

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 983**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/58 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2011 PCT/NL2011/050509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12039602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 11741699 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2618845**

54 Título: **Moléculas enlazadoras biodegradables ajustables para la conjugación transitoria de componentes en sistemas de administración de fármacos, y sistemas de administración de fármacos preparados con ellas**

30 Prioridad:
21.09.2010 US 384730 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2020

73 Titular/es:
**CRISTAL DELIVERY B.V. (100.0%)
Oxfordlaan 55
6229 EV Maastricht, NL**

72 Inventor/es:
**RIJCKEN, CRISTIANNE JOHANNA FERDINAND;
KRUIJTZER, JOHANNES ANNA WILHELMUS;
VAN NOSTRUM, CORNELIS FRANCISCUS;
VAN DER WAL, STEFFEN;
HENNINK, WILHELMUS EVERHARDUS;
LISKAMP, ROBERTUS MATTHIAS JOSEPH y
ALTINTAS, ISIL**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 776 983 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

Moléculas enlazadoras biodegradables ajustables para la conjugación transitoria de componentes en sistemas de administración de fármacos, y sistemas de administración de fármacos preparados con ellas

5 La presente invención se refiere a una clase particular de enlazadores biodegradables, que aseguran una conjugación transitoriamente estable de bloques de construcción y/o compuestos bioactivos en sistemas de administración de fármacos (DDS), tales como DDS basados en micelas poliméricas o hidrogeles. Además, la presente invención se refiere a compuestos que comprenden dichos enlazadores, siendo dichos compuestos preferiblemente profármacos. Además, la invención se dirige a métodos de preparación y al uso de dichos enlazadores, y especialmente dichos enlazadores biodegradables, en un sistema de administración de fármacos. Además, la invención se refiere a un sistema de liberación controlada que comprende una matriz polimérica, capaz de liberar un ingrediente activo, en el que el ingrediente activo está unido covalentemente a las moléculas de polímero de la matriz polimérica a través de dichos enlazadores, así como a un método para preparar tales sistemas de liberación controlada.

15 La administración de compuestos bioactivos a los pacientes a menudo se ve obstaculizada por una pobre solubilidad, rápida eliminación, aparición de alta toxicidad, o combinaciones de los mismos. Estos problemas pueden aliviarse mediante el atrapamiento de compuestos bioactivos en sistemas adecuados de administración de fármacos.

20 Los DDS, como las micelas poliméricas y los sistemas de hidrogel, se consideran candidatos prometedores para la administración dirigida de fármacos u otros compuestos bioactivos adecuados. Por ejemplo, micelas poliméricas basadas en los lactatos termosensibles y biodegradables de polihidroxipropil-metacrilamida o polihidroxietil-metacrilamida pueden encapsular una gran variedad de compuestos terapéuticos hidrófobos. Tales sistemas se describen, por ejemplo, en los documentos WO01/09198 y WO2005/087825. En particular, este último documento, por ejemplo, describe en detalle micelas basadas en copolímeros de bloques de PEG-polimetacrilamida modificados hidrofóticamente. Los polímeros descritos en ambas publicaciones WO muestran una combinación única de sensibilidad a la temperatura y biodegradabilidad, que proporcionan una carga fácil del fármaco y propiedades de liberación controlada, respectivamente, a los sistemas de administración preparados a partir de estos.

25 Estas y diversas otras partículas, preferiblemente de tamaño nanométrico, se evalúan actualmente en la búsqueda de sistemas portadores de fármacos que se dirijan selectivamente a sitios de enfermedad. Esta administración dirigida tiene como objetivo mejorar la eficacia terapéutica y simultáneamente disminuir los perfiles de toxicidad de los compuestos encapsulados.

30 Sin desear estar ligado a una teoría particular, se considera necesario o al menos deseable que los sistemas portadores de fármacos del tipo de la presente invención formen un sistema de circulación prolongada en el torrente sanguíneo y liberen de manera controlada los ingredientes activos presentes en el mismo. Es decir, existe la necesidad de sistemas de depósito que conduzcan, después de una aplicación, a niveles terapéuticos de ingredientes activos durante un período de tiempo más largo que el que se puede lograr cuando se usa el ingrediente activo libre. Con tales sistemas, es una ventaja importante cuando la liberación es ajustable; por ejemplo, depende del tipo de ingrediente activo, la velocidad de liberación y la indicación específica (médica).

35 En caso de que las enfermedades o trastornos estén asociados o acompañados de irregularidades vesiculares, una circulación prolongada probablemente conducirá a una mayor absorción del sistema de administración de fármacos y a la liberación de los mismos de los ingredientes activos. En este sentido, se observa que los vasos con fugas y el drenaje linfático disfuncional durante la inflamación y el crecimiento tumoral proporcionan, por ejemplo, una puerta de entrada para el acceso de nanopartículas después de la administración intravenosa. Este denominado efecto de permeación y retención mejorada (EPR) permite a los nanoportadores acumulados liberar fármacos en las proximidades de las células enfermas. El aspecto crítico de esta estrategia es una semivida en circulación larga del nanoportador para aumentar la probabilidad estadística de extravasación.

40 La característica deseada de circulación prolongada puede lograrse, por ejemplo, mediante un recubrimiento hidrófilo denso de una nanopartícula para evitar la eliminación por el sistema inmunitario del huésped. A este respecto, los liposomas recubiertos con un recubrimiento de polietilenglicol (PEG) se consideran el estándar dorado, ya que muestran semividas en circulación de alrededor de 8-12 horas y hasta el 5-10% de la dosis inyectada se acumula en áreas enfermas.

45 Obviamente, una concentración de fármaco mejorada en la región objetivo solo puede lograrse si las moléculas de fármaco encapsuladas permanecen asociadas hasta que el portador alcanza el sitio objetivo. En dicha búsqueda de sistemas portadores de fármacos, se descubrió que los sistemas evaluados pueden mejorarse en tiempos de circulación y acumulación prolongados, por ejemplo, en tejido tumoral mediante acoplamiento covalente de ingredientes activos al sistema de administración.

50 Particularmente, Rijcken et al. descrito en un artículo titulado "Hydrolysable core-crosslinked thermosensitive polymeric micelles: synthesis, characterisation and in vivo studies" en Biomaterials 2007, 28, 5581-5593 demostró que el entrecruzamiento, es decir, la conjugación covalente de copolímeros de bloques de PEG-polimetacrilamida modificados hidrofóticamente en un núcleo micelar, permanece en circulación sanguínea largo tiempo después de la administración intravenosa en ratones. Además, se encontró que las micelas entrecruzadas vacías se acumulan hasta 6 veces más en el tejido tumoral en comparación con las micelas no entrecruzadas.

Sin embargo, el atrapamiento no covalente de compuestos farmacológicos en estos núcleos micelares entrecruzados no podría evitar una liberación rápida de las moléculas del fármaco inmediatamente después de la inyección. En el documento WO2010/033022, se demostró que mediante el atrapamiento covalente de moléculas de fármaco en el núcleo micelar, los fármacos realmente pueden beneficiarse de la circulación prolongada que, en consecuencia, eleva las concentraciones de fármacos en el tejido tumoral. Particularmente, se encontraron datos sobre una concentración de fármacos elevada 25 veces en caso de un modelo subcutáneo.

La presente invención mejora estos sistemas conocidos (como se ilustrará a continuación en el presente documento para, por ejemplo, paclitaxel (PTX) y dexametasona (DMS); sin embargo, se enfatiza que la presente invención es aplicable a varios ingredientes activos, incluidos fármacos, y por lo tanto aplicable en el tratamiento de todo tipo de enfermedades e indicaciones). Dichos sistemas se pueden aplicar utilizando cualquier tipo de técnicas conocidas, como la administración intravenosa o la implantación. Esto asegurará una mejor selectividad del tejido objetivo para, por ejemplo, micelas poliméricas e hidrogeles.

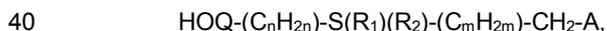
Más detalladamente, el fármaco debe liberarse a tiempo para poder ejercer su efecto terapéutico. Al utilizar un enlace biodegradable, la molécula original del fármaco se liberará de acuerdo con un perfil de liberación controlada específico. La presente invención tiene como objetivo la administración intravenosa de DDS, como los vehículos de administración micelar, que posteriormente permanecen largo tiempo en la circulación sanguínea y liberan en estas condiciones fisiológicas (pH 7,4) los fármacos atrapados de acuerdo con una velocidad predefinida. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos enlazadores covalentes de fármacos, que se hidrolizan, por ejemplo, dentro de 24-48 horas en condiciones fisiológicas, liberando así el compuesto farmacológico original de manera controlada. Esta capacidad de ajuste requiere la puesta a punto en cualquiera de las fármacos (u otro material bioactivo), el enlazador y/o la conjugación química de polímeros. Además, las moléculas que se utilizarán en los sistemas de administración de fármacos deben ser inherentemente seguras y no causar problemas de toxicidad a corto o largo plazo.

La invención se refiere a una nueva clase de enlazadores biodegradables que aseguran la conjugación transitoriamente estable de bloques de construcción y/o compuestos bioactivos en sistemas de administración de fármacos (DDS, por ejemplo, micelas poliméricas o hidrogeles). En esta descripción, los "bloques de construcción" son componentes utilizados para (auto)ensamblarse en un sistema de administración de fármacos, ya sea de origen natural o sintético, potencialmente (parcialmente) derivatizados con fracciones reactivas. Ejemplos bien conocidos incluyen lípidos, colesterol, varios posibles polímeros (por ejemplo, PLGA, PLA, quitosano). En esta descripción, los "compuestos bioactivos" son compuestos de origen natural o sintético, que pueden ejercer un efecto preventivo y/o terapéutico en el cuerpo, que se utilizan para visualizar órganos/vías particulares *in vivo*, o una combinación de ambos.

Particularmente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un enlazador como se define en la reivindicación 1 como enlazador en un sistema de administración de fármacos, en el que el enlazador se acopla a través de su grupo -OH o -COOH a una molécula bioactiva y/o a través de su grupo -COOH a un lípido, colesterol o un polímero del sistema de administración de fármacos. Estos enlazadores son biodegradables en condiciones fisiológicas.

Más específicamente, una característica importante de estos enlazadores es que los enlaces de los compuestos atrapados o los componentes de los sistemas de administración de fármacos se hidrolizan posteriormente, dando como resultado la liberación de los compuestos y/o la desestabilización de los DDS. La cinética de hidrólisis correspondiente se puede ajustar modificando el tipo de enlazador.

El enlazador tiene la siguiente fórmula:



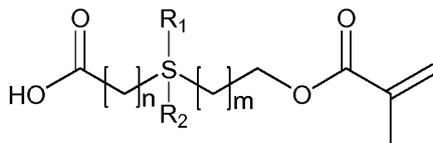
- en la que n es un número entero de 1-3; y m es un número entero de 1-5;

- en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre sí de un par de electrones solitarios, una fracción de oxígeno, tal como =O, una fracción de nitrógeno, tal como =N-R_x, en la que R_x es un grupo de átomos homogéneo o heterogéneo, y preferiblemente, independientemente, un alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, un alqueno C₁-C₆ lineal o ramificado, cuyo grupo alquilo o alqueno opcionalmente puede estar sustituido por uno o más grupos halógeno, grupos hidroxilo, grupos amino o amino sustituidos, grupos de ácido carboxílico, grupos nitro o grupos ciano; o grupos aromáticos, y preferiblemente un grupo fenilo opcionalmente puede estar sustituido por uno o más de los sustituyentes mencionados para los grupos alquilo y alqueno; o un grupo halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino o un grupo amino sustituido (siendo los sustituyentes uno o dos grupos alquilo C₁-C₃), un grupo de ácido carboxílico, un grupo nitro o un grupo ciano;

- en la que A y Q son como se definen en la reivindicación 1.

En la siguiente fórmula, el grupo HO-Q es un grupo de ácido carboxílico y la fracción de conjugación A es un metacrilato polimerizable, cuyas fracciones también se ejemplifican en los ejemplos de trabajo a continuación:

azufre activado



ácido carboxílico

fracción de conjugación,

en este ejemplo un

metacrilato polimerizable

5

Los grupos de conjugación adecuados son fracciones polimerizables de la fórmula $-PL-R_vC=CR_uR_w$, en la que $-PL-$ es un grupo de enlace tal como un $-O-$, un $-NH-$, un $-N-$ sustituido, siendo el sustituyente un alquilo C_1-C_3 , un $-OC(O)-$, un $-O-(C(O))_r-C_6H_{2b}-$, en el que r es 0 o 1, y b es un número entero de 1 a 6; y R_u , R_v y R_w , independientemente, representan un átomo de hidrógeno o un grupo C_1-C_3 .

10

La liberación prematura de fármacos u otros componentes bioactivos de las micelas entrecruzadas se supera mediante la fijación covalente de profármacos encapsulados a través de un enlace biodegradable al núcleo micelar en la etapa de entrecruzamiento. Para permitir la incorporación covalente del profármaco en la red polimérica tras el entrecruzamiento del núcleo micelar y la liberación controlada, por ejemplo, se une un grupo de metacrilato polimerizable al fármaco usando diversos enlazadores hidrolíticamente sensibles. Estos últimos están diseñados específicamente para poder ajustar en forma fina la velocidad de liberación del fármaco desde las micelas. Más específicamente, el hidroxietilmetacrilato se conjuga con la molécula del fármaco, por ejemplo, el fármaco modelo DMS, que es fácil de modificar y tiene un efecto antitumoral comprobado, a través de un sulfuro (DMSL1), un sulfóxido (DMSL2) y un éster de sulfona (DMSL3). El creciente grado de oxidación del átomo de azufre aumenta su carácter de extracción de electrones y, por lo tanto, aumenta la velocidad de hidrólisis del enlace éster vecino. Por lo tanto, se descubrió que estos enlazadores no solo son biodegradables sino que también aportan una gran flexibilidad a la invención.

15

20

En otras palabras, el tipo de derivatización del átomo de azufre tiene un efecto pronunciado. Particularmente, se observó que pueden alcanzarse diferentes estados de oxidación del azufre y usarse principalmente para determinar la estabilidad del éster cercano al reducir o disminuir la densidad electrónica del átomo de carbonilo del éster. Es importante destacar que el tipo de derivatización del átomo de azufre permite más efectos de ajuste fino o desestabilización. Se pueden realizar modificaciones adicionales usando diferentes sustituyentes en el átomo de azufre, de los cuales se muestran a continuación ejemplos de fracciones que contienen nitrógeno y oxígeno. La derivatización adicional en los átomos de nitrógeno, por ejemplo, permite además un ajuste más fino o efectos desestabilizadores. Además, los enlazadores que contienen azufre que contienen menos de dos pares de electrones libres tienen el potencial de ser quirales. En la siguiente tabla se muestran ejemplos típicos, incluidos, entre otros, los siguientes:

25

Fórmula bruta	Nombre químico del sustituyente	Estructura química del sustituyente	Nombre abreviado
S	sulfuro		L1
SO	sulfóxido		L2
SO ₂	sulfona		L3
S(O)NR	sulfoximina		L4
S(NR ₁)(NR ₂)	sulfona diimina		L5
S(NR)	sulfilimina		L6

30

En esta tabla, R_3 tiene el significado de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C_1-C_3 o de otras fracciones con propiedades generales de empuje o donación de electrones, por ejemplo, un sustituyente halógeno tal como un sustituyente flúor o una fracción alquino. Además, la posición del átomo de azufre (derivatizado) en el enlazador con respecto a la fracción de ácido carboxílico (indicada como n en las fórmulas anteriores) y la posición del átomo de azufre (derivatizado) en el enlazador con respecto a la fracción de conjugación A (indicada como m en las fórmulas anteriores), puede usarse para influir en la biodegradabilidad del enlazador y la liberación del constituyente activo.

35

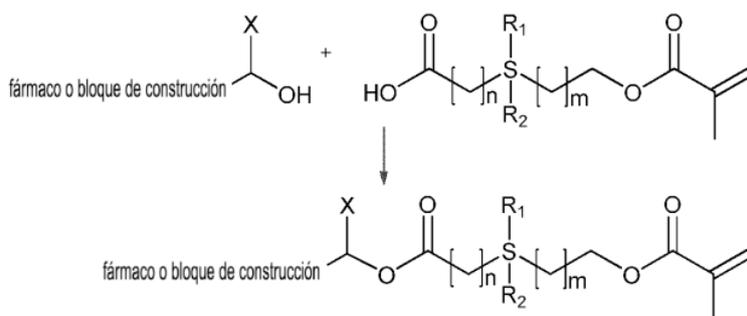
Estas variables indicadas mencionadas anteriormente no requieren cada vez la optimización química de la formación de enlaces éster, sino que se puede usar un único método de conjugación de un fármaco/bloque de construcción con una molécula enlazadora. Los enlazadores de la invención basados en azufre dialquilado potencialmente derivatizado adicionalmente con fracciones de extracción o donación de electrones en la proximidad de un enlace éster, un enlace éter o un enlace amida para fines de liberación controlada de fármacos, pueden usarse para afectar la (des)activación de la sensibilidad hidrolítica de dicho enlace por un derivado de azufre cercano; son capaces de adaptar la sensibilidad a la hidrólisis de dicho enlace para fines de administración controlada de fármacos; y cubren un amplio período de tiempo con respecto a la velocidad de hidrólisis.

En realizaciones preferidas, la invención se refiere a compuestos que comprenden dicho enlazador acoplado a través de su grupo COOH a dexametasona o paclitaxel. Alternativamente, el enlazador podría contener una fracción OH (primaria o secundaria) y el fármaco una fracción COOH. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos componentes activos; el tipo de compuesto bioactivo que se debe atrapar incluye, pero no se limita a, moléculas de fármacos, por ejemplo del tipo (gluco)corticosteroide o del tipo quimioestático, péptidos/proteínas, agentes de formación de imágenes, material genético o una combinación de estos.

La presente invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con dicho primer aspecto como enlazador biodegradable en un sistema de administración de fármacos. Particularmente, estos compuestos se usan como enlazador biodegradable, en el que el enlazador es biodegradable en condiciones fisiológicas. Las "condiciones fisiológicas" son condiciones presentes en un organismo a tratar con el DDS de la invención; para los humanos, estas condiciones abarcan un pH de aproximadamente 7,4 y una temperatura de aproximadamente 37 °C. Este enlazador está presente entre las moléculas transportadoras y el ingrediente activo; es decir, el ingrediente activo está acoplado covalentemente al material de la matriz y, por lo tanto, forma parte de un sistema entrecruzado con núcleo. Los ingredientes activos adecuados son moléculas de fármacos, por ejemplo del tipo (gluco)corticosteroide o del tipo quimioestático, péptidos/proteínas, agentes de formación de imágenes, material genético o una combinación de estos. En una realización preferida de este uso, el sistema de administración de fármacos libera dexametasona o paclitaxel como ingrediente activo.

Para sintetizar y formar un DDS, que comprende y libera ingredientes activos, usando las moléculas enlazadoras de la invención, es un requisito tener disponible una fracción funcional en el bloque de construcción y/o compuesto bioactivo para permitir la conjugación al enlazador. Esta fracción funcional y reactiva en el bloque de construcción o compuesto bioactivo puede ser elegida por un experto en la materia con base en su conocimiento químico común y puede ser, por ejemplo, un alcohol o amina primaria o secundaria o un grupo COOH. En una realización preferida, este es un alcohol primario o secundario, o COOH.

En una etapa posterior, se inicia una conjugación entre la fracción de ácido carboxílico del enlazador y, por ejemplo, la fracción de alcohol del bloque de construcción o compuesto bioactivo, formando así un enlace éster, cuya conjugación se ejemplifica mediante el siguiente esquema de reacción:



En este esquema, X puede, por ejemplo, ser H o CH₃ y R₁ y R₂ tienen el significado dado anteriormente.

Como resultado de la conjugación general descrita anteriormente, se obtiene un profármaco o bloque de construcción modificado.

Este profármaco o bloque de construcción modificado se atrapa posteriormente (por etapas) y se conjuga con un DDS. Este tipo de conjugación incluye, pero no se limita a, una reacción de condensación (por ejemplo, ácido carboxílico y una fracción de alcohol), una reacción de polimerización (radicales libres), una reacción clic y formas similares de conjugar el enlazador (derivatizado) a un sistema polimérico. El enlace formado con el tiempo es, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, hidrolizado con una velocidad ajustable como se describe a continuación en este documento con más detalle.

El fármaco, el bloque de construcción o tanto el agente bioactivo como el bloque de construcción de los componentes del sistema de administración pueden unirse covalentemente entre sí a través de la clase de enlazadores descritos anteriormente.

Estas etapas están en conformidad con el método que forma la invención del documento WO-2010/033022, cuyo

documento se incorpora aquí como referencia para proporcionar un método de preparación detallado del DDS de la presente invención.

5 Por lo tanto, los fármacos o profármacos polimerizables de la invención se incorporan al núcleo de DDS, tal como las micelas, en un proceso de dos etapas. Primero, los conjugados de fármaco hidrófobo quedaron atrapados físicamente en el núcleo hidrófobo, por ejemplo, tras la formación de micelas. En segundo lugar, los polímeros se entrecruzaron en el núcleo micelar mediante polimerización por radicales libres y los (pro)fármacos se copolimerizaron simultáneamente en la red entrelazada recién formada. De acuerdo con la invención, se obtuvo una encapsulación altamente eficiente de los profármacos (> 95%) a una capacidad de carga del 10% (concentraciones finales p/p de fármaco/polímero). Como se observó por la dispersión dinámica de la luz, las micelas resultantes eran bastante monodispersas con un tamaño de ~
10 60-90 nm (índice de polidispersidad menor a 0,1).

Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es un sistema de liberación controlada que comprende una matriz polimérica, capaz de liberar un ingrediente activo, en el que el ingrediente activo está unido covalentemente a las moléculas poliméricas de la matriz polimérica a través de un enlazador como se define en las reivindicaciones.

15 El uso de la clase de enlazadores de la presente invención no se limita al uso de polímeros que pueden formar micelas: también permite el atrapamiento biodegradable de moléculas (fármacos) en nanopartículas poliméricas, microesferas, hidrogeles o recubrimientos o DDS similares conocidos por alguien experto en la materia.

20 Con respecto a la aplicación de estos sistemas de administración (cargados de fármacos), ejemplos no limitantes son (i) liberación controlada de moléculas (fármacos) atrapadas en micelas (entrecruzadas) tras la administración *in vivo*, por ejemplo, por aplicación oral, inyección en el torrente sanguíneo, o por inyección directa en un órgano o tumor; (ii) liberación controlada de fármacos y/o proteínas atrapados en un hidrogel polimérico (entrecruzado), ya sea por administración intravenosa (nanogeles) o por administración localizada (macrogeles); y (iii) liberación controlada de moléculas (fármaco) tras el recubrimiento de un dispositivo con moléculas de fármaco atrapadas.

25 También se describen métodos para preparar los enlazadores de la invención. En un primer aspecto, se hace reaccionar un bromoacetato de alquilo con un mercaptoalcohol; el alcohol resultante se hace reaccionar posteriormente con el A-Cl, en el que A es la fracción de conjugación; y división del grupo alquilo.

En un aspecto adicional, el producto obtenido se oxida adicionalmente, por ejemplo usando peryodato de sodio.

En aun un aspecto adicional, se hace reaccionar un bromoacetato de alquilo con un mercaptoalcohol, seguido de oxidación completa del átomo de azufre, haciendo reaccionar el alcohol resultante con A-Cl, en el que A es la fracción de conjugación y la división del grupo alquilo.

30 Estos métodos se ilustran con todo detalle en el Ejemplo 1.

Otro aspecto más de la invención es un método para preparar dicho sistema de liberación controlada, que comprende las etapas de proporcionar un bloque de construcción y/o un compuesto bioactivo que tenga una fracción funcional para permitir la conjugación con el enlazador, preferiblemente en el que la fracción funcional es un alcohol primario o secundario o un grupo COOH; iniciar una conjugación entre la fracción que contiene -OH, tal como la fracción de ácido carboxílico, del enlazador y dicha fracción funcional del compuesto bioactivo, formando así un profármaco; y atrapar en él y conjugarlo con la matriz polimérica de dicho profármaco.
35

También se describe un método para preparar un sistema de liberación controlada, que comprende las etapas de proporcionar un componente básico y/o un compuesto bioactivo que tenga una fracción funcional para permitir la conjugación con el enlazador, preferiblemente un alcohol primario o secundario o un COOH; iniciar una conjugación entre la fracción que contiene -OH, tal como la fracción de ácido carboxílico del enlazador y dicha fracción funcional del bloque de construcción o compuesto bioactivo, formando así un profármaco o bloque de construcción modificado; y atrapar en él y conjugarlo con la matriz polimérica de dicho profármaco o bloque de construcción modificado.
40

Debido al enlace formado presente entre la matriz polimérica y el ingrediente activo (fármaco, bloque de construcción) tal como un enlace éster, el sistema de liberación controlada formado está sujeto a una degradación y liberación controladas. Particularmente, el enlace, y especialmente el enlace éster, se hidroliza en condiciones fisiológicas con el tiempo.
45

Como se bosquejó anteriormente en el presente documento, un aspecto importante de la presente invención es que la fracción próxima al grupo hidrolizable, tal como el grupo éster (= sustituyente) en el enlazador retarda o facilita la hidrólisis (del éster). Molecularmente hablando, el sustituyente es un átomo de azufre, que se puede colocar más cerca o más lejos del enlace hidrolizable (reflejado por el significado de n en la fórmula mostrada anteriormente) para reducir o mejorar la estabilidad (del éster), respectivamente, y que se activa adicionalmente por derivatización con fracciones que retiran electrones, o se desactiva por derivatización con fracciones donadoras de electrones. En otras palabras, la elección y la posición de dicho sustituyente permite un ajuste real fino hacia una velocidad de hidrólisis deseada. La consecuencia práctica es que la liberación de la molécula del fármaco (original) y/o la desintegración del DDS se produce de acuerdo con una velocidad que está verdaderamente controlada por el tipo y la posición del sustituyente.
50

55 El concepto de la presente invención se ejemplificará por (pero no se limita a) micelas poliméricas basadas en lactatos

5 biodegradables y termosensibles de polihidroxipropil-metacrilamida o polihidroxietil-metacrilamida. Para garantizar una circulación prolongada y la acumulación en los tumores, estas micelas están entrecruzadas en el núcleo. Para limitar la eliminación rápida de los fármacos encapsulados después de la introducción en el cuerpo a tratar, por ejemplo, por inyección en el cuerpo, tal como por administración intravenosa y/o para aumentar la selectividad del tejido objetivo, se usan los enlazadores de la presente invención.

Este tipo de micelas poliméricas pueden encapsular una gran variedad de compuestos terapéuticos (ligeramente) hidrófobos. A continuación, se utilizarán dexametasona (DMS) y paclitaxel (PTX) como componentes activos ilustrativos.

Se demostrará que una nueva clase de profármacos DMS y PTX puede incorporarse covalentemente en la red de las micelas entrecruzadas y mostrar una liberación realmente controlada *in vitro* (entre días y semanas).

10 Con una semivida muy larga en la circulación de 14 h en comparación con 0,09 h para el fármaco libre y 0,12 h para el DMS encapsulado no covalente, se demuestra que el enlace covalente de los profármacos a las micelas de CCL previene la liberación prematura en ráfaga en el torrente sanguíneo. La semivida en circulación es incluso claramente más larga que el fosfato de dexametasona (DMS-P) en liposomas estabilizados estéricamente (es decir, 7,6 h), que se considera el estándar dorado en la actualidad. Como resultado, el profármaco coentrecruzado proporciona una acumulación tumoral significativamente mejorada (23 veces más alta que para el fármaco libre). La eficacia terapéutica se demostró por un retraso similar en el crecimiento tumoral de melanoma subcutáneo en comparación con el DSM-P libre.

15 En particular, se desarrollan micelas poliméricas basadas en polímeros biorreabsorbibles, que son poli(N-hidroxialquil-metacrilamida) termosensibles derivatizados con cadenas laterales de oligolactato. Estos copolímeros de bloque con un bloque termosensible y un bloque de PEG son completamente solubles en agua a 0 °C, pero se autoensamblan rápidamente en pequeñas micelas monodispersas de ~ 70 nm al calentar por encima de la temperatura de transición de fase ajustable. Este método se aplica para encapsular una gran variedad de fármacos hidrófobos, casi cuantitativamente, dentro de los núcleos micelares.

20 Como se describió anteriormente, la estabilidad de tales micelas ya estaba mejorada por el entrecruzamiento covalente de los copolímeros de bloque después de modificar el bloque termosensible con grupos de metacrilato polimerizable. Las micelas resultantes entrecruzadas del núcleo mostraron una excelente estabilidad *in vitro* mientras conservaban completamente su biodegradabilidad. Lo más importante es que el entrecruzamiento de las micelas fue crítica para lograr una circulación en sangre prolongada (semivida de 13 horas) en ratones y una acumulación alta y sostenida en tumores.

25 La presente invención evita, después de la administración intravenosa de las micelas cargadas de fármaco, una eliminación demasiado rápida, ya sea debido a la rápida disociación de las micelas y/o liberación repentina del fármaco. En particular, se demostrará que mediante la inclusión covalente de una serie de profármacos polimerizables DMS o PTX, la velocidad de liberación de dexametasona y paclitaxel, respectivamente, se controló realmente. Además, este complejo de micelas cargado de profármacos tenía una circulación en sangre muy larga ($t_{1/2}$ ~ 14h), se obtiene un período mucho más prolongado de niveles terapéuticos, y dicho complejo fue capaz de atacar el tejido tumoral subcutáneo en ratones de manera muy eficiente.

30 De acuerdo con la presente invención, se muestra que los fármacos u otros compuestos hidrófobos se benefician de la acumulación tumoral mejorada de micelas entrecruzadas en el núcleo, cuando estas se fijaron dentro de las micelas a través de un enlazador biodegradable. Esta conjugación covalente crea un verdadero sistema de portador dirigido al tumor, que carece de una liberación en ráfaga. Cuando se usa en ratones, la invención demuestra claramente una eficacia terapéutica con respecto a la regresión tumoral y en un modelo de ratón con artritis reumatoide.

35 Como se dijo anteriormente en el presente documento, es posible controlar la velocidad de liberación ajustando la sensibilidad del enlace hidrolizable (éster) en el nuevo enlazador hacia la degradación hidrolítica. El tipo exacto de enlazador utilizado determinará el perfil de liberación controlada final mediante el cual se libera el compuesto activo original.

Además, esta estrategia es ampliamente aplicable a compuestos bioactivos que contienen hidroxilo y -COOH.

40 El carácter biodegradable de las propias micelas entrecruzadas de larga circulación asegura la desintegración en pequeños fragmentos que pueden eliminarse mediante eliminación renal. En comparación con los liposomas como el estándar dorado de los portadores de fármacos en nanopartículas, este sistema de administración de fármacos de la invención conduce a

50 (i) circulación sanguínea prolongada: depósito que produce niveles prolongados en sangre/tejido, por ejemplo, taxol 6 horas, PTXLx (invención) hasta 60 horas; y

(ii) mayor acumulación en tejidos con vasculatura permeable, por ejemplo, tumor y tejido inflamado. La acumulación pasiva en sitios de mayor permeabilidad capilar aumenta la aplicabilidad de la plataforma micelar.

Una característica atractiva adicional de la invención son las eficiencias de encapsulación casi cuantitativas para una amplia variedad de compuestos hidrófobos.

La presente invención no se limita a micelas poliméricas. También otros tipos bien conocidos de vehículos de administración de fármacos, como los conjugados polímero-fármaco, pueden beneficiarse de la presente invención. Está dentro del alcance de la persona experta sintetizar un conjugado polímero-fármaco adecuado, y atraparlo dentro de una gama de posibles sistemas de administración de fármacos.

5 La micela polimérica de la invención actúa como un vehículo real con perfiles de liberación sostenida y una acumulación mejorada en el tejido y un mecanismo de liberación controlada incluido. Esto abre, además de la administración selectiva de fármacos, muchas posibilidades de llevar a cabo estudios mecanicistas para separar el orden de las circunstancias fisiopatológicas y/o las vías de agentes anticancerígenos o inflamatorios que interactúan con los fármacos.

10 El sistema de liberación controlada de la presente invención es adecuado para el tratamiento de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en cáncer, infección, enfermedades oftalmológicas, infección viral, infección bacteriana, infección por hongos, infección por micoplasma, infección por parásitos, inflamación, enfermedades dermatológicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades autoinmunes, enfermedades proliferativas, artritis, enfermedades psicóticas, psoriasis, diabetes, trastornos metabólicos, enfermedades del pulmón, enfermedades respiratorias, enfermedades pulmonares, EPOC, enfermedades del sistema musculoesquelético, enfisema, edema, enfermedades hormonales. El sistema de liberación controlada de la presente invención también es adecuado para la administración de anestésicos, para ser utilizados en la vacunación, ya sea terapéutica o preventiva.

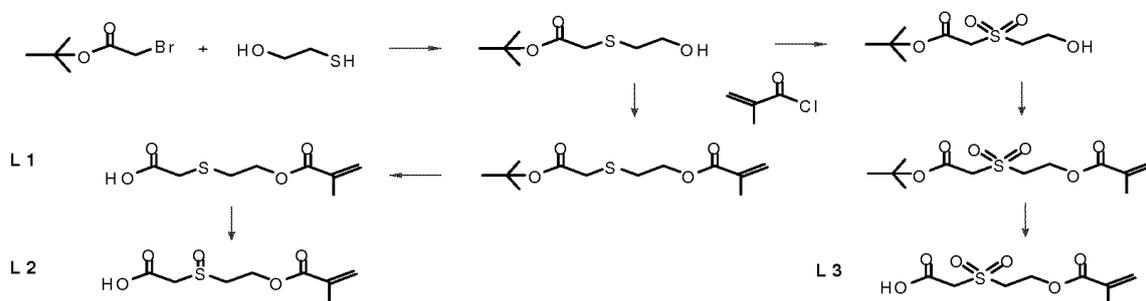
En los ejemplos de trabajo a continuación, se utilizan los siguientes materiales:

20 Los anhídrido acético radiomarcado con ³H y el anhídrido acético radiomarcado con ¹⁴C eran productos de Amersham (Roosendaal, Países Bajos) y Perkin Elmer (Boston, Estados Unidos), respectivamente. El cóctel de centelleo líquido Ultima Gold y el solubilizador de tejido Solvable se adquirieron a través de Perkin Elmer Bioscience BV (Groningen, Países Bajos). La dexametasona (> 98%), el agua deuterada (D₂O) y el ácido trifluoroacético (TFA) se usaron tal como se recibieron de Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Bajos). El fosfato de dexametasona (DMS-P) se adquirió en Bufa, Uitgeest, Países Bajos. El peróxido de hidrógeno y el persulfato de potasio (KPS) se obtuvieron de Merck (KGaA, Darmstadt, Alemania). Paclitaxel (PTX, MP Biomedicals Inc, Illkirch, Francia), Taxol (Mayne Pharma, Bruselas, Bélgica), N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED, Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), acetonitrilo (ACN, Biosolve Ltd., Valkenswaard, Países Bajos) se utilizaron tal como se recibieron. Una solución al 20% de dodecilsulfato de sodio (SDS) de Biorad Laboratories (Hercules, Estados Unidos) se diluyó 1:1 con tampón de pH 5 (acetato de amonio, 120 mM). Todos los tampones se filtraron a través de filtros de 0,2 µm (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel, Alemania) antes de su uso.

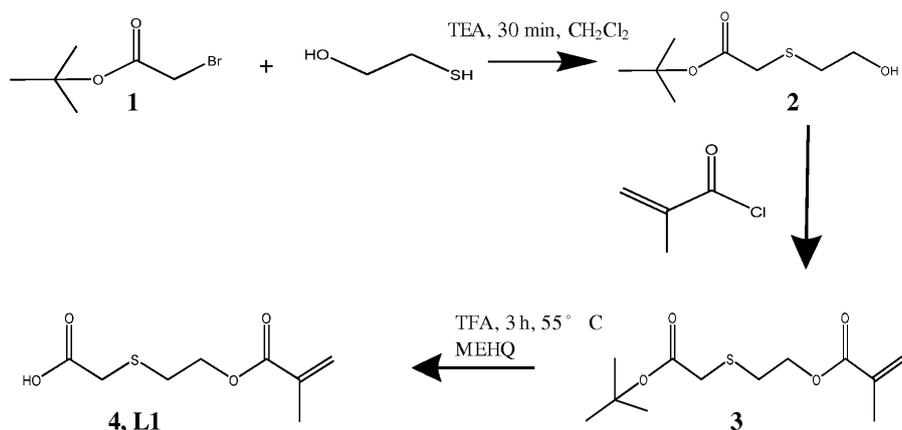
35 Además, en los ejemplos de trabajo, se determinó el tamaño promedio de partícula (Z_{promedio}) y el índice de polidispersidad (PD) de las micelas con dispersión dinámica de luz (DLS) usando un goniómetro Malvern ALV/CGS-3. Los espectros de RMN ¹H se registraron con un espectrómetro Gemini de 300 MHz (Varian Associates Inc., NMR Instruments, Palo Alto, CA, Estados Unidos). La radiactividad de las dispersiones micelares se determinó en un cóctel de centelleo líquido Ultima Gold y se contó en un contador de centelleo líquido Packard Tricarb 2200 CA.

Ejemplo 1 - Síntesis de los enlazadores de la presente invención.

Los enlazadores de fármacos L1, L2 y L3, como se ejemplifica en la tabla anterior, se sintetizaron de acuerdo con las siguientes rutas:



40 En cuanto a L1, en detalle, se llevaron a cabo las siguientes etapas:



2-(2-hidroxi-etiltio)acetato de terc-butilo (2): se disolvieron bromoacetato de terc-butilo 1 (15 g, 0,077 mol, 1 equiv.) y trietilamina (16 g, 0,16 mol, 2 equiv.) en CH_2Cl_2 (100 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió a 0 °C. Se añadió lentamente a la mezcla 2-mercaptoetanol (6,3 g, 0,081 mol, 1,05 equiv.) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 1 hora adicional. La finalización de la reacción se controló por TLC (acetato de etilo (EtOAc):hexano (Hex), 1:1 (v/v), Rf: 0,88). Las extracciones con base y ácido se llevaron a cabo con KCO_3 1 M, pH 10 y NaOAc 1 M pH 3,5, dos veces, respectivamente. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con MgSO_4 y se filtraron a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El filtrado se concentró al vacío (CH_2Cl_2) para obtener 9,2 g (62% de rendimiento) 2 como un aceite incoloro.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 3,7 (q, 2H), 3,18 (s, 2H), 2,8 (d, 2H), 1,47 (s, 9H); RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 4,77 (s, OH), 3,52 (s, 2H), 3,19 (s, 2H), 2,62 (t, 2H), 1,39 (s, 9H).

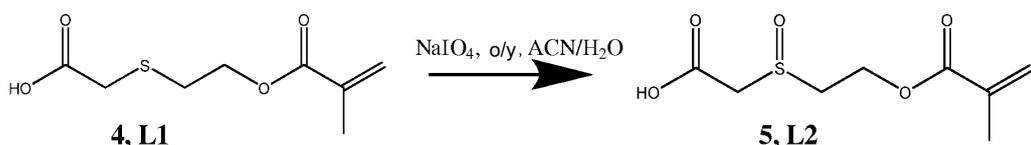
Metacrilato de 2-(2-terc-butoxi-2-oxoetil)etilo (3): 2 (8,6 g, 0,045 mol, 1 equiv.) y trietilamina (9,05 g, 0,089 mol, 2 equiv.) se disolvieron en CH_2Cl_2 (20 mL) en hielo bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió lentamente cloruro de metacrililoilo (5,6 g, 0,054 mol, 1,2 eq.) a la mezcla. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (EtOAc:Hex, 1:1 (v/v), Rf: 0,86). El exceso de cloruro de metacrililoilo se eliminó con metanol para formar metacrilato de metilo. 3 se extrajo dos veces con una solución saturada de NaHCO_3 de pH = 8. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron con MgSO_4 y se filtraron a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El filtrado fue concentrado al vacío. La evaporación del codisolvente con EtOAc, Hex y CH_2Cl_2 , respectivamente, se realizó para eliminar las impurezas volátiles. Se obtuvieron 10,5 g (rendimiento del 90%) 3 como un aceite amarillo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 6,12 (s, H), 5,58 (s, H), 4,34 (t, 2H), 3,18 (s, 2H), 2,93 (t, 2H), 1,94 (s, 3H), 1,47 (s, 9H); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 18,5 (CH_3), 28,2 (CH_3), 31,0 (CH_2), 35,1 (CH_2), 63,5 (CH_2), 81,9 (CH_2), 126,1 (C) 136,3 (C), 167,3 (C), 169,6 (C).

Ácido 2-(2-(metacrililoixi)etiltio)acético (4): se disolvió lentamente 3 (2 g, 7,7 mmol, 1 equiv.) en ácido trifluoroacético (TFA) (10 mL) en hielo bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió una cantidad traza de monometil éter de hidroquinona (MEHQ) a la mezcla de reacción para evitar la polimerización. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 55°C. La finalización de la reacción se controló por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HOAc}$, 9:1:0,1 (v/v), Rf: 0,17). El exceso de TFA se eliminó por evaporación y evaporación conjunta con CH_2Cl_2 y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 4: 1 (v/v)). El compuesto 4 puro se secó con MgSO_4 y se filtró a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El filtrado se concentró al vacío. Se obtuvo 1 g (rendimiento del 63%) del compuesto 4 como un aceite amarillo claro.

RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 6,13 (s, 1H), 5,59 (s, 1H), 3,65 (t, 2H), 3,34 (s, 2H), 2,96 (t, 2H), 1,95 (s, 3H); RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 6,02 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 4,24 (t, 2H), 3,3 (s, 2H), 2,85 (t, 2H), 1,86 (s, 3H); RMN ^{13}C (DMSO): δ (ppm) 23,36 (CH_3), 35,69 (CH_2), 38,73 (CH_2), 68,68 (CH_2), 131,3 (CH_2), 141,1 (C), 171,9 (C), 176,8 (C).

En cuanto a L2, se realizó la siguiente etapa:

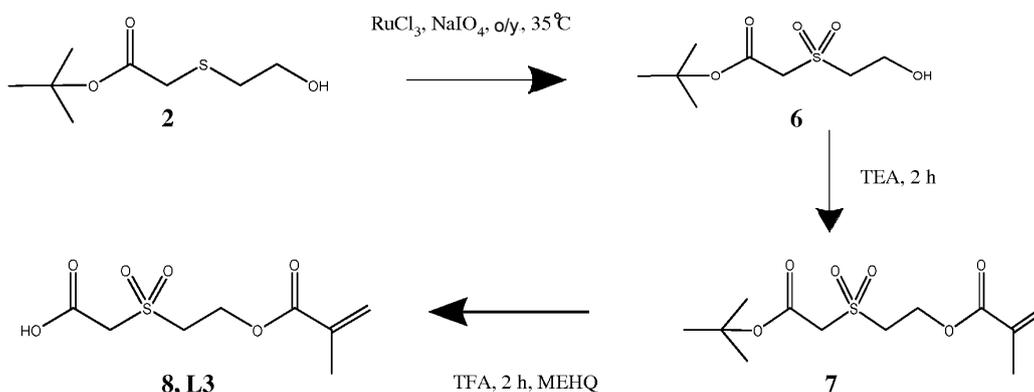


Ácido 2-(2-(metacrililoiloxi)etiltio)acético (5): El compuesto 4 (1 g, 4,9 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (ACN) (10 mL) se mezcló con una solución de peryodato de sodio (1,1 g, 4,9 mmol, 1 equiv.) disuelto en H_2O (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La finalización de la reacción se confirmó por TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{TFA}$, 75:25:0,1 (v/v), Rf: 0,23). La mezcla de reacción se filtró mediante filtración por succión para eliminar las sales de yodato de sodio mediante

EtOAc y se secó con MgSO_4 y se filtró a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El filtrado se concentró al vacío y se evaporó conjuntamente con CH_2Cl_2 . Se obtuvieron 0,87 g (rendimiento del 81%) compuesto 5 como un sólido blanco.

5 RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 6,15 (s, 1H), 5,64 (s, 1H), 4,58 (m, 2H), 3,9 (d, 1H), 3,7 (d, 1H), 3,39 (m, 2H), 1,94 (s, 3H); RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 6,04 (s, 1H), 5,70 (s, 1H), 4,4 (m, 2H), 3,95 (d, 1H), 3,74 (d, 1H), 3,17 (m, 2H), 1,87 (s, 3H); RMN ^{13}C (DMSO): δ (ppm) 23,34 (CH_3), 55,38 (CH_2), 61,67 (CH_2), 62,83 (CH_2), 131,78 (CH_2), 140,96 (C), 171,64 (C), 172,93 (C).

En cuanto a L3, se llevaron a cabo las siguientes etapas:



10 2-(2-hidroxiethylsulfonil)acetato de terc-butilo (6): el compuesto 2 (2,0 g, 10,4 mmol, 1 equiv.) se disolvió en ACN (20 mL) y CCl_4 (20 mL). Se añadió una solución de NaOH (6,7 g, 31 mmol, 3 eq.) en 30 mL de agua a la mezcla de reacción con agitación vigorosa. Se añadió RuCl_3 (43 mg, 0,21 mmol, 0,02 equiv.) una vez que las dos fases se mezclaron en una emulsión. La mezcla de reacción se calentó luego a 35°C y se agitó durante la noche. La reacción se controló mediante TLC (EtOAc/Hex, 3:2, valores de Rf: 6: 0,16, 2: 0,53). Una vez que se completó la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con éter (100 mL), se agitó vigorosamente durante 15 minutos, se secó con MgSO_4 y se filtró a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El residuo se lavó con éter (3 x 30 mL) y el filtrado se concentró al vacío en una campana extractora. Posteriormente se purificó en una columna de gel de sílice (EtOAc/Hex, 3:2 (v/v)). Se obtuvieron 1,15 g (50% de rendimiento) del compuesto 6 como un aceite amarillo.

15 RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 5,17 (s, OH), 4,22 (s, 2H), 3,80 (t, 2H), 3,37 (t, 2H), 1,42 (s, 9H).

20 Metacrilato de 2-(2-terc-butoxi-2-oxoethylsulfonil)etilo (7): Se disolvió el compuesto 6 (1 g, 4,6 mmoles, 1 equiv.) puro en diclorometano seco (DCM) (10 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron trietilamina (0,93 g, 9,2 mmol, 2 equiv.) y cloruro de metacrililo (0,57 g, 5,5 mmol, 1,2 equiv.) a la mezcla de reacción en hielo en el siguiente orden. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (EtOAc/Hex, 3:2 (v/v), valores de Rf: 7: 0,69, 6: 0,27). El exceso de cloruro de metacrililo se eliminó con metanol para formar metacrilato de metilo. La extracción de la base (NaHCO_3 , pH 8) se realizó dos veces. La mezcla de reacción se secó con MgSO_4 y se filtró a través de papeles de filtro Whatman de diámetro 185 mm. El filtrado se concentró al vacío. El filtrado se purificó en una columna de gel de sílice (EtOAc al 100%). Se obtuvieron 1,15 g (rendimiento del 86%) del compuesto 7 como un aceite de color anaranjado.

25 RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 6,06 (s, 1H), 5,71 (s, 1H), 4,48 (t, 2H), 4,29 (s, 2H), 3,69 (t, 2H), 1,87 (s, 3H), 1,42 (s, 9H).

30 Ácido 2-(2-(metacrililoiloxi)ethylsulfonil)acético (8): se disolvió el compuesto 7 puro (1,2 g, 3,9 mmol) en TFA (15 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió una cantidad traza de MEHQ a la mezcla y la reacción se agitó durante 3 horas a 55°C . La finalización de la reacción se confirmó por TLC (EtOAc/Hex/TFA: 60:40:0,1% (v/v), Rf: 0,38). La mezcla de reacción se purificó en una columna de gel de sílice (EtOAc/Hex, 3/2). Se obtuvieron 0,6 g (rendimiento del 65%) del compuesto 8 como un aceite amarillo.

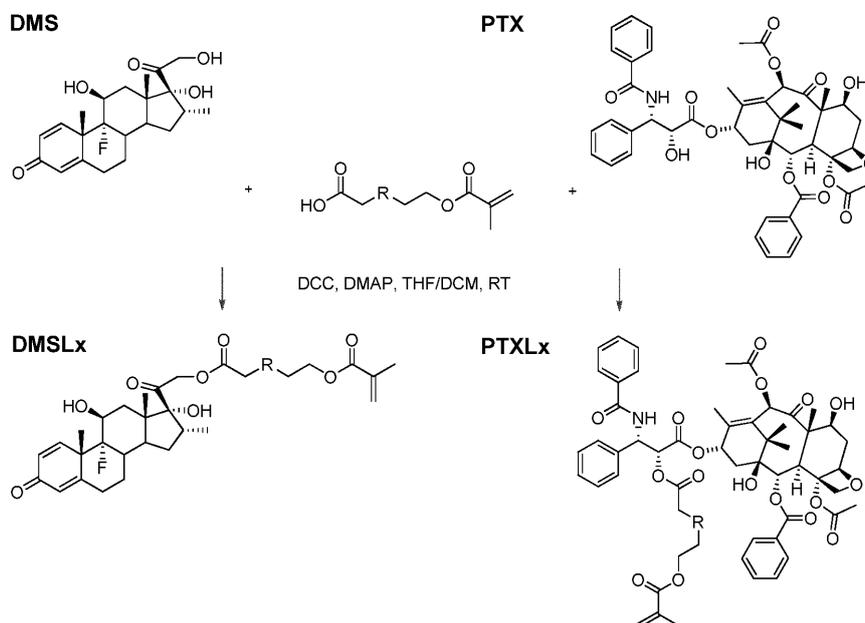
35 RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 6,05 (s, 1H), 5,71 (s, 1H), 4,48 (t, 2H), 4,29 (s, 2H), 3,67 (t, 2H), 1,86 (s, 3H).

Ejemplo 2 - Síntesis del enlazador metacrilato de 2-(clorocarbonilo)etilo (cloroformiato de HEMA).

40 Se añadió gota a gota una solución de metacrilato de hidroxietilo (HEMA, 1,3 g, 10 mmol) y trietilamina (1,1 g, 11 mmol) en 10 mL de cloroformo a una solución agitada de fosgeno (solución al 20% en tolueno, 15,6 mL, 30 mmol) en 15 mL de cloroformo a 0°C . La mezcla se agitó durante 1 hora a 0°C y posteriormente se sometió a una presión de 50 mbar para eliminar el exceso de fosgeno. Después de 30 minutos, la mezcla se concentró adicionalmente a presión reducida usando un evaporador rotatorio. El producto se disolvió en 25 mL de THF y se filtró para eliminar el $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ sólido. El THF se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por destilación de Kugelrohr (90°C , 0,6 mm de Hg) proporcionando el cloroformiato de HEMA como un aceite incoloro (1,3 g, 67%).

Ejemplo 3 - Síntesis de profármacos

La dexametasona y el paclitaxel se utilizaron como compuestos farmacológicos modelo. Estas moléculas de fármacos hidrófobas se derivatizaron con dichos enlazadores, formando profármacos biodegradables:



5 En este esquema de síntesis, R es azufre mono o dioxidado; es decir, enlazadores L1, L2 o L3.

10 Metacrilato de 2-(2-(2-((8S,9R,10S,11S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroxi-10,13,16-trimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[α]fenantren-17-il)-2-oxoetoxi)-2-oxoetil)etilo (DMSL1): se disolvieron el compuesto 4 (0,25 g, 1,2 mmol, 1,05 equiv.) y 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0,077 g, 0,63 mmol, 0,5 equiv.) en CH_2Cl_2 seco (20 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y luego se añadió a la mezcla N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,29 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.) junto con DMS (0,5 g, 1,3 mmol, 1 equiv.) disuelto en THF seco (20 mL). Se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente y, después de agitar durante la noche, se confirmó por TLC la finalización de la reacción (EtOAc/Hex, 3:2 (v/v), Rf: 0,76). La mayor parte del disolvente se evaporó y la mezcla restante se purificó en una columna de gel de sílice de 15 cm (EtOAc/Hex, 3:2 (v/v), Rf: 0,44). Se obtuvieron 0,5 g (70% de rendimiento) de DMSL1 como un sólido blanco esponjoso.

15 RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 7,26 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,02 (s, 1H), 5,98 (s, 1H^{*}), 5,68 (s, 1H^{*}), 5,39 (s, 1H), 5,19 (s, 1H), 5,18 (d, 1H), 4,82 (d, 1H), 4,27 (t, 2H^{*}), 3,51 (s, 2H^{*}), 2,91 (t, 2H^{*}), 1,87 (s, 3H^{*}), 1,46 (s, 3H), 0,86 (s, 3H), 0,78 (d, 3H); RMN ^{13}C (DMSO): δ (ppm) 20,54 (CH₃), 21,66 (CH₃), 23,42 (CH₃^{*}), 28,44 (CH₃), 32,73 (CH₂), 35,61 (CH₂^{*}), 35,7 (CH₂), 37,35 (CH₂), 38,02 (CH₂^{*}), 39,19 (CH), 40,87 (CH₂), 41,09 (CH), 48,73 (CH), 53,42 (CH₂), 68,55 (CH₂^{*}), 74,11 (CH), 75,68 (C), 76,16 (C), 95,93 (CH₂), 105,54 (CH), 107,85 (C), 129,52 (C), 131,43 (CH₂^{*}), 134,41 (CH), 141,14 (C^{*}), 158,15 (CH), 171,77 (C^{*}), 172,46 (CH), 174,93 (C^{*}), 190,68 (C); ESI-MS: [M + H]⁺, calculado = 579,69 d, encontrado = 578,85 d, [2M + H]⁺, calculado = 1158,38 d, encontrado = 1157,25 d.

25 Metacrilato de 2-(2-(2-((8S,9R,10S,11S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroxi-10,13,16-trimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahidro-ciclopenta[α]fenantren-17-il)-2-oxoetoxi)-2-oxoetilsulfinil)etilo (DMSL2): se disolvió el compuesto 5 (0,54 g, 2,4 mmol, 1,05 eq.) en THF seco (5 mL) y se añadió DMAP (0,14 g, 1,2 mmol, 0,5 eq.) a la solución bajo atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar en hielo, se añadió a la mezcla una solución de dexametasona (0,91 g, 2,3 mmol, 1 equiv.) en THF seco (25 mL) y DCC (0,525 g, 2,5 mmol, 1,1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche a TA. La finalización de la reacción se confirmó por TLC (EtOAc/Hex, 20: 1 (v/v), Rf: 0,24). La mayor parte del disolvente se evaporó y la solución restante se purificó en una columna de gel de sílice de 20 cm (EtOAc/Hex, 20: 1 (v/v)). Se obtuvo 1 g (73% de rendimiento) de DMSL2 como un sólido esponjoso amarillo.

35 RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 7,29 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,99 (s, 1H^{*}), 5,71 (s, 1H^{*}), 5,40 (d, 1H), 5,19 (s, OH), 5,18 (d, 1H), 4,88 (d, 1H), 4,5 (t, 2H^{*}), 4,18 (s, 1H), 4,15 (d, 1H^{*}), 4,00 (d, 1H^{*}), 2,86 (s, 1H), 1,88 (s, 3H^{*}), 1,47 (s, 3H), 0,87 (s, 3H), 0,78 (d, 3H); RMN ^{13}C (DMSO): δ (ppm) 20,51 (CH₃), 21,62 (CH₃), 23,32 (CH₃^{*}), 28,34 (CH₃), 32,69 (CH₂), 35,68 (CH₂^{*}), 35,84 (CH₂), 37,32 (CH₂), 39,80 (CH), 41,07 (CH), 48,72 (CH), 53,66 (CH₂), 55,53 (CH₂^{*}), 61,67 (CH₂^{*}), 62,72 (CH₂^{*}), 74,11 (CH), 75,66 (C), 76,14 (C), 95,92 (CH₂), 105,54 (CH), 107,85 (C), 129,53 (C), 131,78 (CH^{*}), 134,42 (CH), 140,94 (C^{*}), 158,17 (CH), 170,98 (C^{*}), 17,60 (CH^{*}), 172,48 (C), 190,71 (C); ESI-MS: [M + H]⁺, calculado = 595,69 d, encontrado = 595,10 d, [2M + H]⁺, calculado = 1190,38 d, encontrado = 1189,65 d.

Metacrilato de 2-(2-(2-((8S,9R,10S,11S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroxi-10,13,16-trimetil-3-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13,

14,15,16,17-dodecahidro-3H-ciclopenta[α]fenantren-17-il)-2-oxoetoxi)-2-oxoetilsulfonil)etilo (DMSL3): se disolvió el compuesto 8 (67 mg, 0,28 mmol, 1,05 equiv.) en DCM seco (10 mL) y se añadió DMAP (0,017 g, 0,14 mmol, 0,5 equiv.) a la mezcla de reacción bajo atmósfera de nitrógeno. La dexametasona se disolvió (0,11 g, 0,27 mmol, 1 equiv.) en THF seco (10 mL). Después de enfriar la mezcla sobre hielo, se añadió DCC (0,21 g, 0,46 mmol, 1,1 equiv.) a la mezcla junto con dexametasona. La reacción se agitó durante la noche a TA y la finalización se confirmó por TLC (EtOAc/Hex, 7:3 (v/v), Rf: 0,47). La mayor parte del disolvente se evaporó y la solución restante se purificó en una columna de gel de sílice de 20 cm (EtOAc/Hex, 7:3 (v/v)). Se obtuvieron 0,1 g (60% de rendimiento) de DMSL3 como un sólido blanco.

RMN ^1H (DMSO): δ (ppm) 7,29 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,99 (s, 1H*), 5,71 (s, 1H*), 5,40 (d, 1H), 5,19 (s, OH), 5,18 (d, 1H), 4,88 (d, 1H), 4,59 (s, 2H*), 4,51 (t, 2H*), 3,78 (t, 2H*), 1,87 (s, 3H*), 1,47 (s, 3H), 0,87 (s, 3H), 0,77 (d, 3H); RMN ^{13}C (DMSO): δ (ppm) (CH₃), (CH₃), 15,79 (CH₃), 16,93 (CH₃), 18,55 (CH₂), 23,63 (CH₂), 25,16 (CH₂), 27,98 (CH₂) 30,96 (CH), 32,59 (CH), 34,04 (CH), 36,36 (CH₂), 44,00 (CH₂), 48,75 (CH₂), 52,77 (CH₂), 58,24 (CH), 70,09 (C), 71,40 (C), 91,18 (CH₂), (CH), 124,80 (C), 127,25 (C), 129,69 (CH), 136,05 (CH), 153,42 (C), 163,23 (CH), 166,74 (C), 167,73 (CH), 185,96 (C), 204,66 (C); ESI-MS: [M + H]⁺, calculado = 611,69 d, encontrado = 611,05 d [2M + H]⁺, calculado = 1222,38 d, encontrado = 1221,20 d.

Los compuestos correspondientes basados en PTX se prepararon por analogía.

Cuando se deseó, se obtuvieron los compuestos radiactivos ^3H -dexametasona (1 mCi/mL en etanol) y ^{14}C -paclitaxel (^{14}C -PTX) de Perkin Elmer (Boston, Estados Unidos) y Campro Scientific BV (Veenendaal, Holanda), respectivamente. En los otros casos, la dexametasona se obtuvo de Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Bajos), y el paclitaxel se obtuvo de MP Biomedicals Inc. (Illkirch, Francia).

Ejemplo 4 - Síntesis de polímeros

Los copolímeros de bloque usados se prepararon como se describe por Rijcken et al, en Biomacromolecules, 2005. 6 (4): páginas 2343-2351 y en Biomaterials, 2007. 28 (36): páginas 5581-5593. Los polímeros contienen un bloque hidrofílico de monometoxi-PEG (M_n de 5000 g/mol) y un bloque termosensible compuesto por monolactato (36%) y dilactato (64%) de N-2-hidroxipropil metacrilamida (HPMAm) o el monolactato (20%) y dilatado (80%) de N-2-hidroxietil metacrilamida (HEMAm). Posteriormente, una fracción (10-15%) de las cadenas laterales de lactato se metacrilaron tras la reacción con anhídrido metacrílico como se describió previamente en la referencia de Biomaterials. El peso molecular de los copolímeros de bloque y la temperatura crítica de la micela fue en todos los casos ~ 25 kDa y 8-12 °C, respectivamente. Se obtuvieron copolímeros de bloque metacrilados marcados con ^3H y ^{14}C usando anhídrido acético ^3H o ^{14}C como se describió previamente en la referencia de Biomaterials.

Ejemplo 5 - Preparación de micelas cargadas de fármacos

En términos generales, y en experimentos típicos, los copolímeros de bloque se basaron en PEG-b-poli(N-hidroxialquil metacrilamida-oligolactatos) con unidades de oligolactato parcialmente metacriladas (polímero termosensible). Más específicamente, se usaron 2 tipos de cadenas principales de polímeros: 2-hidroxipropil-metacrilamida (HPMAm) y 2-hidroxietilmetacrilamida (HEMAm). Se mezcló una solución acuosa de un copolímero de bloque termosensible (típicamente una relación en volumen de 10:1) con una pequeña cantidad de una solución concentrada de uno de los profármacos mencionados anteriormente en un disolvente orgánico miscible con agua (preferiblemente con una temperatura de ebullición baja, por ejemplo, etanol o tetrahidrofurano) a una temperatura que no permite la formación de micelas. Luego, se añadió una solución de iniciador (KPS-TEMED, capaz de producir radicales libres; también se pueden usar otros iniciadores de radicales libres), seguido inmediatamente por calentamiento rápido hasta por encima de la temperatura crítica de formación de micelas (CMT). Esto dio como resultado la formación de micelas poliméricas monodispersas en las que el profármaco se localizó de forma no covalente en el núcleo hidrófobo a través de interacciones hidrófobas. Después de la formación de las micelas, se creó una atmósfera de nitrógeno. De este modo, los radicales iniciadores indujeron la polimerización de los polímeros metacrilados y los compuestos profármacos polimerizables. Este, llamado proceso de entrecruzamiento, dio como resultado la formación de una red entrelazada y fijó el profármaco covalentemente dentro del núcleo micelar entrecruzado (CCL PM).

Se prepararon micelas cargadas con DMS y DMS-profármaco usando el polímero basado en HPMAm o HEMA (ambos con un 14% de metacrilación). Se mezcló una solución de polímero tamponado con acetato de amonio enfriado en hielo (pH 5) (8,3 volúmenes, disuelto durante la noche a 4 °C) con KPS (0,45 volúmenes) y TEMED (0,25 volúmenes). Se añadió DMS (profármacos) en etanol (1 volumen), seguido de calentamiento rápido a 50 °C durante 1 minuto mientras se agitaba vigorosamente. Las concentraciones finales de polímero, KPS, TEMED y fármaco fueron 20, 1,35, 3 y 2 mg/mL, respectivamente. Los polímeros que constituyen cada micela fueron posteriormente entrecruzados bajo una atmósfera de N₂ durante 1 hora a temperatura ambiente como lo describen Rijcken et al. en el artículo citado anteriormente en Biomaterials. Las concentraciones de KPS y TEMED se optimizaron para garantizar la conversión completa de metacrilato (como lo describen Stenekes y Hennink en Polymer, 2000, 41 (15), 5563-5569) sin afectar la morfología micelar por polimerización prematura. De manera similar, se prepararon micelas cargadas con los profármacos PTX y PTX.

Los liposomas cargados con DMS-P se prepararon como se describió previamente (Banciu et al. J. Contr. Release, 2008, 127 (2), 131-136; Schiffelers et al., Neoplasia, 2005, 7 (2), 118-127). En resumen, se disolvieron cantidades apropiadas de dipalmitoilfosfatidilcolina (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania), colesterol (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) y

5 polietilenglicol 2000-diestearoilfosfatidiletanolamina (Lipoid GmbH) en una proporción molar de 1,85:1,0:0,15, respectivamente, en etanol en un matraz de fondo redondo. Se creó una película lipídica por evaporación rotatoria. La película se hidrató con una solución de 100 mg/mL de DMS-P. El tamaño de los liposomas se redujo mediante múltiples etapas de extrusión a través de membranas de policarbonato (Nuclepore, Pleasanton, Estados Unidos) con un tamaño de poro final de 50 nm. El tamaño medio de partícula de los liposomas se determinó por dispersión dinámica de la luz. El DMS-P sin encapsular se eliminó mediante diálisis en un casete Slide-A-Lyzer con un límite de peso molecular de 10 kDa a 4 °C con cambios repetidos de tampón. La fase acuosa después de la extracción se usó para determinar el contenido de fosfato de glucocorticoides mediante cromatografía líquida de alta resolución como se describió anteriormente [8] y contenía aproximadamente 5 mg/mL de DMS-P.

10 Ejemplo 6 - Estudios de liberación *in vitro*

Las micelas poliméricas (PM) entrecruzadas con el núcleo de HPMAm cargadas con profármacos DMS (CCL) (concentración final de DMS 2 mg/mL) se diluyeron al menos diez veces en tampón de fosfato que contenía 1% de Tween (pH 7,4, 150 mM) o tampón de borato que contenía 1% de Tween (pH 8,4, 150 mM y pH 9,4 150 mM), y se incubó a 37 °C. La liberación de DMS se controló mediante análisis inmediato mediante detección de UPLC en un sistema Waters Acquity y consistió en una columna BEH C18 (1,7 µm de diámetro, 50 mm de longitud) a una temperatura de columna de 50 °C. El eluyente fue acetonitrilo/H₂O (23:77, v/v) con un caudal de 1 mL/min. El volumen de la muestra fue de 7,5 µL. La detección UV se produjo a 246 nm. La curva de calibración de dexametasona fue lineal entre 0,2 y 60 µg/mL.

Las curvas de liberación de DMS de diferentes profármacos CCL PM demostraron claramente la gran diferencia en la velocidad de liberación de DMS dependiendo del tipo de enlazador utilizado (véase la Figura 1).

20 La liberación de DMS seguida de UPLC a tiempo mostró una velocidad de liberación dependiente del enlazador claro, es decir, DMSL1 mostró una liberación muy lenta, mientras que el aumento del grado de oxidación del átomo de azufre en el enlazador aumentó la velocidad de liberación. La velocidad de hidrólisis de un éster específico era a su vez dependiente del pH, ya que a pH 8,4 la hidrólisis se aceleró en comparación con la velocidad de hidrólisis a pH 7,4. No se observó liberación de DMS de las diferentes formulaciones de DMS a pH 5 (datos no mostrados). Además, la ausencia de una liberación en ráfaga indica que el atrapamiento covalente de los profármacos de dexametasona fue completo en todos los casos. La misma tendencia se observa consistentemente a diferentes pH (es decir, 7,4 y 8,4) y para los diferentes tipos de micelas (basadas en HPMAm y HEMAm).

Por lo tanto, se muestra que el estado de oxidación del átomo de azufre en la posición beta del enlace éster puede variarse fácilmente, produciendo así diferentes enlazadores con diversos grados de estabilidad hidrolítica. La liberación del 50% de DMS puede variar, por ejemplo, entre ~ 1 semana (DMSL3) y ~ 4 semanas (DMSL1) en condiciones fisiológicas. Además, se evaluó la cinética de liberación de HEMAm CCL PM cargado con el profármaco PTX.

(Figura 2; muestra la cinética de liberación de PTX de HEMAm CCL PM cargado con el profármaco PTX en un tampón de pH 7,4 a 37 °C).

35 La liberación de PTX de HEMAm CCL PM también dependía del tipo de sustituyente utilizado en la posición beta del enlace éster. Sin embargo, la liberación total de PTX fue mucho más rápida que la cinética de liberación de DMS. Claramente, los átomos del fármaco que están (cerca del) enlazador conjugado también afectaron significativamente la sensibilidad del enlace éster hacia la hidrólisis.

Además, como es evidente en la Figura 3 que muestra la cinética de liberación de PTX de HEMAm y HPMAm CCL PM cargados con el profármaco PTXL2 en tampón de pH 7,4 a 37 °C (cada curva es el promedio de 4 mediciones independientes), la velocidad de hidrólisis del enlazador también está ligeramente influenciada por la hidrofiliidad (contenido de agua) del polímero, es decir, por el tipo de polímero utilizado (basado en HPMAm o HEMAm). HEMAm es ligeramente más hidrófilo y, como resultado, tanto el enlazador como las cadenas laterales de ácido láctico en poli (HEMAm-lactato) se hidrolizan más rápidamente (véase también el documento WO/2005/087825). Además, la velocidad de hidrólisis de las cadenas laterales de ácido láctico influye en la velocidad de aumento de hidrofiliidad (y absorción de agua) del núcleo micelar.

En general, estos estudios de liberación *in vitro* demuestran claramente la gran diferencia en la cinética de liberación del fármaco original dependiendo del tipo de enlazador utilizado y de ser secundario al tipo de micelas poliméricas y al tipo de fármaco evaluado.

Ejemplo 7 - Estudio de eficacia terapéutica de micelas poliméricas cargadas con DMSLx después de administración iv

50 Modelo tumoral:

Los ratones con tumores subcutáneos de melanoma B16F10 (véase arriba) recibieron una inyección iv en la cola en caso de que el tumor tuviera entre 100 y 200 mm³. La dosis y las formulaciones fueron 10 mg/kg de DMSL2 atrapadas covalentemente en micelas de HPMAm entrecruzadas con el núcleo, 10 mg/kg de DMS-P libre o solución salina (n = 5 - 6 para cada grupo). Las micelas cargadas con DMSL2 se prepararon en tampón de pH 5 como se describió anteriormente. Justo antes de la administración, la solución micelar se llevó a pH 7,4 y una fuerza iónica de 300 mOsmolar con NaOH y NaCl, respectivamente. El tamaño del tumor se midió todos los días con un calibrador y el peso corporal también se evaluó

todos los días. Las inyecciones se repitieron cada 3 días hasta el punto final humano de 2000 mm³. En el grupo de control, los ratones alcanzaron este punto final ya en el día 6 después del inicio del tratamiento. En el caso de las micelas cargadas con DMSL2, el tratamiento continuó hasta incluso 20 días, es decir, al menos 6 inyecciones.

5 En particular, para el estudio de eficacia terapéutica, una de las formulaciones que mostró un buen perfil de liberación *in vitro*, es decir, DMSL2 coentrecruzado en las micelas HPMAM se comparó con DMS libre y PBS (Figura 4; muestra las velocidades de crecimiento relativo del tumor (izquierda) y la supervivencia animal (derecha) de DMSL2 coentrecruzado en micelas HPMAM, tras múltiples administraciones iv (en intervalos de 3 días) en ratones con tumor B16F10).

10 De acuerdo con el análisis de Kaplan Meier (Figura 4, derecha), las micelas DMSL2 tuvieron un efecto terapéutico significativo ($p = 0,041$) en comparación con PBS. También hay una tendencia hacia una mayor eficacia en comparación con el DMS-P libre, pero esto no es tan significativo (Figura 4, izquierda). A pesar de la frecuente administración de la formulación micelar (hasta 6 veces), no se observaron indicaciones de toxicidad local o de los sistemas. Además, no se observó pérdida de peso corporal en las mediciones diarias.

Modelo RA:

15 Para ratones con artritis inducida por anticuerpos de colágeno en la articulación de la rodilla, se administró una sola inyección iv de 10 mg de DMS/kg, ya sea como fármaco libre o como DMSL3 (CD102) como placebo; la solución salina se inyectó iv y se tomó como control la articulación sana, no afectada. Los resultados indican claramente que después de la inyección intravenosa, solo el DMSL3 PM produjo como resultado una supresión significativa (casi completa) de los síntomas de artritis (aquí hinchazón de las articulaciones). Esto indica el comportamiento farmacocinético superior (velocidad de liberación durante un período prolongado y una mayor acumulación en el tejido inflamado) en comparación con la dexametasona libre. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

20 Ejemplo 8: PK y estudio de eficacia terapéutica de micelas poliméricas cargadas con PTXLx después de administración iv

25 En estudios farmacocinéticos *in vivo*, se determinaron los niveles en sangre de paclitaxel después de la administración intravenosa de formulaciones de PTXL2 PM (~ 10 mg/kg de paclitaxel) en un estudio de eficacia terapéutica contra ratones con tumor B16F10 subcutáneo con taxol y PBS como control. En este sentido, véase la siguiente tabla:

formulación	t = 24 u	t = 48 u
Taxol	por debajo de LOQ	por debajo de LOQ
PTXL2 HEMAm	4.027 ng/mL libre de PTX	100 ng/mL libre de PTX
PTXL2 HPMAM	3.965 ng/mL libre de PTX	125 ng/mL libre de PTX

30 Particularmente, esta Tabla muestra los niveles de paclitaxel en sangre después de la administración intravenosa de formulaciones de taxol o profármaco CCL PM con PTXL2 a ratones con tumor B16F10 subcutáneo (de acuerdo con lo determinado por LC-MS, límite de cuantificación (LOQ) < 10,3 ng/mL, siendo n 3-5). Estos datos farmacocinéticos de paclitaxel libre indicaron la larga residencia en sangre de los CCL PM cargados con profármacos PTX y la liberación controlada de PTX.

Ratones sanos - inyección iv

35 Las micelas PTXL1, PTXL2 y PTXL3 se administraron por vía iv a una dosis de 12,5 mg/kg a ratones, como PTX (3 animales/tiempo de muestreo). Como controles, también se administraron taxol y Abraxano como control por ser las formulaciones comerciales actuales de paclitaxel. Se recogieron muestras de sangre y varios órganos (hígado, bazo) en diferentes puntos de tiempo después de la inyección.

En la Figura 6a y b todas las curvas corresponden al paclitaxel liberado.

40 Al conservar también la micela atrapada en paclitaxel, en el caso de PTXL3 se observó el patrón sanguíneo como se muestra en la Fig. 6c.

El paclitaxel atrapado y liberado indica claramente el perfil de circulación prolongado de las micelas PTXLx, que a su vez también indica que el paclitaxel está protegido de la degradación mientras se encuentra en las micelas.

Nombre	PTX libre promedio con respecto PTX total	AUC total	AUC libre
--------	---	-----------	-----------

PTXL1	4%	2.275	96
PTXL2	15%	1.367	227
PTXL3	24%	2.328	683
Taxol	n.a.	n.a.	28
Abraxano	n.a.	n.a.	5

5 La tabla anterior muestra una indicación clara de la circulación prolongada en sangre en comparación con las formulaciones comerciales actuales. A continuación, se observa la velocidad de liberación ajustable, con una cantidad mínima de paclitaxel en el caso del PTXL1 de liberación lenta y la mayor cantidad de paclitaxel liberado en el caso del PTXL3 de liberación más rápida (hasta ahora).

Ratones sanos - inyección ip y sc

Del mismo modo, las micelas PTXL1 también se administran por vía subcutánea e intraperitonealmente, lo que resulta en niveles en sangre, en los que el paclitaxel también se controla a tiempo. Esto indica que el mecanismo de liberación es realmente genérico, incluso tras otras vías de administración diferentes.

10 Ratitas sanas - inyección iv

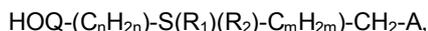
El patrón que se muestra en la Fig. 7 se observó tras la inyección iv de micelas PTXL2.

Los resultados y conclusiones más importantes son: perfil de circulación prolongada en sangre; y que el % de paclitaxel liberado en sangre es igual al % liberado en ratones: es decir, se observan mecanismos de liberación iguales.

15 Lo más importante con respecto al uso de estos enlazadores en varias realizaciones, este nuevo tipo de moléculas enlazadoras parecía ser completamente seguro en diversos estudios de toxicidad preclínica, tras la administración única o repetida a ratones y ratas. A continuación, incluso al aumentar las dosis, no se observaron efectos locales o sistémicos, lo que indica que este tipo de enlazadores ni sus fragmentos biodegradables causan efectos secundarios notables.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un enlazador, que tiene la fórmula:



- en la que n es un número entero de 1 a 3 y m es un número entero de 1 a 5;

5 - en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre sí de un par de electrones solos, una fracción de oxígeno, tal como = O, una fracción de nitrógeno, tal como =N-R_x, en la que R_x es un grupo de átomos homogéneo o heterogéneo;

10 - en la que A es una fracción de conjugación que es una fracción polimerizable -PL-R_vC=CR_uR_w, en la que PL es un grupo de enlazamiento seleccionado de -O-, -NH-, un -N- sustituido, siendo el sustituyente un alquilo C₁-C₃; -O-C(O)-, y un -O-(C(O))-C_bH_{2b}-, en el que r es 0 o 1, y b es un número entero de 1 a 6, y R_u, R_v y R_w, independientemente, representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃;

como enlazador en un sistema de administración de fármacos, en el que:

- Q es un enlace directo o un grupo C=O y el enlazador está acoplado a través de su grupo -OH o -COOH a una molécula bioactiva, o

15 - Q es C=O y el enlazador está acoplado a través de su grupo COOH a un lípido, colesterol o un polímero del sistema de administración de fármacos.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador de la reivindicación 1 está acoplado a través de su grupo -OH o -COOH a una molécula bioactiva y en el que la molécula bioactiva es una molécula de fármaco, un péptido, una proteína, un agente de formación de imágenes, un constructo genético o una combinación de los mismos.

20 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula bioactiva es un glucocorticosteroide, por ejemplo, dexametasona.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula bioactiva es un agente quimiostático, por ejemplo, paclitaxel.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enlazador es un enlazador biodegradable.

25 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema de administración de fármacos libera una molécula de fármaco, un péptido, una proteína, un agente de formación de imágenes, un constructo genético o una combinación de los mismos.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema de administración de fármacos libera dexametasona o paclitaxel como ingrediente activo.

30 8. Sistema de liberación controlada que comprende una matriz polimérica, capaz de liberar un ingrediente activo, en el que el ingrediente activo está unido covalentemente a las moléculas de polímero de la matriz polimérica a través de un enlazador que tiene la fórmula:



9. Un método para preparar un sistema de liberación controlada de la reivindicación 8, que comprende las etapas de:

35 - proporcionar un compuesto bioactivo que tiene una fracción funcional para permitir la conjugación a un enlazador como se define en la reivindicación 8, preferiblemente en el que la fracción funcional es un alcohol primario o secundario o un grupo COOH,

- iniciar una conjugación entre la fracción del enlazador que contiene -OH y dicha fracción funcional del compuesto bioactivo, formando así un profármaco; y

40 - atrapar allí y conjugarse con la matriz polimérica de dicho profármaco.

10. Enlazador que tiene la fórmula: HOQ-(C_nH_{2n})-S(R₁)(R₂)-(C_mH_{2m})-CH₂-A, en la que Q, n, R₁, R₂, m y A son como se definen en la reivindicación 1, acoplado a través de su grupo -OH o -COOH a un glucocorticosteroide o a un agente quimiostático.

11. Enlazador de acuerdo con la reivindicación 10 acoplado a dexametasona o paclitaxel.

45

Fig. 1

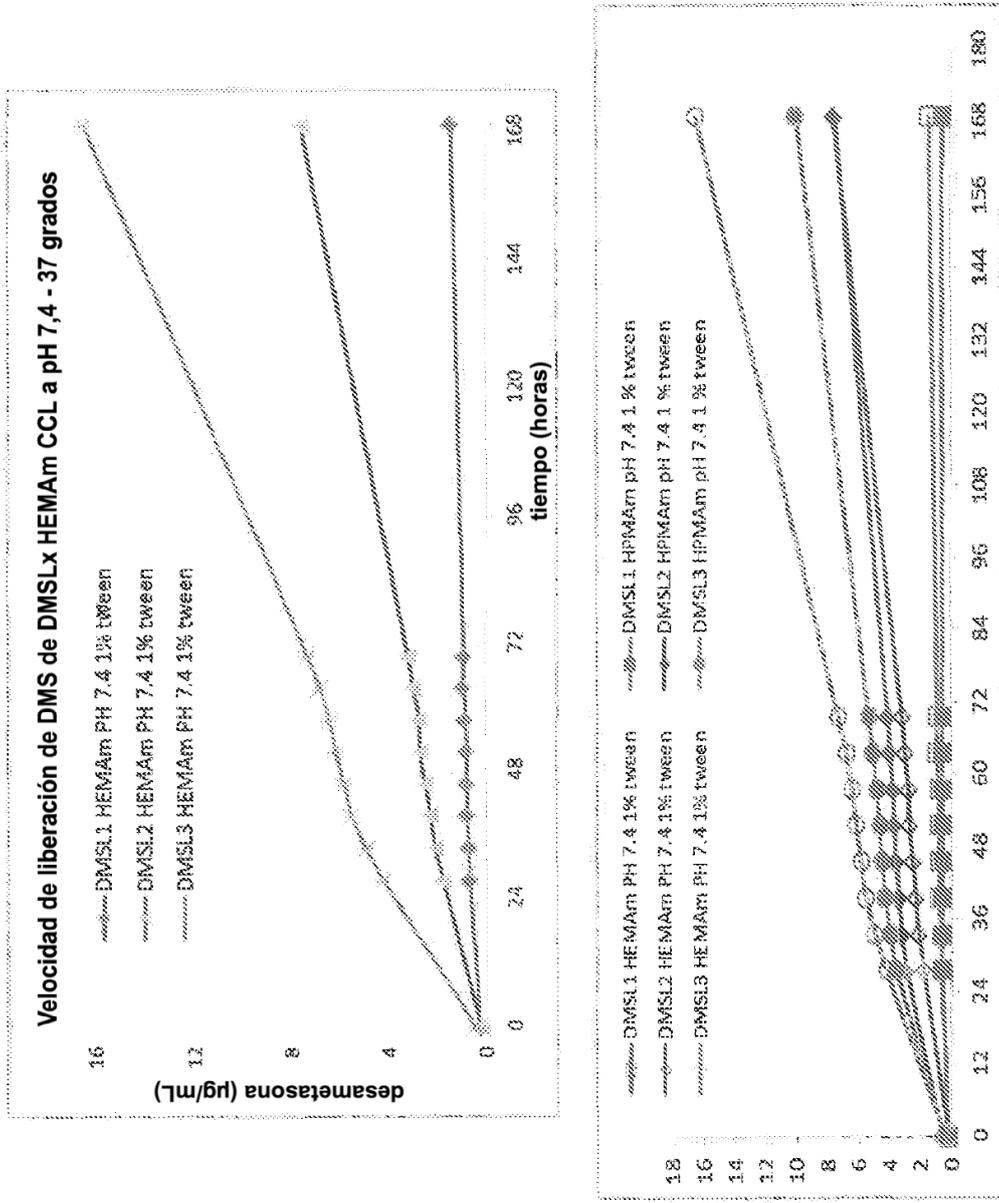


Fig. 2

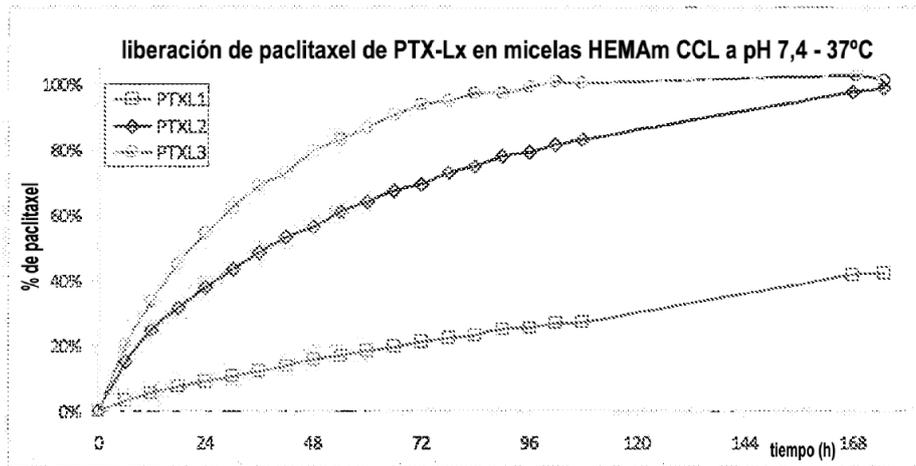


Fig. 3

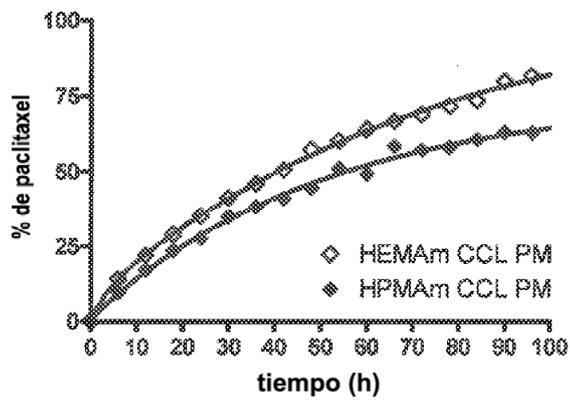


Fig. 4

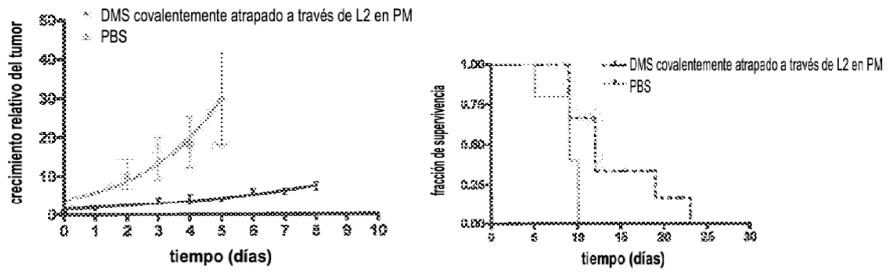


Fig. 5

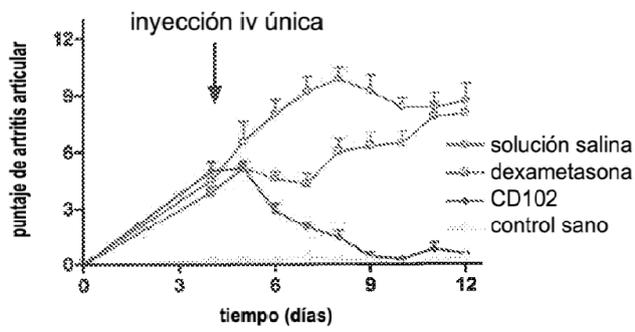


Fig. 6a

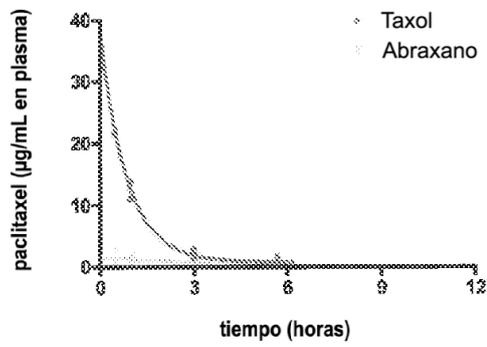


Fig. 6b

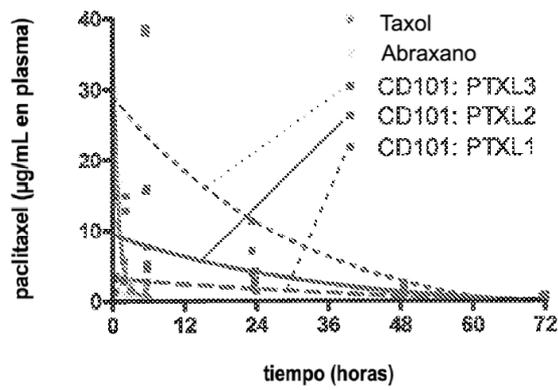


Fig. 6c

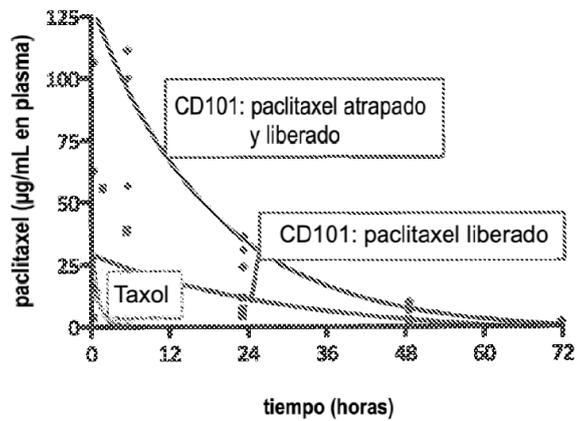


Fig. 7

