas para formar un conjugado, pentaeritrolilpolietilenglicol-carboximetilglicina-irinotecán de 4 brazos, y

(iii) recuperación del conjugado de la etapa (ii),

20 en el que el conjugado es una sal mixta que comprende grupos amino en una combinación forma de base libre, sal de HCl y de TFA, en el que: al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal de TFA, 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo se protonan como la sal HCl, y el 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, que comprende además purificar el conjugado recuperado.

25 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha purificación comprende recristalizar el conjugado para formar un conjugado recristalizado.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el producto recristalizado es también una sal de ácido mixta que comprende grupos amino en una combinación de forma de base libre, sal de HCl y de TFA.

30 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-13, eficaz para proporcionar reproduciblemente una sal mixta que posee cantidades molares relativas de sal de adición de ácido inorgánico, sal de ácido trifluoroacético y base libre que no varían en consistencia de un lote a otro más desde aproximadamente el quince por ciento.

15. Una sal mixta preparada de manera reproducible por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-14, que posee cantidades molares relativas de sal de adición de ácido inorgánico, sal de ácido trifluoroacético y base libre que no varían en consistencia de un lote a otro más desde aproximadamente el quince por ciento.

35 16. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende (i) una sal mixta de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 15 o preparada por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-14, y (ii) solución reguladora de lactato, en forma liofilizada.

17. Una composición que comprende sales mixtas de conjugados de polímero de cuatro brazos, en la que al menos el 90% de los conjugados de cuatro brazos en la composición:

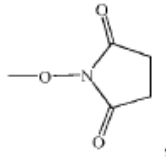
(a) tiene una estructura abarcada por la fórmula,

40
$$C-[CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2-C(O)-Term]_4,$$

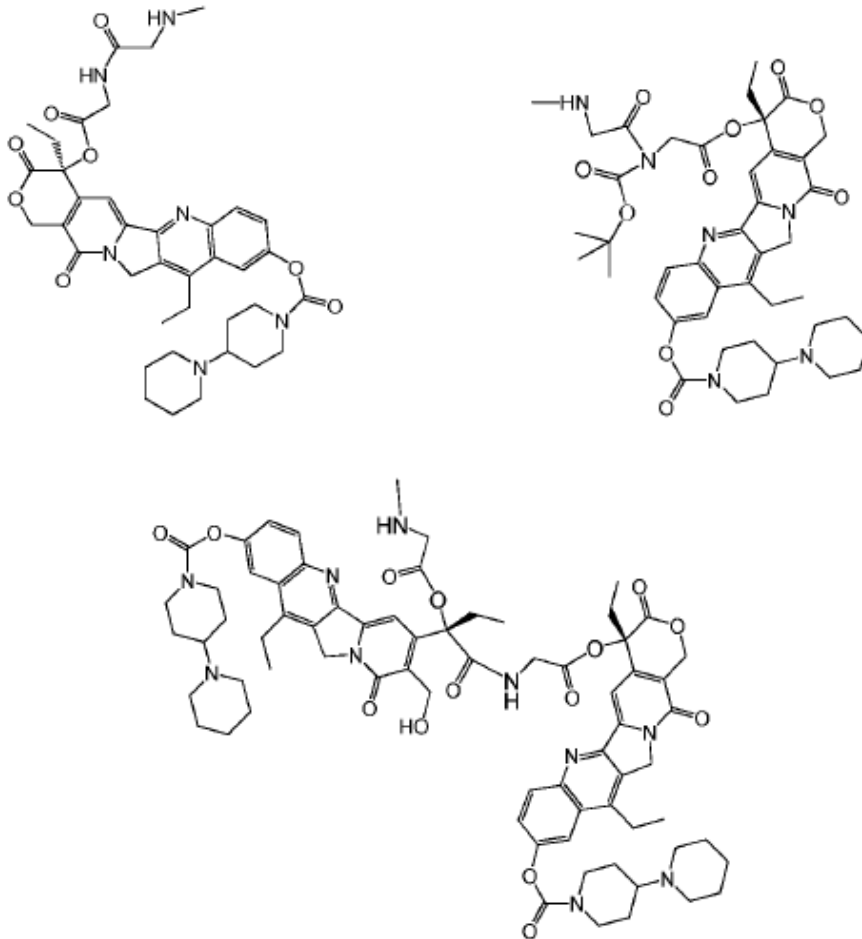
en la que

n, en cada caso, es un número entero que tiene un valor desde 5 a 150 (por ejemplo, aproximadamente 113), y

Term, en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en -OH, - OCH₃,



-NH-CH₂-C(O)-OH, -NH-CH₂-C(O)-OCH₃,



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

- 5 (b) para cada Term en al menos el 90% de los conjugados de cuatro brazos en la composición, al menos el 90% de los mismos son

-NH-CH₂-C(O)-O-Irino,

- 10 y además, en el que para cada grupo amino dentro de cada Irino en al menos el 90% de los conjugados de cuatro brazos en la composición, cada grupo amino está ya sea protonado o no protonado, donde cualquier grupo amino protonado dado es una forma de sal de ácido de un ácido inorgánico o ácido trifluoroacético, en el que: (i) el ácido inorgánico es ácido clorhídrico (HCl), (ii) al menos 25 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal TFA, (iii) 25-40 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo están protonados como la sal HCl, y (iv) 5-35 por ciento en moles de los grupos amina dentro del agente activo no están protonados.

15

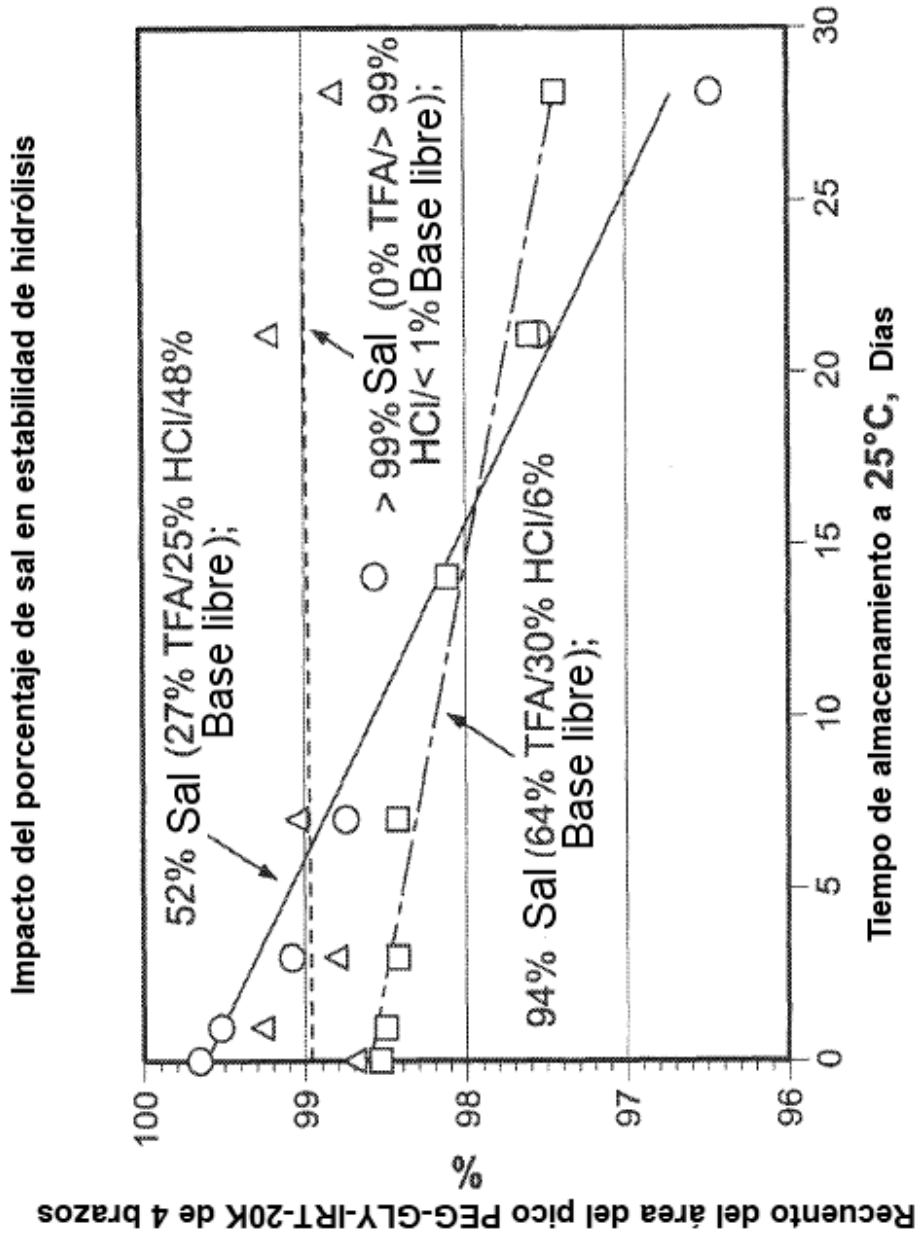


FIG. 1

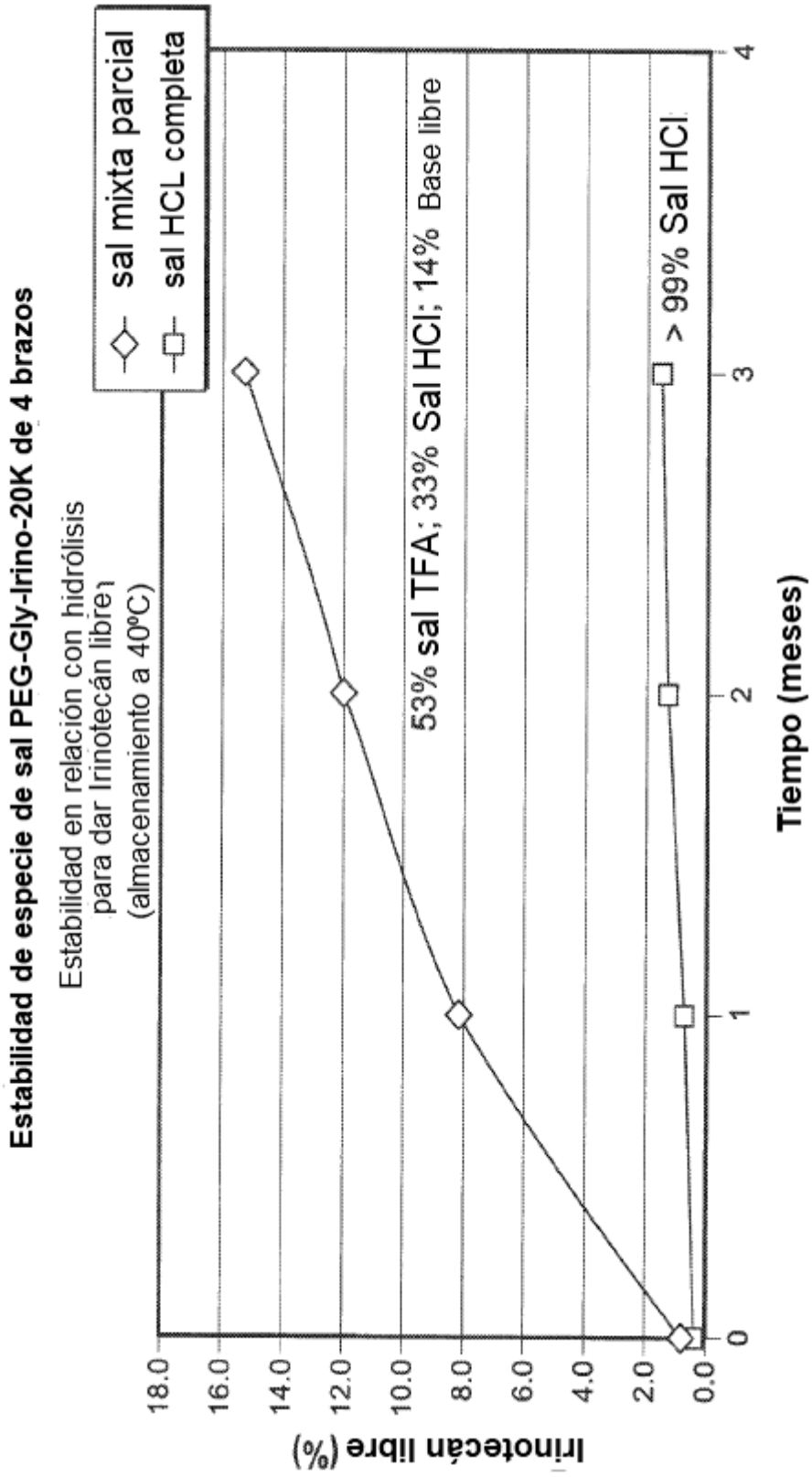


FIG. 2

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

Estabilidad en relación con la degradación del esqueleto
(Almacenamiento a 40°C)

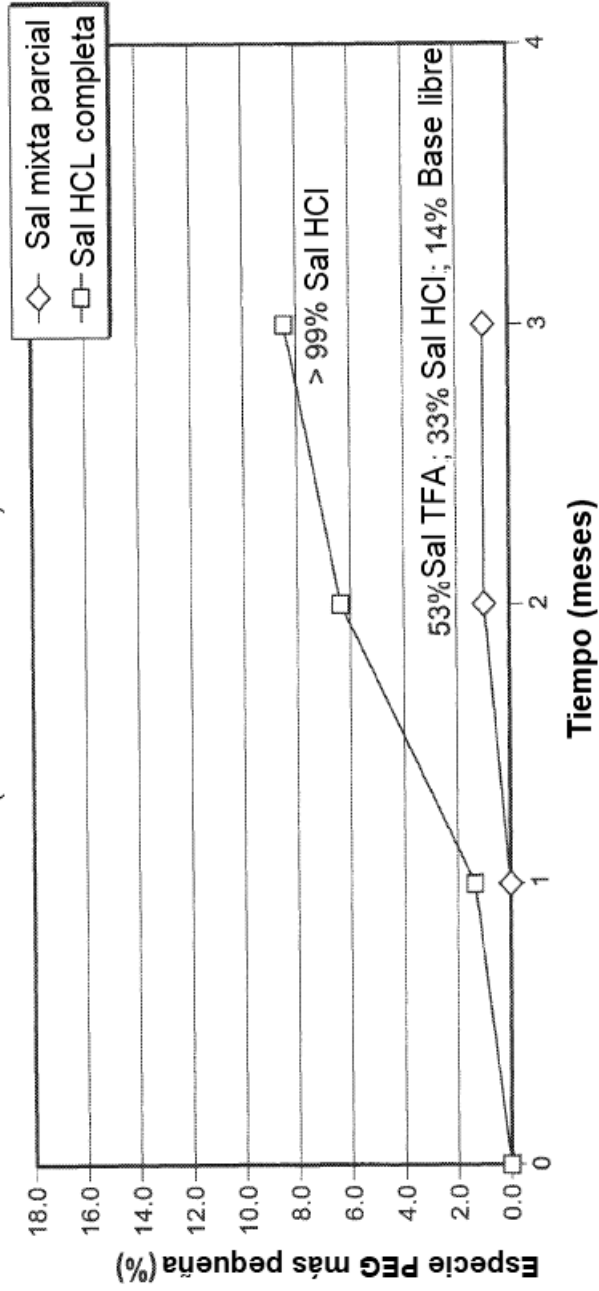


FIG. 3

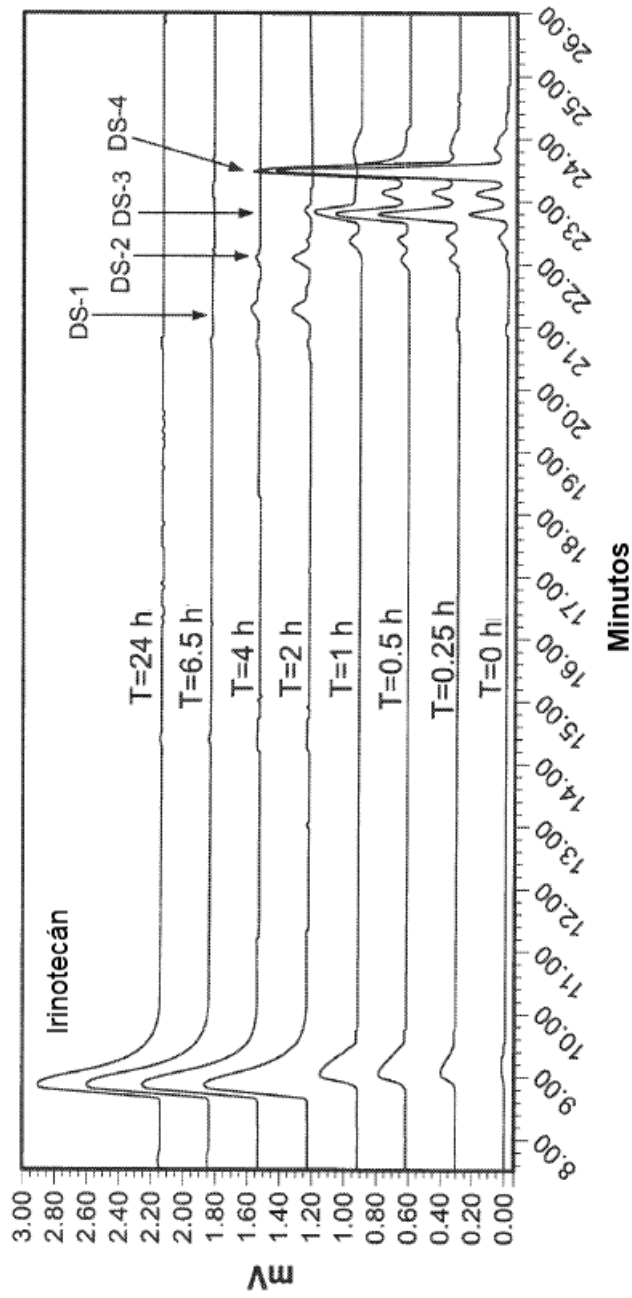


FIG. 4

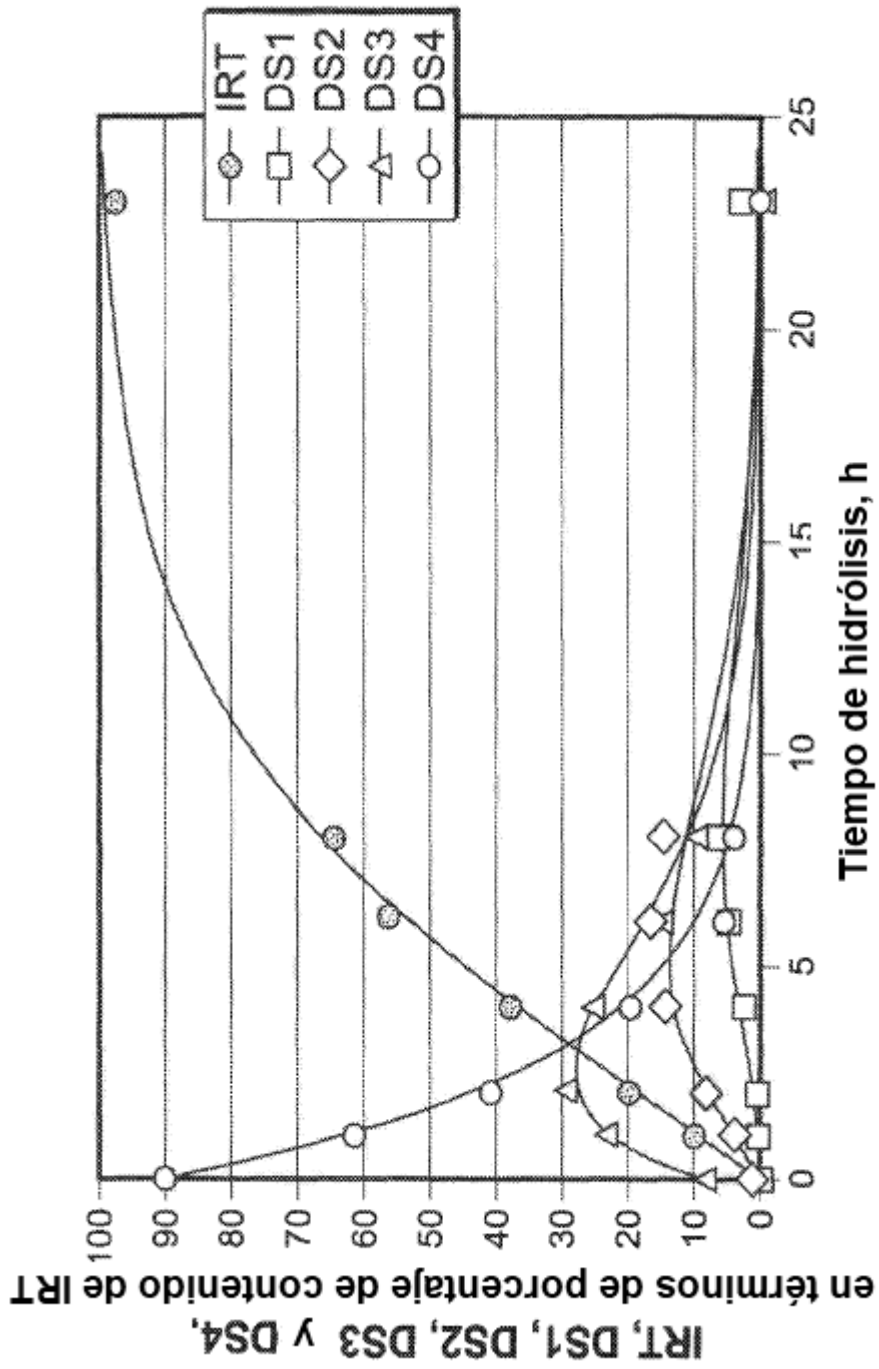


FIG. 5

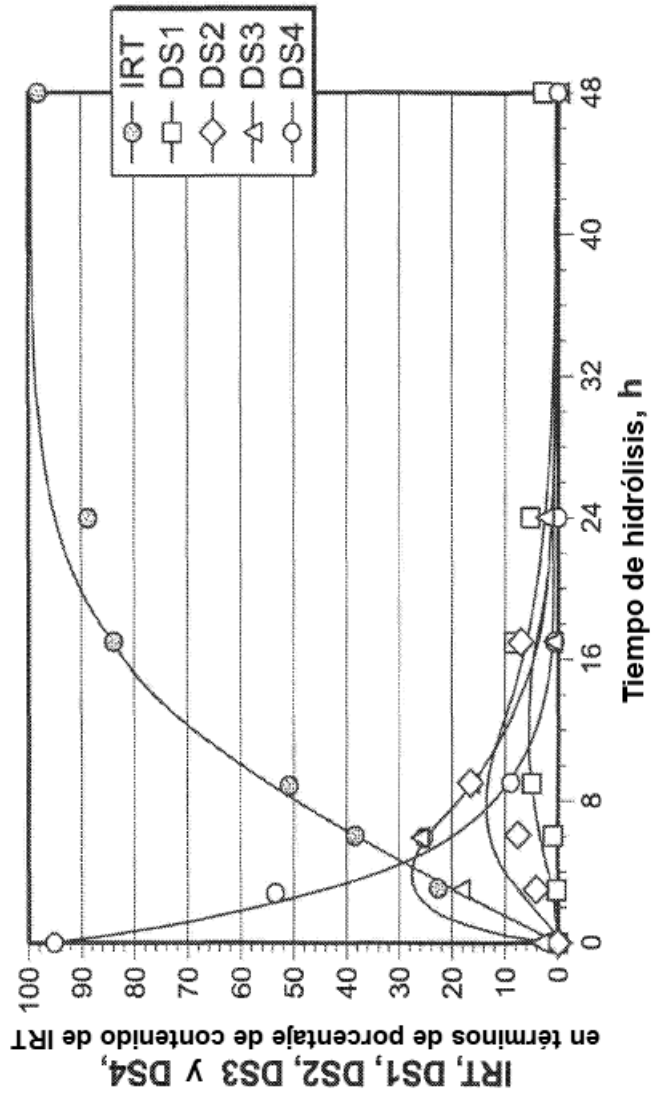


FIG. 6

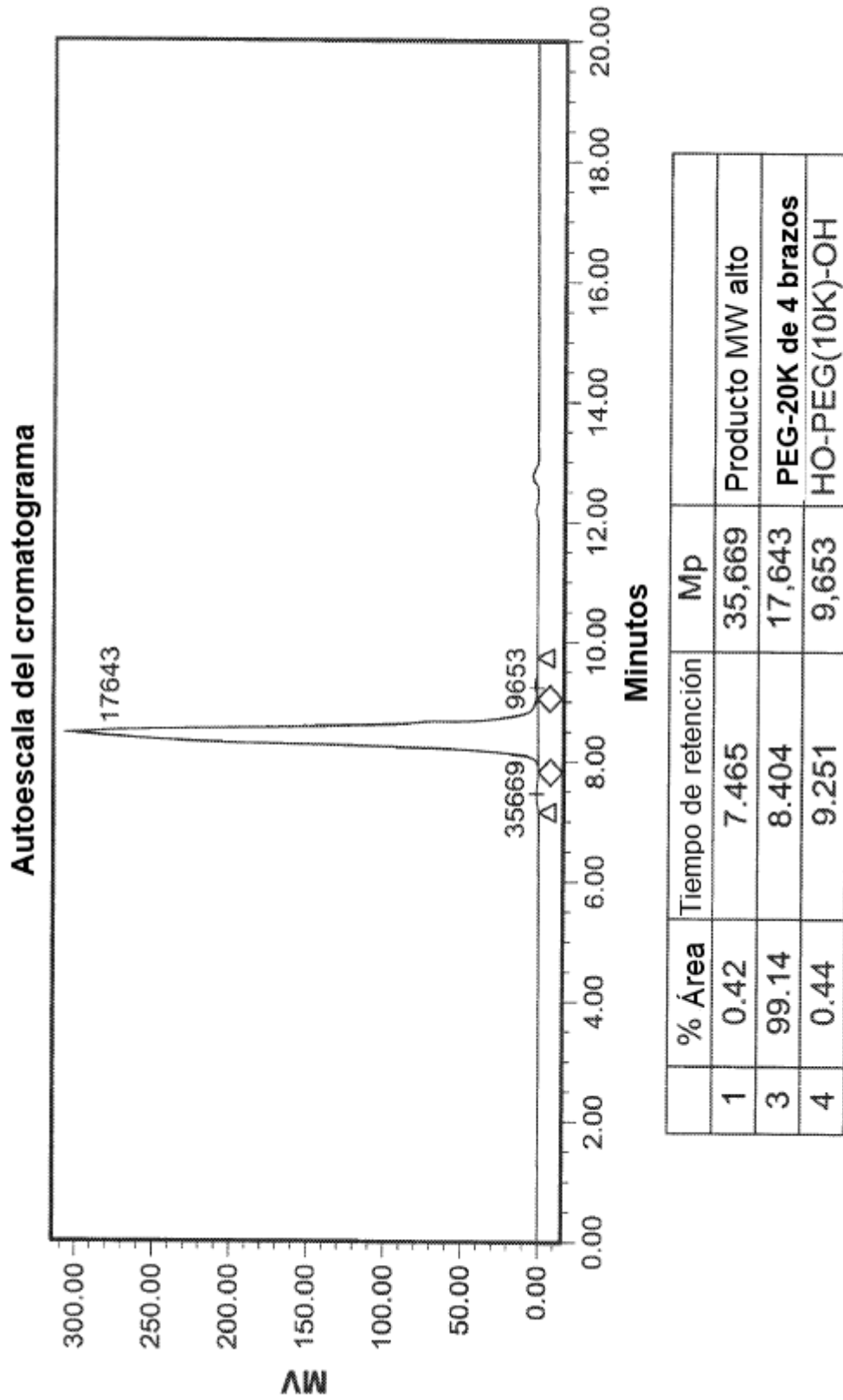
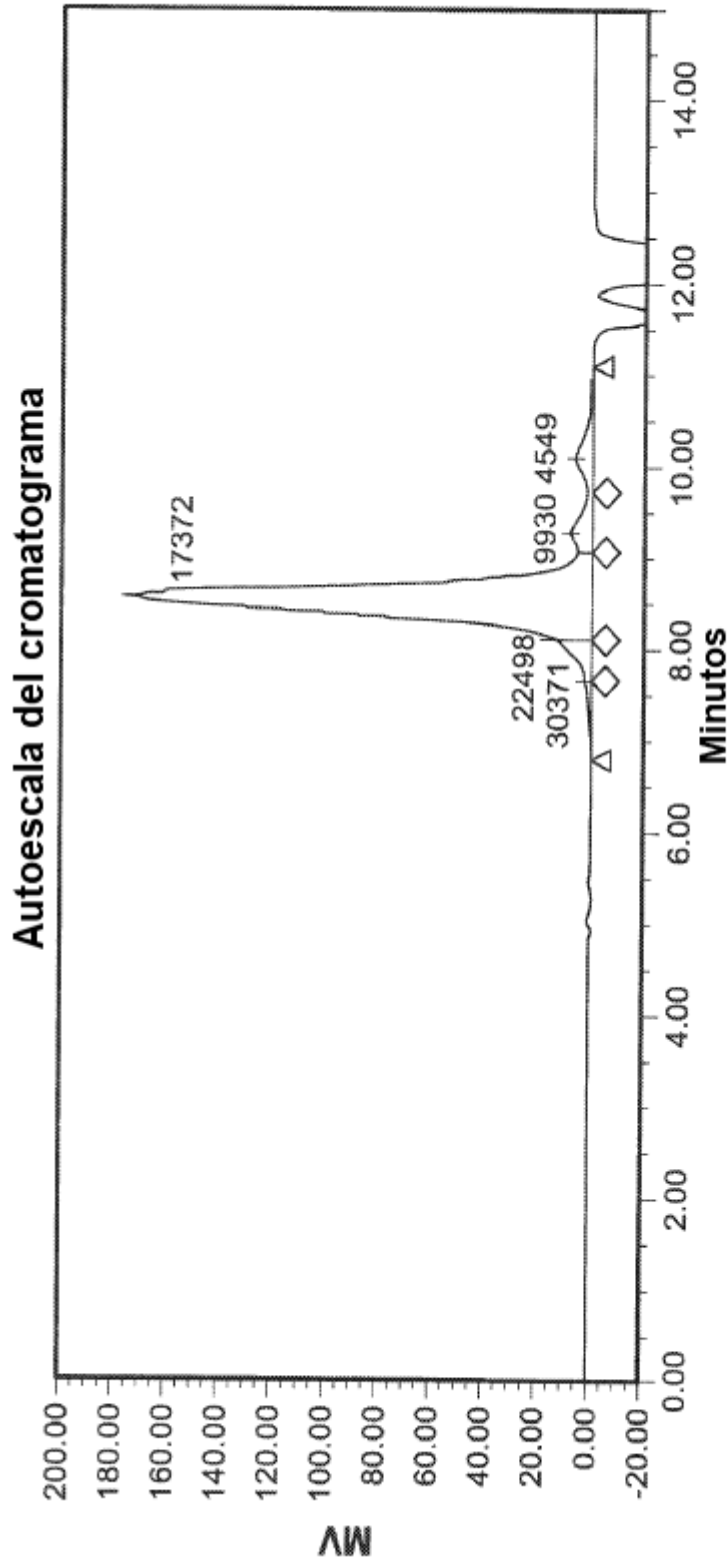


FIG. 7



	% Área	Tiempo de retención	Mp	
1	0.60	7.650	30,371	Producto MW alto
2	3.33	8.100	22,498	Producto MW alto
3	88.56	8.495	17,372	PEG-20K de 4 brazos
4	3.93	9.273	9,930	HO-PEG(10K)-OH
5	3.58	10.106	4,549	HO-PEG(5K)-OH

FIG. 8