SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE LIBERACIÓN SOSTENIDA QUE COMPRENDEN LIGANTES QUE NO DEJAN HUELLAS

CAMPO TÉCNICO

Se describen sistemas de administración de fármacos para administrar agentes biológicamente activos que comprenden aminas primarias o secundarias, un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, reactivos de administración de fármacos relacionados con los mismos, composiciones farmacéuticas que comprenden los sistemas de administración de fármacos y el uso de los sistemas de administración de fármacos como terapéutica de liberación sostenida.

ANTECEDENTES

La modulación de las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco in vivo puede verse afectada por la conjugación del fármaco con un vehículo. En particular, la conjugación de un fármaco con un vehículo se usa con frecuencia como un medio para aumentar la duración terapéutica de la acción, reducir la concentración máxima del fármaco después de la administración o localizar el suministro del fármaco a un tejido o compartimento deseado o una combinación de estos fines. Típicamente, los portadores en los sistemas de administración de fármacos se usan (a) de forma no covalente con el fármaco formulado fisicoquímicamente en una mezcla de disolvente-portador o (b) unidos por unión covalente de un reactivo portador a un grupo funcional presente en el fármaco.

Los enfoques no covalentes requieren una encapsulación del fármaco altamente eficiente para evitar la liberación descontrolada del fármaco que puede producirse al momento de la administración inicial del sistema portador-fármaco o durante la degradación del portador después de la administración a un sujeto. La restricción de la difusión de una molécula de fármaco soluble en agua no unida requiere fuertes contactos de van der Waals, frecuentemente mediados a través de restos hidrófobos, enlaces de hidrógeno o unión electrostática mediada a través de restos cargados. Muchos fármacos sensibles a la conformación, tales como proteínas, péptidos, o anticuerpos, se vuelven

disfuncionales durante el proceso de encapsulación y/o durante el almacenamiento posterior del fármaco encapsulado.

Alternativamente, un fármaco puede conjugarse covalentemente a un portador a través de un ligante estable o mediante un resto ligante reversible del que se libera el medicamento. Si el fármaco está conectado de manera estable al portador, dicho conjugado necesita exhibir suficiente actividad residual para tener un efecto farmacéutico y el conjugado está constantemente en forma activa.

Si el fármaco se conjuga con el portador a través de un ligante escindible, dichos conjugados se denominan típicamente fármacos ligados al portador. Este enfoque se puede aplicar a varias clases y tamaños de moléculas biológicamente activas, desde moléculas orgánicas de bajo peso molecular, productos naturales, anticuerpos y análogos de los mismos, proteínas, péptidos y similares. Una consideración importante para los fármacos ligados al portador es el mecanismo para liberar el medicamento del portador. El mecanismo de liberación puede ser enzimático, dependiente del pH, o mediante hidrólisis autónoma. Por lo general, la liberación del fármaco no es fácilmente controlable y difícil de mantener durante largos períodos de tiempo.

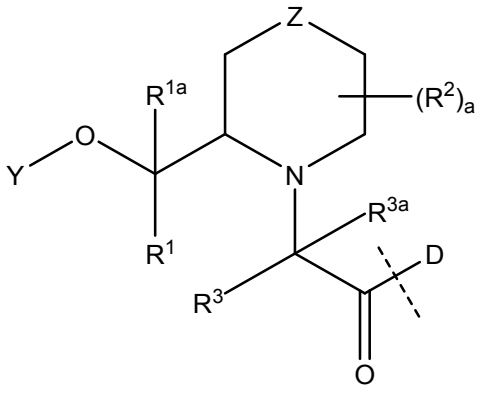
Sigue existiendo la necesidad de contar con nuevos sistemas de administración de fármacos adecuados para la liberación sostenida de restos biológicamente activos en aplicaciones terapéuticas. En la presente se describen sistemas de administración de fármacos que proporcionan una liberación sostenida de restos biológicamente activos para aplicaciones terapéuticamente relevantes.

SUMARIO

Se describen sistemas de administración de fármacos que comprenden moléculas biológicamente activas, portadores y ligantes que no dejan huellas que proporcionan un medio para conectar la molécula biológicamente activa a un portador, composiciones farmacéuticas que comprenden los sistemas de administración de fármacos y el uso de los sistemas de administración de fármacos como agentes terapéuticos de liberación sostenida.

Una forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R,

representado por la Fórmula (I), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{3a} es hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)N\ R^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;
R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;
R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;
b es un entero de entre 1 y 10;
Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;
L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido;
A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};
R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula (I) a un portador; y
R^{11} es un portador.

En un aspecto, D comprende una proteína, péptido, polipéptido, ácido nucleico, oligo o polinucleótido, carbohidrato, oligo o polisacárido, o una molécula pequeña cada una de los cuales comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo y la molécula pequeña tiene un peso molecular de entre 100 g/mol y aproximadamente 2000 g/mol.

En otro aspecto, D comprende una proteína, péptido, ácido nucleico, Fab, scFv, anticuerpo monoclonal, o molécula pequeña. En otro aspecto, D comprende brolucizumab (D1) (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), abciximab, adalimumab, aflibercept, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, daclizumab, daratumumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, golimumab, ibritumomab, infliximab, ipilimumab, lampalizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pegpleranib pembrolizumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, o

vedolizumab, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, D comprende uno o más péptidos biológicamente activos que incluyen, entre otros péptido natriurético tipo C (CNP), péptido natriurético atrial (ANP), exendina-4, insulina, hormona adrenocorticotrópica, adrenomedulina, adropina, ω-agatoxina, proteína relacionada con agouti, angiotensina/s, apelina 12, apelina 13, apelina 36, o derivados de los mismos, transcripción regulada por bradiquinina, calcitonina, cocaína y anfetaminas (CART), factor liberador de corticotropina (CRF), α-defensinas, β-defensinas, péptido delta inductor del sueño (DSIP), inhibidor específico de elastasa (Elafina), endoquininas, endomorfinas, endorfinas, endotelinas, exendina, fragmento activo de fibronectina, galanina, péptido similar a la galanina, gastrina grande, gastrina I, péptido relacionado con gastrina, polipéptido inhibidor gástrico, péptido liberador de gastrina, grelina, des-acil grelina, glucagón, péptido similar al glucagón, factor liberador de hormona del crecimiento, Grammostola spatulata GsMTx-4, guangxitoxina-1E, guanilina, hepcidina 1, hepcidina/LEAP-1, histatina 5, hormona de crecimiento humano, humanina, huwentoxina, iberiotoxina, imperatoxina A, factores de crecimiento similares a la insulina, intermedina, IRL 1620, péptido de unión, kaliotoxina, kisspeptinas, kurtoxina, lipotropina, lipotropina, factor de crecimiento de células hepáticas, péptido antimicrobiano expresado en hígado 2, hormona liberadora de hormona luteinizante, lisenina, LL-37, margatoxina, mastoparán, péptido desgranulador de mastocitos, hormona concentradora de melanina, hormona estimuladora de melanocitos, factor inhibidor de liberación de MSH, midkina, neuropéptido cardioexcitador de moluscos, péptido de tolerancia a la morfina, motilina, toxinas muscarínicas, péptido regulador neuroendocrino-2, neuroquinina A, neuroquinina B, neuromedinas, neuronostatina-13, neuropéptidos, neurotensina, neurotoxina NSTX-3, nocistatina, nociceptina, obestatina, péptidos opioides (encefalinas, endorfinas, BAM-12P, casomorfina, dinorfinas, endomorfinas, neo-endorfinas, nociceptina), orexina-A/-B, ofanim, osteocalcina, oxitocina, pancreastatina, hormona paratiroidea, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, péptido234, péptido histidina-metionina, péptido T, péptido YY, fisalamina, polipéptidos activadores de adenilato ciclasa hipofisaria, factor plaquetario 4, plectasina, pleiotrofina, proadrenomedulina, péptido liberador de prolactina, psalmotoxina 1, purotoxina-1, péptido RFamida piroglutamilado, renina, péptido relacionado con RFamida-1, péptido relacionado con RFamida-3,

salusina-α/β, sarafotoxinas, péptido relacionado con la esquizofrenia, escilatoxina, secretina, serelaxina, factor tímico sérico, inhibidor de la ATPasa de sodio y potasio-1, somatostatina, toxina de stichodactyla, sustancia K, estrescopina, péptido relacionado con la estrescopina, sustancia P, taquiquininas, SNX-482 de tarántula, ProTx-I de tarántula, ProTx-II de tarántula, tertiapina, tityustoxina Ka, hormona liberadora de tirotropina, tuftsina, uroguanilina, isómero A o B de uroguanilina, urocortina, urocortina II, urotensina II, péptido relacionado con la urotensina II, péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, vasotocina, péptido inhibidor de la replicación de virus, xenina, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, D es una molécula pequeña que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 100 g/mol y aproximadamente 2000 g/mol o menos, que se conecta a R a través de una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo.

En otro aspecto, la molécula pequeña comprende ácido 5-(5,6,7,8-tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, R^1 es hidrógeno o metilo, R^{1a} es hidrógeno o metilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un grupo ciclopropan-1,1-diilo. En otro aspecto, R^3 y R^{3a} son respectivamente hidrógeno. En otro aspecto, X es O. En otro aspecto, Y es $C(O)R^4$ y R^4 es C_1-C_6 alquilo, C_3-C_6 ciclo alquilo o C_1-C_2 alcoxi C_1-C_2 alquilo. En otro aspecto, R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo. En otro aspecto, Y es $SiR^5R^6R^7$; R^5 y R^6 son respectivamente metilo, etilo, propilo o isopropilo; y R^7 es C_1-C_4 alquilo, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, 2-etoxietoxi, 2-isopropoxi-etoxi, tetrahidropiraniloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, donde b es 2, 3, o 4.

En otro aspecto, Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido $Q-[Sp-Q]_h-Q$;

Q se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un enlace, O, C(O), N(H), $N(C_1\text{-}C_4$ alquilo), C(O)NH, $C(O)N(C_1\text{-}C_4$ alquilo), N(H)C(O), $N(C_1\text{-}C_4$ alquilo)C(O), N(H)C(O)O, $N(C_1\text{-}C_4$ alquilo)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C1-C_4 alquilo), N(H)C(O)N(H), $N(C_1\text{-}C_4$ alquilo)C(O)N(H), N(H)C(O)$N(C_1\text{-}C_4$ alquilo), $N(C_1$-C4 alquilo)C(O)$N(C_1\text{-}C_4$ alquilo), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, $N(C_1\text{-}C_4$ alquilo)$S(O)_2$, $S(O)_2$N(H), $S(O)_2N(C_1\text{-}C_4$ alquilo), $C_1\text{-}C_2$ alquilo-C(O)N(H), N(H)C(O)$C_1\text{-}C_2$ alquilo, $C_1\text{-}C_2$ alquilo-C(O)O, OC(O)$C_1\text{-}C_2$ alquilo, 1,2,3-triazol, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, $C_1\text{-}C_4$ alquilo-$P(O)_2$-O, o O-$P(O)_2\text{-}C_{1\text{-}4}$ alquilo;

Sp se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un $C_1\text{-}C_{20}$ alquilo, $C_2\text{-}C_{20}$ alquenilo, $C_2\text{-}C_{20}$ alquinilo, $[W\text{-}O]_g$, $C_1\text{-}C_8$ alquilo-$[O\text{-}W]_g$, $[O\text{-}W]_g$-O-$C_1\text{-}C_8$ alquilo, $C_1\text{-}C_8$C alquilo-$[O\text{-}W]_g$-O-$C_1\text{-}C_8$ alquilo opcionalmente sustituido u oligopéptido;

h es un entero de entre 1 y 20;

g es un número promedio ponderado de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

W es $C_2\text{-}C_4$ alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

A es hidrógeno, $C_1\text{-}C_8$ alquilo, $C(O)C_1\text{-}C_8$ alquilo, $C(O)OC_1\text{-}C_8$ alquilo, $C(O)N(H)C_1\text{-}C_8$ alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula (I) a un portador; y

R^{11} es un portador.

En otro aspecto, Z es NR^9; R^9 es $C(O)\text{-}(CH_2)_n$-Q-A o $-C(O)(CH_2)_q[O\text{-}W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O\text{-}W]_p$-Q-A; n es un entero de 1 a 8; y A es R^{10} o R^{11}. En otro aspecto, R^{10} es azidilo, alquinilo, C7-C12 ciclo alquinilo sustituido o no sustituido, C7-C12 heterociclo alquinilo sustituido o no sustituido, C7-C12 ciclo alquenilo sustituido o no sustituido, norbornilo, vinil carboxilo sustituido o no sustituido, vinil sulfonilo sustituido o no sustituido, C2-C8 alquenilo sustituido o no sustituido, amino, tiol, C1-C8 carboxilo sustituido o no sustituido, C1-C8 carbonilo sustituido o no sustituido, $-O\text{-}NH_2$, hidrazidilo, maleimida, alfa-halo carbonilo, furano, tetrazinilo sustituido o no sustituido, lisina, glutamina, ciclodextrina, o adamantanilo. En otro aspecto, R^{10} comprende un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula (I) a un portador. En otro aspecto, R^{11} es biodegradable. En otro aspecto, R^{11} comprende un polímero o polímero reticulado.

En otro aspecto, R^{11} comprende un hidrogel que comprende uno o más polímeros reticulados. En otro aspecto, R^{11} comprende un polímero, polímero reticulado, o hidrogel que comprende uno o más entre ácido hialurónico, polietilenglicol, polipropilenglicol, óxido de polietileno, óxido de polipropileno, poliglutamato, polilisina, ácido polisálico, alcohol polivinílico, poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilamida, polimetacrilamida, polivinilpirrolidona, polioxazolina, poliiminocarbonato, poliaminoácido, poliéster hidrofílico, poliamida, poliuretano, poliurea, dextrano, agarosa, xilano, manano, carragenano, alginato, gelatina, colágeno, albúmina, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietil almidón, quitosano, ácidos nucleicos, derivados de los mismos, copolímeros de los mismos, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, R^{11} comprende ácido hialurónico, polietilenglicol, un hidrogel reticulado de ácido hialurónico, un hidrogel reticulado de polietilenglicol, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, R^{11} comprende ácido hialurónico o polietilenglicol. En otro aspecto, R^{11} comprende un hidrogel que comprende ácido hialurónico reticulado o polietilenglicol reticulado. En otro aspecto, el ácido hialurónico o polietilenglicol están funcionalizados con al menos un grupo funcional que comprende azidilo, alquinilo, C7-C12 ciclo alquinilo sustituido o no sustituido, C7-C12 heterociclo alquinilo sustituido o no sustituido, C_7-C_{12} ciclo alquenilo, norbornilo, vinil carboxilo, vinil sulfonilo, C_2-C_8 alquenilo, amino, tiol, C_1-C_8 carboxilo, C_1-C_8 carbonilo, -O-NH2, carbohidrazida, maleimida, alfa-halo carbonilo, furano, tetrazinilo sustituido o no sustituido, lisina, glutamina, ciclodextrina, adamantanilo, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, R^{11} comprende un hidrogel que comprende ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende por lo menos una cadena lateral seleccionada entre -NH(W1) $(O(W1))_d$-V, en donde W1 es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto; d es un número promedio de 0 a 500; y V es un grupo funcional adecuado que comprende azidilo, alquinilo, C7-C12 ciclo alquinilo sustituido o no sustituido, C7-C12 heterociclo alquinilo sustituido o no sustituido, C_7-C_{12} ciclo alquenilo, norbornilo, vinil carboxilo, vinil sulfonilo, C_2-C_8 alquenilo, amino, tiol, C_1-C_8 carboxilo, C_1-C_8 carbonilo, -O-NH2, carbohidrazida, maleimida, alfa-halo carbonilo, furano, tetrazinilo sustituido o no sustituido, lisina, glutamina, ciclodextrina, o adamantanilo. En un aspecto, V es azida.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para preparar una formulación portadora reticulada, el proceso comprende: (a) funcionalizar una molécula portadora, R^{11}; (b) preparar un reticulador reactivo; y (c) hacer reaccionar la molécula portadora funcionalizada con el reticulador reactivo para formar un portador reticulado por incubación durante aproximadamente entre 0.5 horas y aproximadamente 48 horas a una temperatura de entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 60 °C. En un aspecto, la molécula portadora R^{11} comprende un polímero o polímero reticulado. En otro aspecto, R^{11} comprende un hidrogel que comprende uno o más polímeros reticulados. En un aspecto, la molécula portadora comprende ácido hialurónico o polietilenglicol. En otro aspecto, la molécula portadora está funcionalizada con restos de azida, sulfhidrilo, amina, aminoxi ($O\text{-}NH_2$) o aldehído para proveer grupos funcionales reactivos para el reticulado. En otro aspecto, la preparación del reticulador reactivo comprende hacer reaccionar un polietilen glicol con ácido 1-((terc-butoxicarbonil)amino)ciclopropano-1-carboxílico, ácido 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoico, ácido 1-(terc-butoxicarbonil)piperidina-4-carboxílico, ácido 2-(1-(((terc-butoxicarbonil)amino)metil)ciclopropil) acético, ácido 2-metil 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoico, o ácido 7-((terc-butoxicarbonil)amino)heptanoico y desproteger el éster de polietilen glicol funcionalizado. En otro aspecto, la preparación del reticulador reactivo además comprende la introducción de al menos dos grupos biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metilo luego de la desprotección del éster de polietilen glicol funcionalizado. En otro aspecto, la preparación del reticulador reactivo comprende además la reacción del éster de polietilenglicol funcionalizado desprotegido con uno o más reactivos adecuados para introducir grupos reactivos terminales, como alquinilo, ciclo alquinilo, heterociclo alquinilo, ácido carboxílico o ácido carboxílico activado, restos de aldehído o cetona, amino o aminoxi para proveer grupos funcionales reactivos para el reticulado a las moléculas portadoras.

Otra forma de realización descripta en la presente es un hidrogel reticulado que puede obtenerse usando los métodos descriptos en la presente. En un aspecto, la molécula portadora está funcionalizada con azida.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para preparar un aducto de fármaco, que comprende un ligante que no deja huellas, R, acoplado a un

agente biológicamente activo, D, el proceso comprende: (a) proveer un agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; (b) hacer reaccionar el agente biológicamente activo con un ligante que no deja huellas, R, que tiene un grupo funcional carbonilo activado; y (c) purificar el aducto de fármaco a partir de los reactivos. En un aspecto, R mantiene la definición anterior de la fórmula (I).

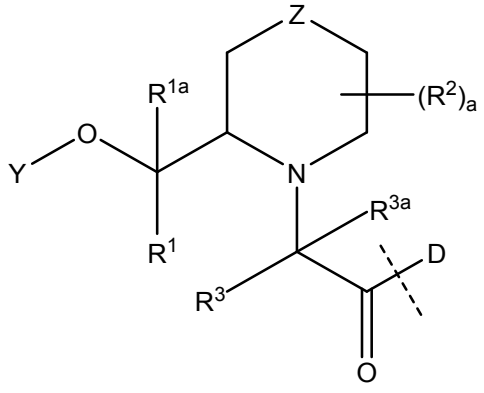
Otra forma de realización descripta en la presente es un aducto de fármaco que puede obtenerse usando los procesos descriptos en la presente.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso de preparación de un sistema de administración de fármacos, el proceso comprende: (a) preparar una molécula portadora, R^{11}, donde R^{11} es un hidrogel reticulado, luego este paso comprende el proceso usado para preparar ese hidrogel; la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa; (b) conjugar por separado el ligante que no deja huellas, R, a un agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, por medio de lo cual se forma el aducto de ligante que no deja huellas; el aducto de ligante que no deja huellas-D puede ser opcionalmente purificado en esta etapa, (c) conjugar la molécula portadora, R^{11}, con el aducto de ligante que no deja huellas-D; y (d) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos que puede obtenerse usando los métodos descriptos en la presente.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar un trastorno ocular, como la degeneración macular (es decir, degeneración macular húmeda relacionada con la edad), que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende un conjugado D–R, representado por la Fórmula (I), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, que comprende brolucizumab (SEQ ID NO:4), aflibercept, pegpleranib, ranibizumab, ácido 5-(5,6,7,8-tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-

carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos; R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

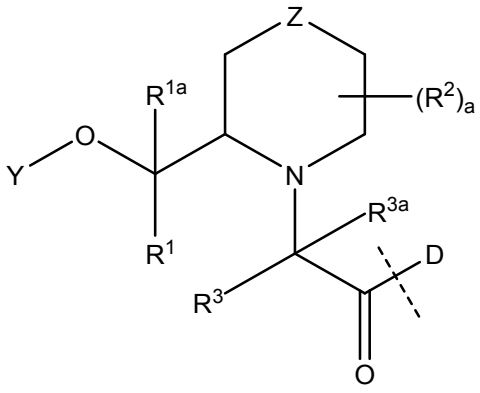
A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula (I) a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar trastornos musculoesqueléticos que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende un conjugado D–R, representado por la Fórmula (I), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o

secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo que comprende D2 (SEQ ID NO:4), D3 (SEQ ID NO:5), otros factores de crecimiento tipo insulina, o una combinación de los mismos ; R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

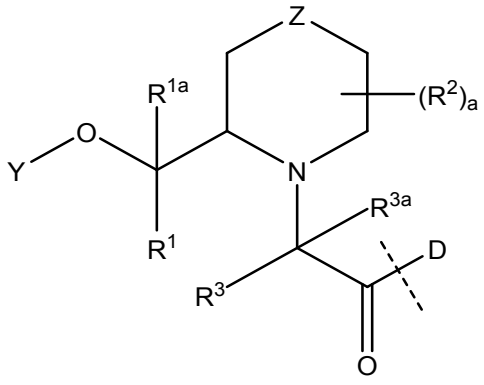
A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula (I) a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar trastornos cardíacos que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende un conjugado D–R, representado por la Fórmula (I), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o

un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo que comprende serelaxina o la SEQ ID NO:7; R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

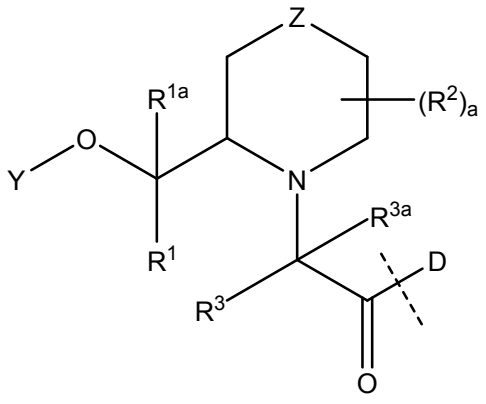
Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende un conjugado D–R, representado por la Fórmula (I), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

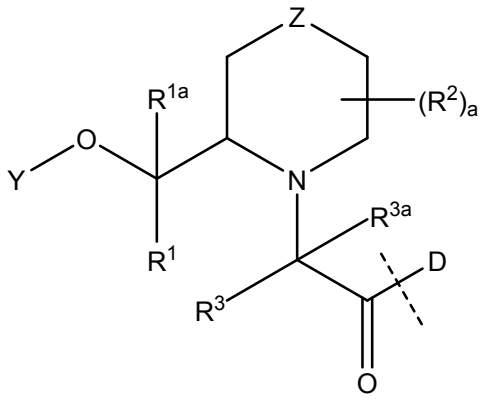
Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un medio para prolongar la vida media de un resto biológicamente activo, D, que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, el medio comprende fijar D a R, representado por la Fórmula (I), donde R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

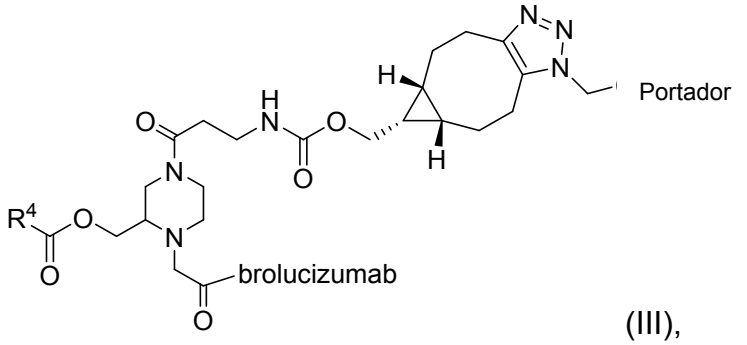
Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

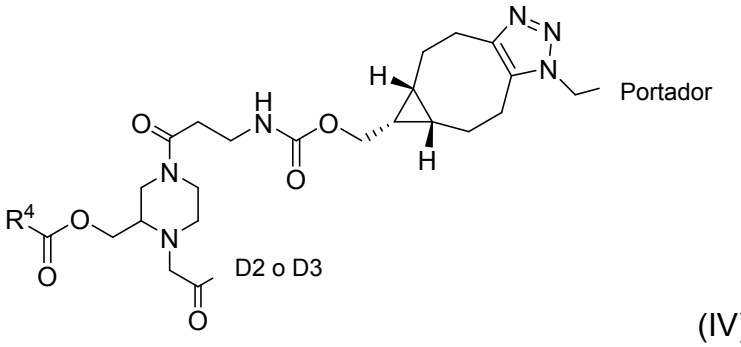
Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos que comprende la Fórmula (III):



(III),

en donde brolucizumab comprende D1, SEQ ID NO:4; R^4 es CH_3-, CH_3-O-CH_2-, CH_3CH_2-, o $(CH_3)_2CH$-; y el portador comprende ácido hialurónico, polietilenglicol, un hidrogel del mismo, un hidrogel reticulado del mismo, o combinaciones de los mismos.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos que comprende la Fórmula (IV):



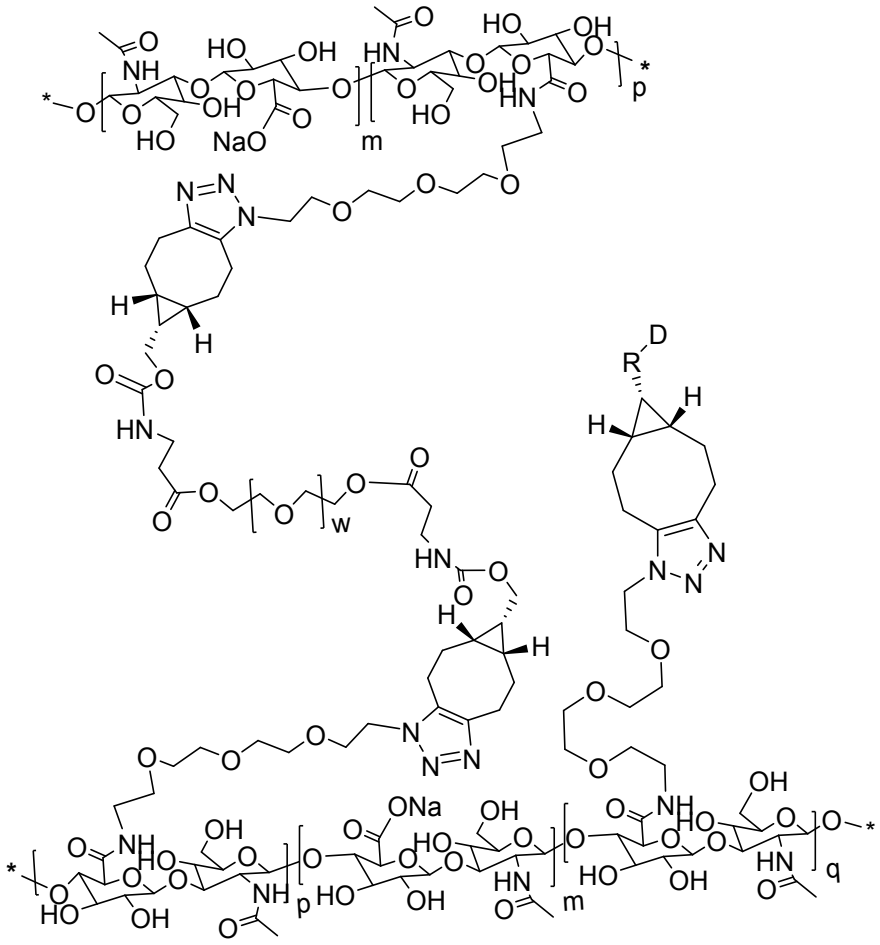
(IV),

en donde D2 comprende la SEQ ID NO:5, D3 comprende la SEQ ID NO:6; R^4 es CH_3-, CH_3-O-CH_2-, CH_3CH_2-, o $(CH_3)_2CH$-; y el portador comprende ácido hialurónico, polietilenglicol, un hidrogel del mismo, un hidrogel reticulado del mismo, o combinaciones de los mismos.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos que comprende D-R–R^{11}, en donde R comprende un ligante que no deja huellas, acoplado a un agente biológicamente activo, D; D comprende un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^{11} comprende una pluralidad de monómeros de ácido hialurónico, cada uno de los cuales comprende una serie aleatoria de monómeros de ácido hialurónico no funcionalizados, monómeros de ácido hialurónico funcionalizados con uno o más monómeros de ácido hialurónico reticulados y uno o más aductos de fármacos, D–R. En un aspecto, D comprende brolucizumab (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), serelaxin, aflibercept, pegpleranib, ranibizumab, ácido 5-(5,6,7,8-tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-

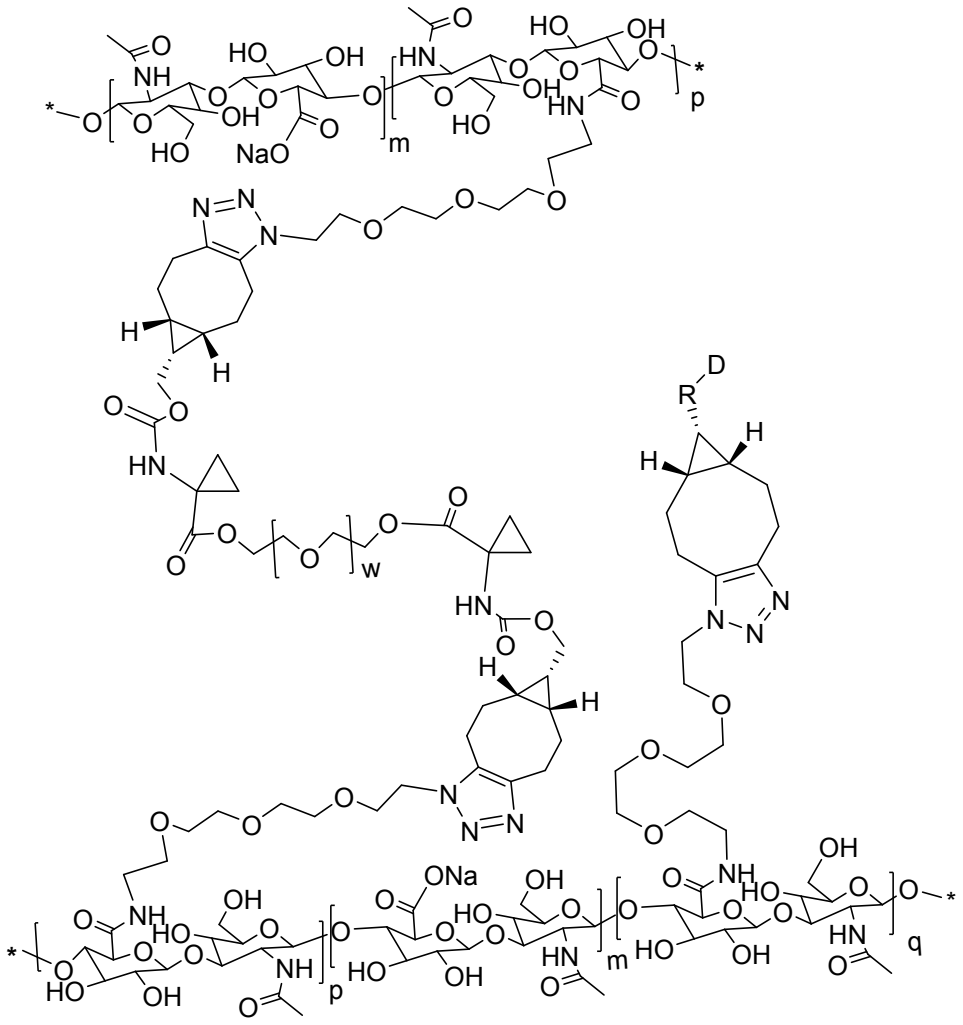
1-carboxamida, o combinaciones de los mismos. En un aspecto, el ligante que no deja huellas R responde a lo descripto en la presente.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXIV), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



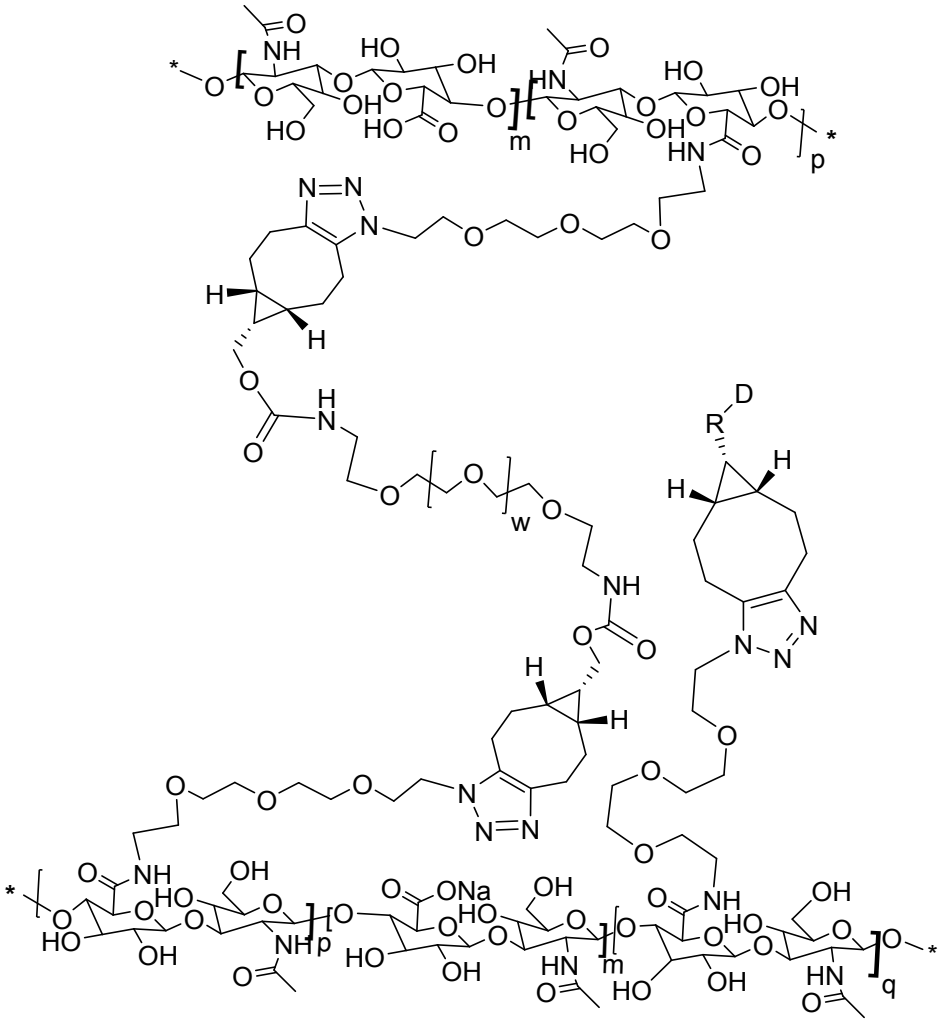
(XXIV).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXV), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



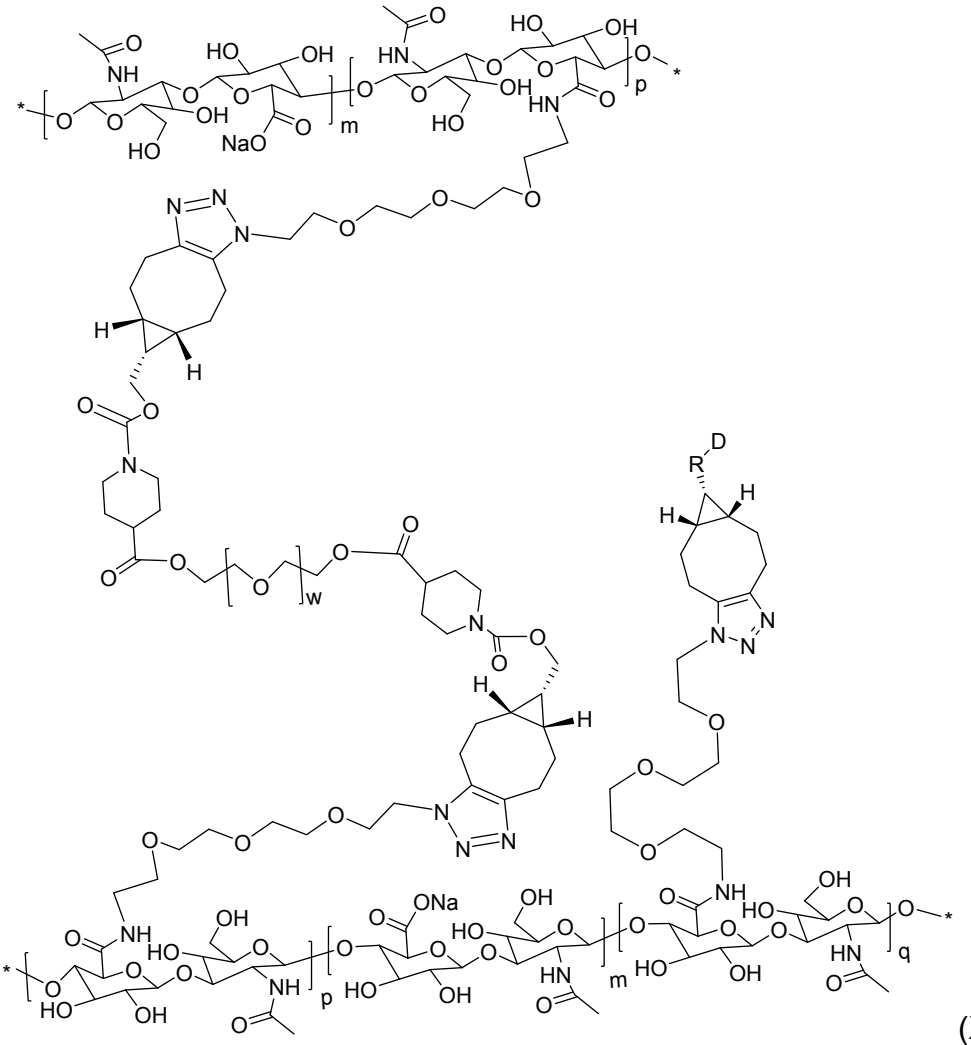
(XXV).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXVI), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



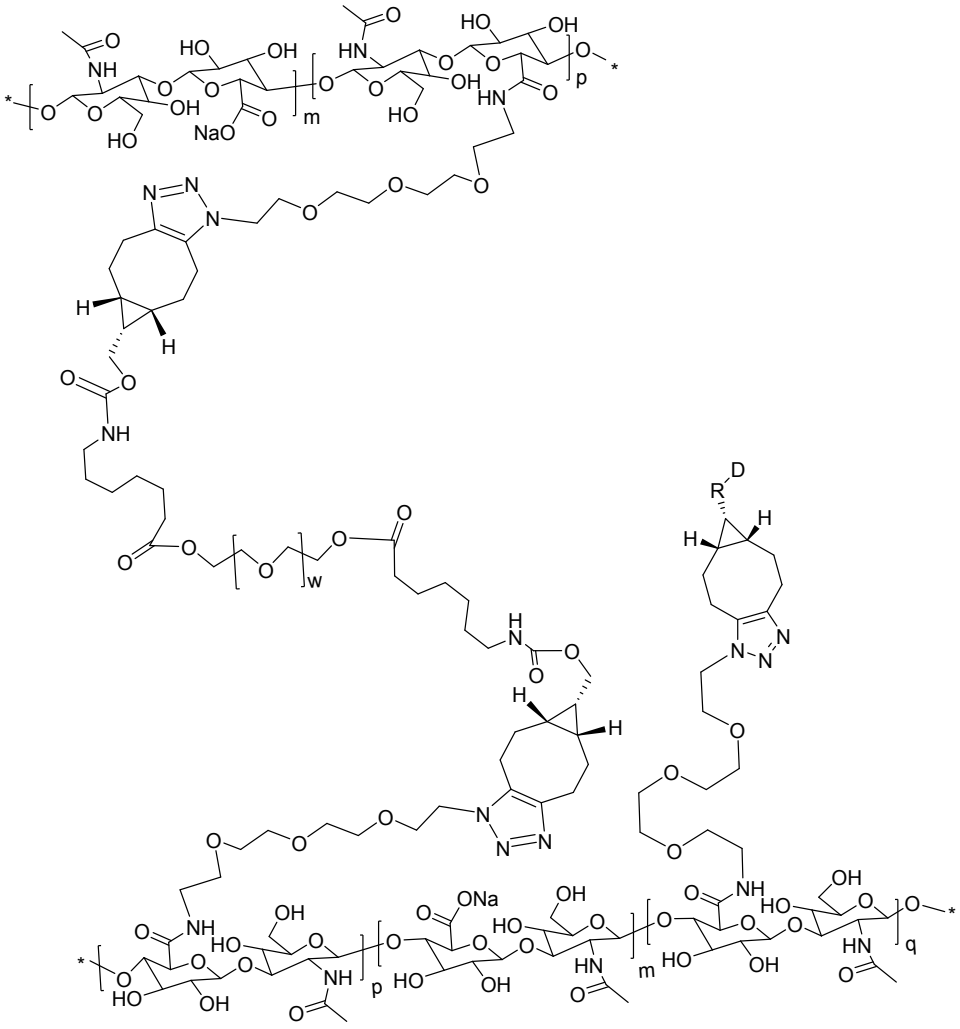
(XXVI).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXVII), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



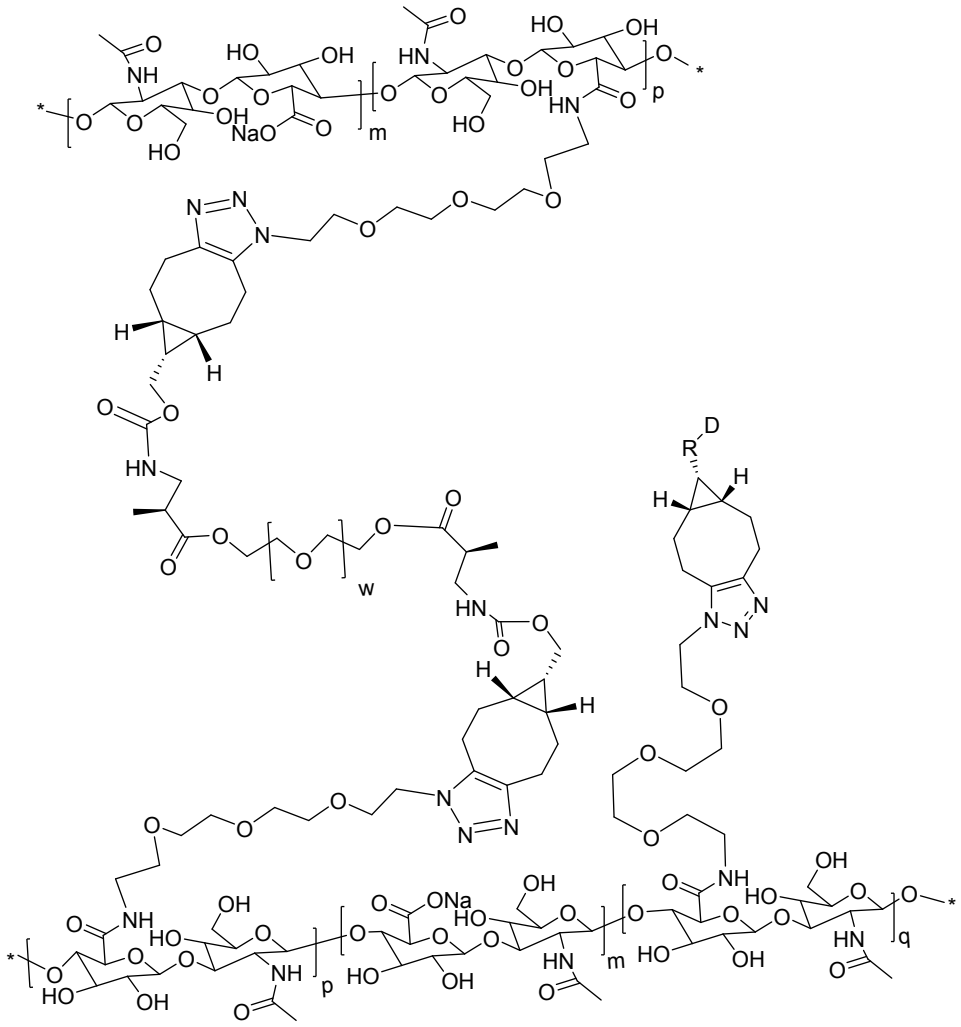
(XXVII).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXVIII), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



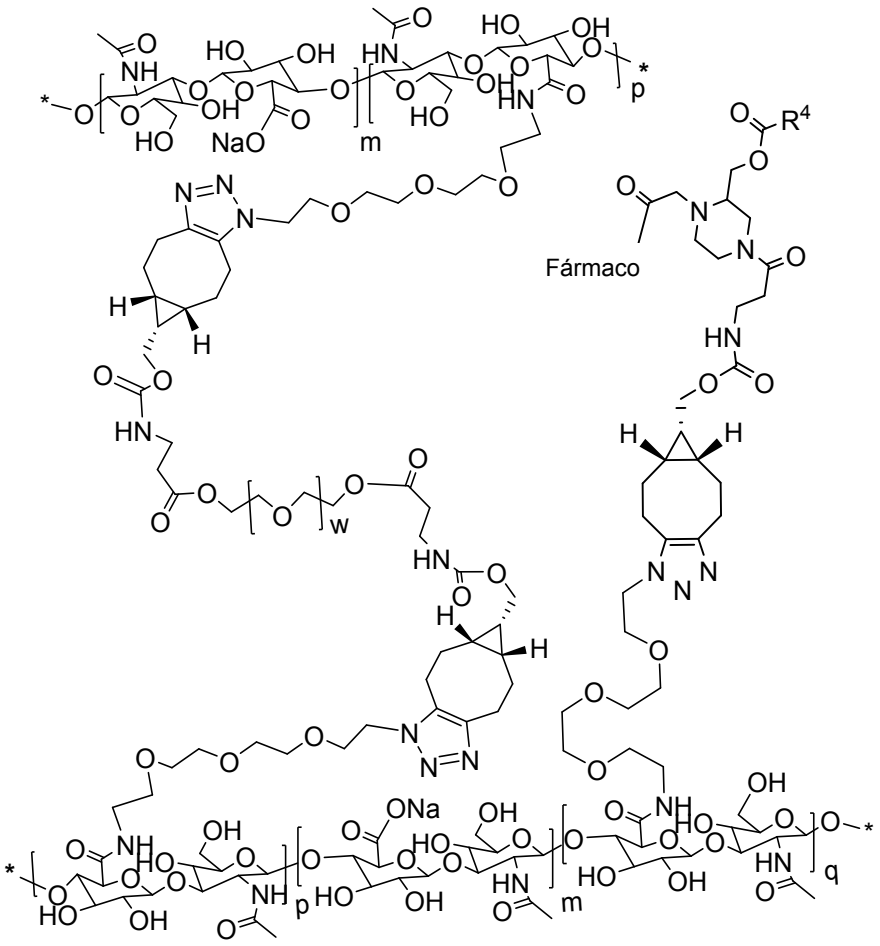
(XXVIII).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXIX), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXIX).

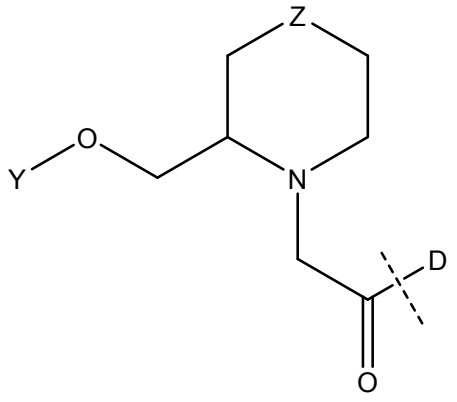
Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la Fórmula (XXX), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo:



(XXX).

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXXI), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y

R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXXI),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

Y es $C(O)R^4$;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

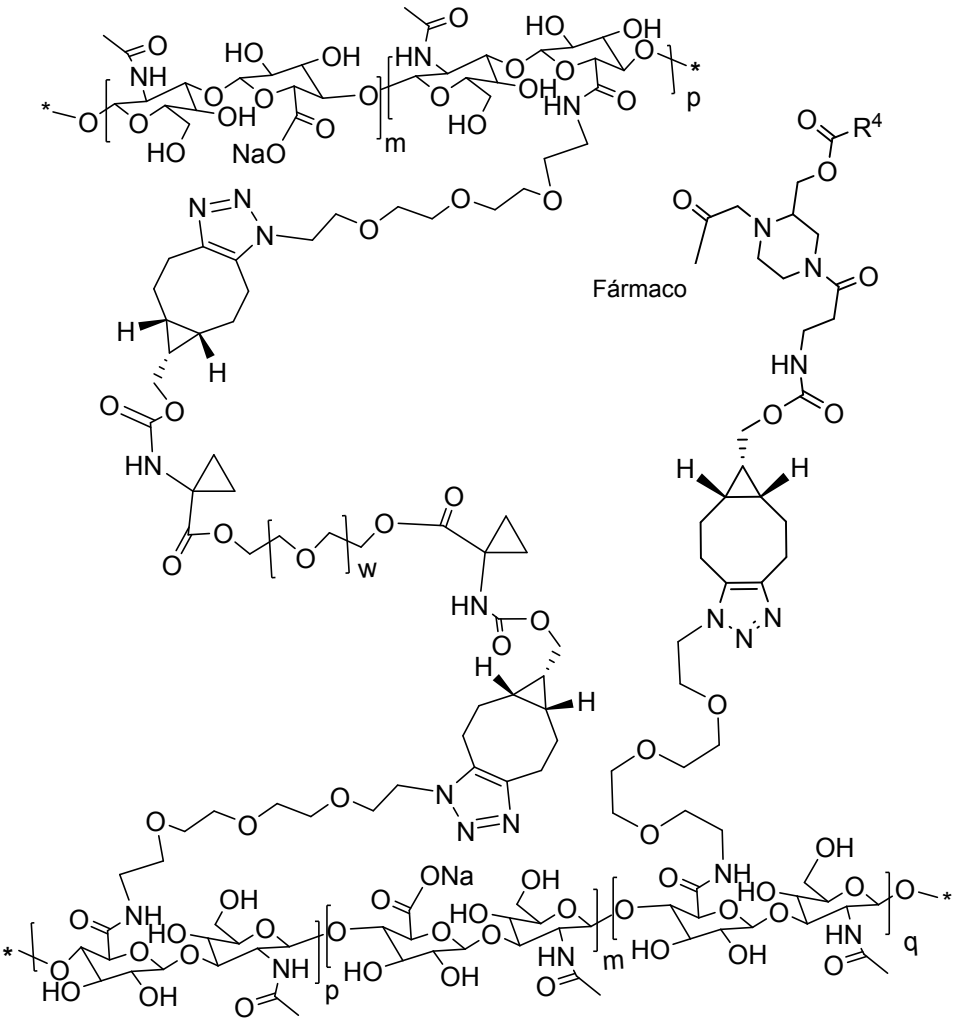
Z es N-L-A;

L es $C(O)CH_2CH_2NH$;

A es R^{11};

R^{11} es un hidrogel derivado de un ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende al menos una cadena lateral unida a amida de $N(H)(CH_2CH_2O)_3$ $CH_2CH_2N_3$, y en donde el reticulador utilizado para formar el hidrogel comprende PEG(2000)-bis-[3-(((((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato]. En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la Fórmula (XXXII), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo:

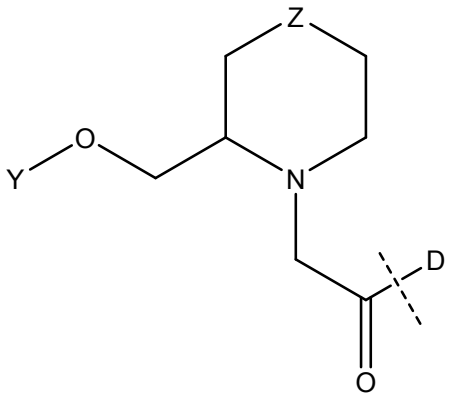


(XXXII).

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula XXXIII, en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y

R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXXIII),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

Y es $C(O)R^4$;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

Z es N-L-A;

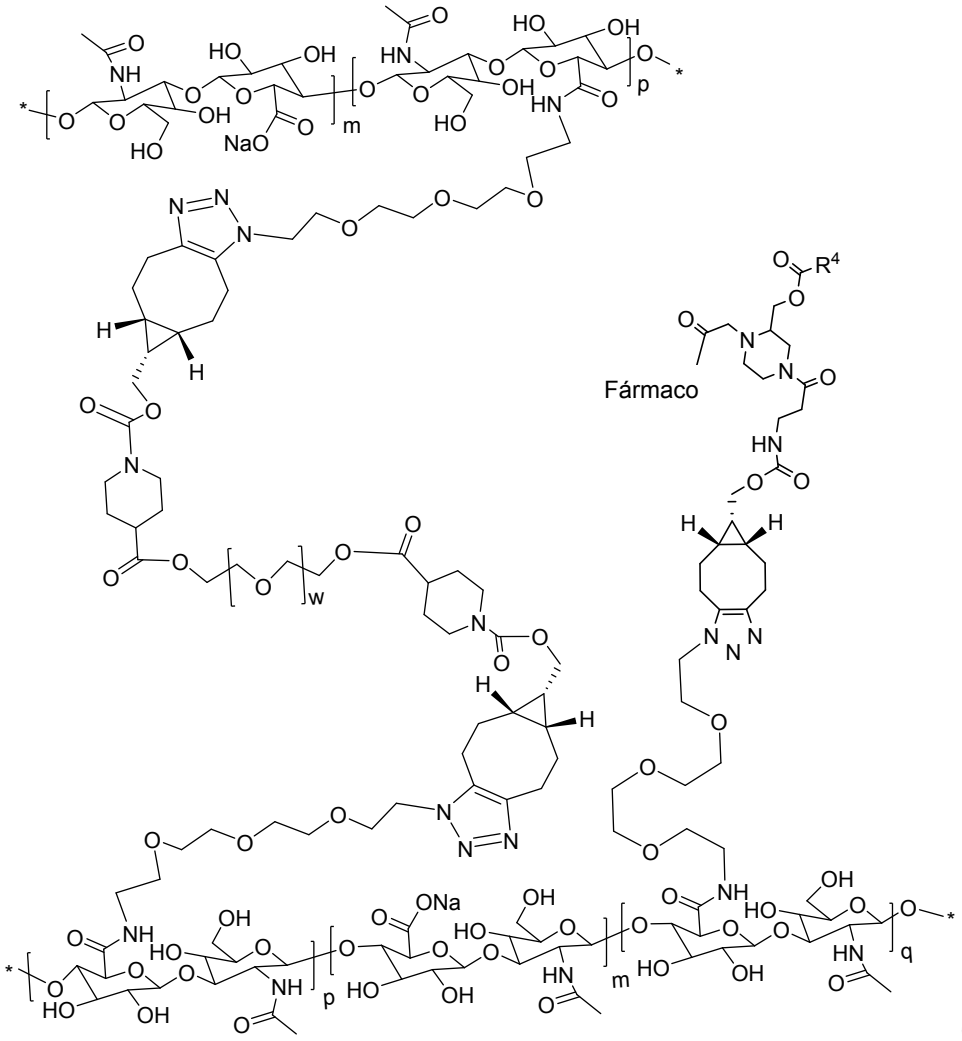
L es $C(O)CH_2CH_2NH$;

A es R^{11};

R^{11} es un hidrogel derivado de un ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende al menos una cadena lateral unida a amida de $N(H)(CH_2CH_2O)_3$ $CH_2CH_2N_3$, y en donde el reticulador utilizado para formar el hidrogel comprende éster de ácido PEG(2000)-bis-[1-((((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxi)carbonil)amino-ciclopropano-1-carboxílico].

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la Fórmula (XXXIV), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo:

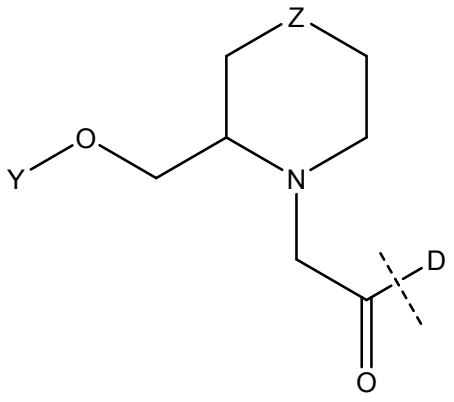


(XXXIV).

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula XXXV, en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y

R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXXV),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

Y es $C(O)R^4$;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

Z es N-L-A;

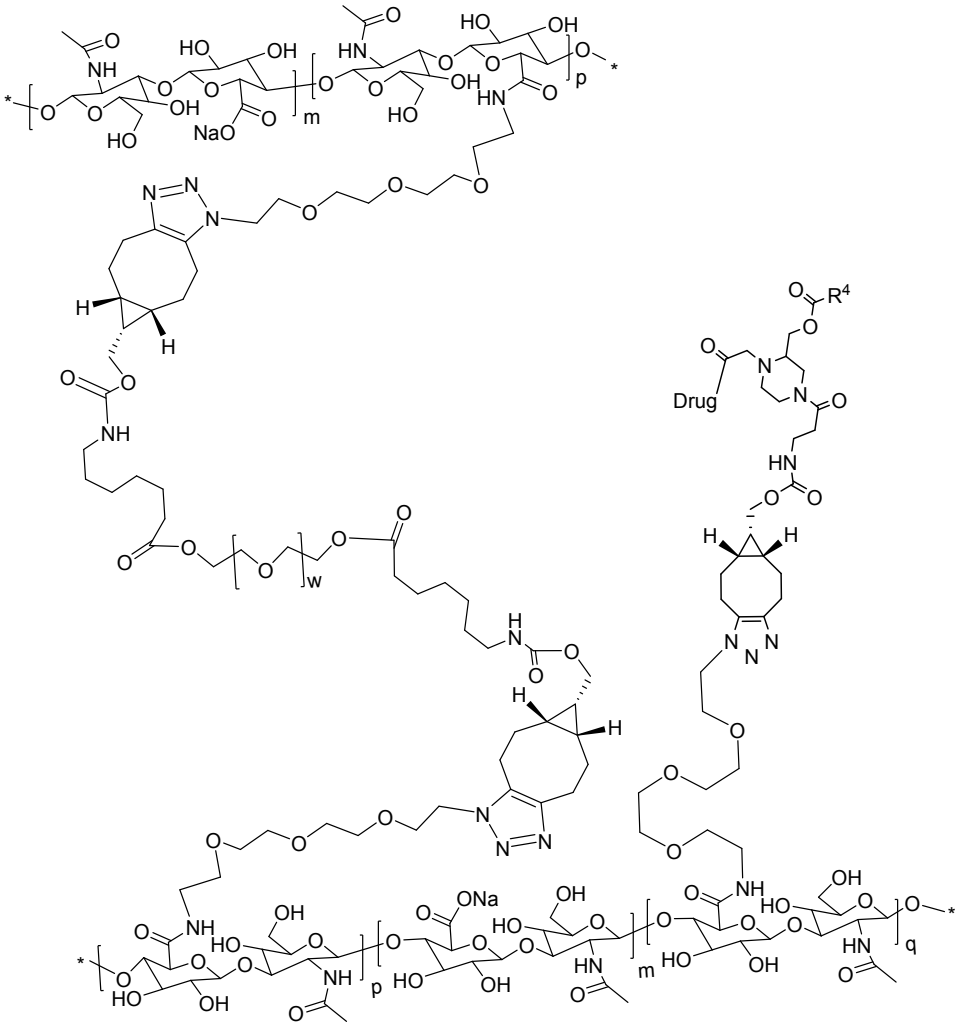
L es $C(O)CH_2CH_2NH$;

A es R^{11};

R^{11} es un hidrogel derivado de un ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende al menos una cadena lateral unida a amida de $N(H)(CH_2CH_2O)_3$ $CH_2CH_2N_3$, y en donde el reticulador utilizado para formar el hidrogel comprende éster de ácido PEG(2000)-bis-[1-((((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxi)carbonil)piperidina-4-carboxílico].

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la Fórmula (XXXVI), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo:

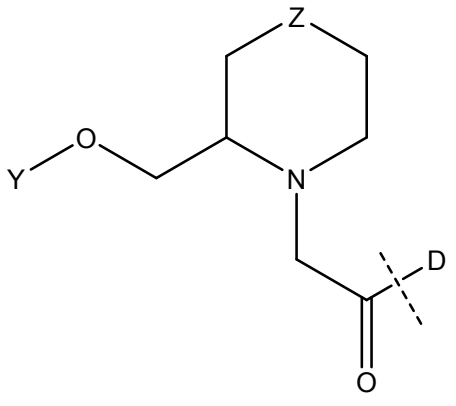


(XXXVI).

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula XXXVII, en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y

R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXXVII),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

Y es $C(O)R^4$;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

Z es N-L-A;

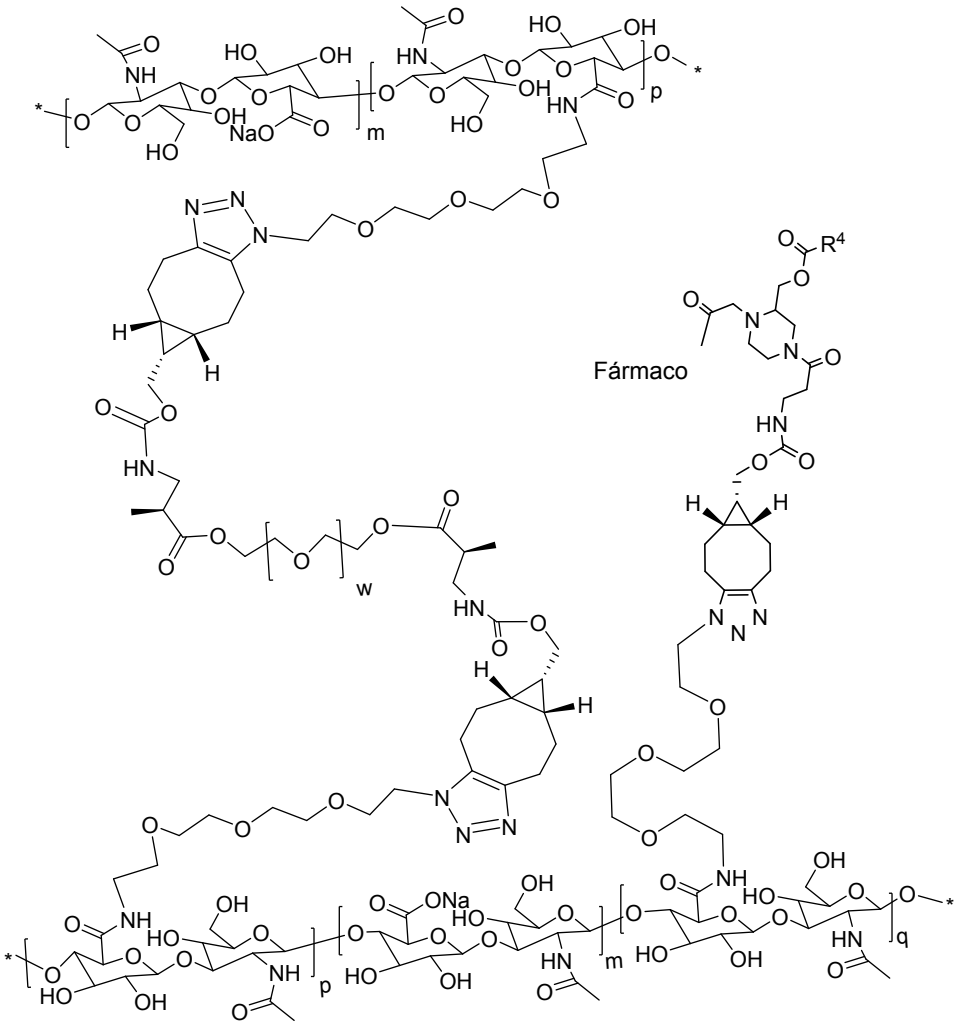
L es $C(O)CH_2CH_2NH$;

A es R^{11};

R^{11} es un hidrogel derivado de un ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende al menos una cadena lateral unida a amida de $N(H)(CH_2CH_2O)_3$ $CH_2CH_2N_3$, y en donde el reticulador utilizado para formar el hidrogel comprende PEG(2000)-bis-[7-(((((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxi)carbonil)amino)heptanoato].

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representado por la Fórmula (XXXVIII), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo:

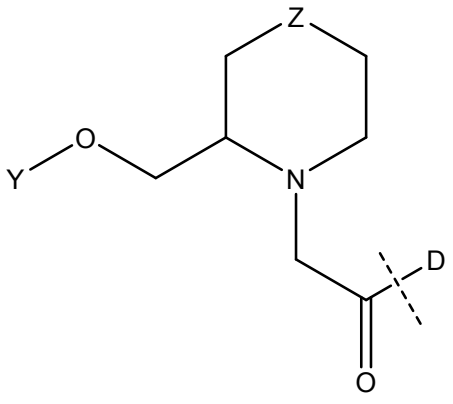


(XXXVIII).

En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R, representado por la Fórmula (XXXIX), en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y

R es un ligante adecuado para la liberación del resto biológicamente activo D:



(XXXIX),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

Y es $C(O)R^4$;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

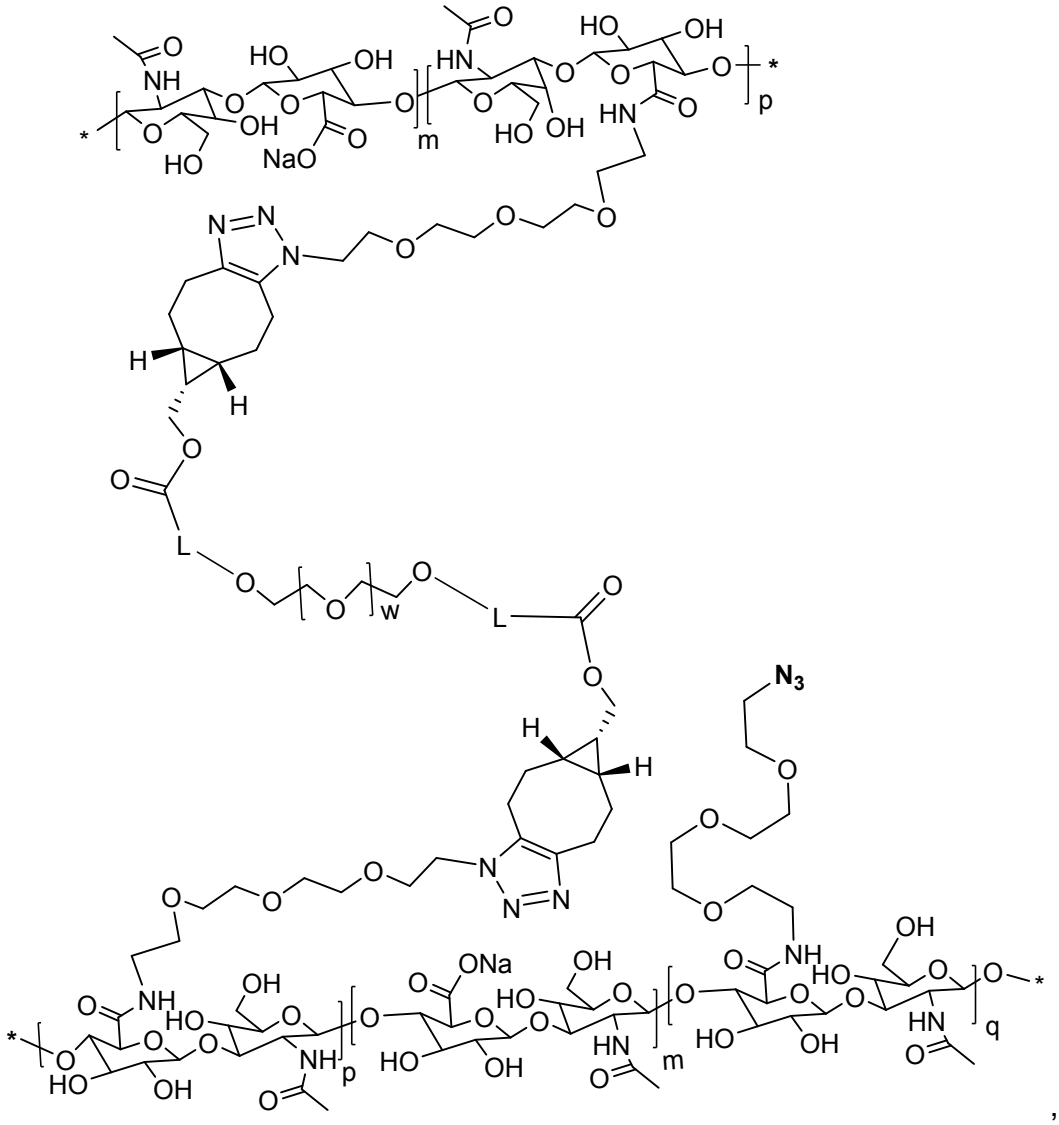
Z es N-L-A;

L es $C(O)CH_2CH_2NH$;

A es R^{11};

R^{11} es un hidrogel derivado de un ácido hialurónico reticulado, en donde el ácido hialurónico comprende al menos una cadena lateral unida a amida de $N(H)(CH_2CH_2O)_3$ $CH_2CH_2N_3$, y en donde el reticulador utilizado para formar el hidrogel comprende PEG(2000)-bis-[2-metil-3-(((((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato]. En un aspecto, D es brolucizumab y R^4 es CH_2CH_3. En otro aspecto, D es brolucizumab y R^4 es $CH(CH_3)CH_3$.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema portador o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, representado por la fórmula:



en donde

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido Q-[Sp-Q]$_h$-Q;

Q se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un enlace, O, C(O), N(H), N(C_1-C_4 alquilo), C(O)NH, C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(H)C(O), N(C_1-C_4 alquilo)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1-C_4 alquilo)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C1-C_4 alquilo), N(H)C(O)N(H), N(C_1-C_4 alquilo)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(C_1-C4 alquilo)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, N(C_1-C_4 alquilo)$S(O)_2$, $S(O)_2$N(H), $S(O)_2$N(C_1-C_4 alquilo), C_1-C_2 alquilo-C(O)N(H), N(H)C(O)C_1-C_2 alquilo, C_1-C_2 alquilo-C(O)O, OC(O)C_1-C_2 alquilo, 1,2,3-triazol, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1-C_4 alquilo-$P(O)_2$-O, o O-$P(O)_2$-C_1-$_4$ alquilo;

Sp se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un C_1-C_{20} alquilo, C_2-C_{20} alquenilo, C_2-C_{20} alquinilo, $[W\text{-}O]_g$, C_1-C_8 alquilo-$[O\text{-}W]_g$, $[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8C alquilo-$[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo opcionalmente sustituido, u oligopéptido;

h es un entero de entre 1 y 20;

g es un número promedio ponderado de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo donde una cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono de la cadena principal; y

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un dibujo que representa un sistema de administración de fármacos que comprende un fármaco conjugado a un portador mediante un ligante que no deja huellas, y el fármaco luego de la liberación. La reacción del desencadenante genera un grupo funcional nucleofílico que escinde el enlace amida que une el fármaco con el sistema de administración de fármacos. En este ejemplo no limitativo, el fármaco está unido a través de un grupo de amina primaria.

La Figura 2 ilustra una representación química parcial de un conjugado de hidrogel-fármaco, donde el hidrogel está compuesto de ácido hialurónico reticulado con un PEG y el fármaco se conjuga con el hidrogel mediante un ligante que no deja huellas con desencadenante Y. En la Figura 2 y en toda la memoria, las moléculas poliméricas, como el ácido hialurónico, se representan como [P]n, en donde P representa la unidad repetitiva monomérica y n representa un número promedio de unidades repetitivas del monómero. El número de unidades repetitivas es una distribución aleatoria para cualquier población de polímeros dada. Además, la conectividad relativa de las moléculas independientes para hidrogeles o los sistemas de suministro de fármacos descriptos en la presente es aleatoria dentro de una población. Las representaciones estructurales de hidrogeles o sistemas de administración de fármacos representan una única unidad estructural potencial en dos dimensiones, mientras que estos complejos son tridimensionales con muchas subunidades estructurales.

La Figura 3A ilustra un ejemplo de reacción de un ligante que no deja huellas con un polímero de ácido hialurónico funcionalizado con azida.

La Figura 3B ilustra un ejemplo de reacción de un ligante que no deja huellas con un hidrogel funcionalizado con azida.

La Figura 4A (que ilustra el Ejemplo 8.1) muestra un ejemplo de la liberación in vitro de brolucizumab de un conjugado de hidrogel.

La Figura 4B ilustra la liberación comparativa in vitro de brolucizumab de los conjugados de hidrogel C1a, C2a, C3a, y C4a.

La Figura 5A (que ilustra el Ejemplo 8.2) ilustra la liberación in vitro de D2 de un conjugado de hidrogel, en comparación con la liberación de los ligantes que no dejan huellas L1, L2, y L5 en tampón PBS.

La Figura 5B ilustra la liberación in vitro de D2 de un conjugado de hidrogel, comparando la liberación de los ligantes que no dejan huellas L1, L2 y L5 en líquido sinovial bovino. (BSF).

La Figura 6 (que ilustra el Ejemplo 8.3) ilustra la liberación in vitro de D4 desde un ligante que no deja huellas, que ilustra la pérdida del parental, aspecto y la posterior desaparición del intermedio y la liberación de D4.

La Figura 7 (que ilustra el Ejemplo 9.1) ilustra los datos de las pruebas in vivo de un brolucizumab-hidrogel a dos niveles de dosis diferentes. La Figura 7A ilustra los datos de fuga de fluoresceína del modelo de desafío con factor de crecimiento endotelial vascular (*por sus siglas en inglés* VEGF) de conejo. La Figura 7B ilustra los niveles de brolucizumab, D1, medidos en el humor vítreo líquido de los mismos conejos en la Figura 7A.

La Figura 8 (que ilustra el Ejemplo 9.3) ilustra la liberación in vivo de D4 de un conjugado de hidrogel.

La Figura 9 (que ilustra el Ejemplo 8.2) ilustra la actividad de D2 liberado in vitro de un hidrogel en fluido sinovial bovino (muestreo diario).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen sistemas de administración de fármacos para administrar agentes biológicamente activos que comprenden aminas primarias o secundarias, o un átomo de

nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, reactivos de administración de fármacos relacionados con los mismos, composiciones farmacéuticas que comprenden los sistemas de administración de fármacos y el uso de los sistemas de administración de fármacos como agentes terapéuticos de liberación sostenida.

De acuerdo con la presente, el término "alquilo" se refiere a una cadena de carbono de cadena lineal, ramificada o cíclica. Salvo indicación en contrario, uno o más átomos de hidrógeno de un carbono de alquilo pueden ser reemplazados por un sustituyente. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, entre otros, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3- dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, y similares. Cuando dos grupos de una molécula están unidos por el grupo alquilo, también se denomina alquileno. “Alquilo inferior” de acuerdo con la presente, se refiere a un subconjunto de alquilo, en algunas formas de realización preferidas, y se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de alquilo inferior incluyen, entre otros, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, y similares. El término "alquilo" o "alquilo inferior" incluye tanto alquilo como alquilo inferior sustituido y no sustituido, a menos que se indique lo contrario, y estos grupos pueden estar sustituidos con grupos orgánicos y/o inorgánicos adicionales, que incluyen pero no se limitan a grupos seleccionados entre halo (por ejemplo, para formar halo alquilo), alquilo, halo alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclo alquilo, ciclo alquilo, arilo, aril alquilo, heterocíclico, hetero ciclo alquilo, hidroxilo, alcoxi (creando así un poli alcoxi tal como polietilenglicol), alqueniloxi, alquiniloxi, halo alcoxi, ciclo alcoxi, cicloalquilalquiloxi, ariloxi, arilalquiloxi, heterociclooxi, heterociclolalquiloxi, mercapto, amino, alquilamino, alquenilamino, alquinilamino, halo alquilamino, ciclo alquilamino, cicloalquil alquilamino, arilamino, aril alquilamino, heterocicloamino, heterociclo alquilamino, amino disustituido, acilamino, aciloxi, ester, amida, sulfonamida, urea, alcoxiacilamino, aminoaciloxi, nitro, ciano alquilo-$S(O)_m$, halo alquilo-$S(O)_m$, alquenil-S(O)n, alquinil-$S(O)_m$, ciclo alquilo-$S(O)_m$, cicloalquil alquilo-$S(O)_m$, aril-$S(O)_m$, aril alquilo-$S(O)_m$, heterociclo-$S(O)_m$, o heterociclo alquilo-$S(O)_m$, donde m = 0, 1, 2, o 3.

De acuerdo con la presente, el término “alquenilo” solo o como parte de otro grupo, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene entre 1 y 10, 20, o 30 o más átomos de carbono (o en alquenilo inferior 1 a 4 átomos de carbono), que incluyen 1 a 4, 5, o 6 o más enlaces dobles en la cadena normal. Los ejemplos representativos de alquenilo incluyen, entre otros, vinilo, 2-propenilo, 3-butenilo, 2-butenilo, 4-pentenilo, 3-pentenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 2,4-heptadieno, y similares. El término “alquenilo” o “alquenilo inferior” incluye tanto alquenilo como alquenilo inferior sustituido y no sustituido, a menos que se indique lo contrario, y estos grupos pueden estar sustituidos con grupos según lo descripto en conexión con alquilo y alquilo inferior anteriormente.

De acuerdo con la presente, el término “alquiniol” de acuerdo con la presente, solo o como parte de otro grupo, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene entre 1 y 10, 20, 30, o 40 o más átomos de carbono (o en alquinilo inferior 1 a 4 átomos de carbono) que incluyen 1, 2, o 3 o más enlaces triple en la cadena normal. Los ejemplos representativos de alquinilo incluyen, entre otros, 2-propinilo, 3-butinilo, 2-butinilo, 4-pentinilo, 3-pentinilo, y similares. El término “alquinilo” o “alquinil inferior” incluye tanto alquinilo como o alquinilo inferior sustituido o no sustituido, a menos que se indique lo contrario, y estos grupos pueden estar sustituidos con los mismos grupos establecidos en relación con alquilo y alquilo inferior anteriormente.

De acuerdo con la presente, el término “cicloalquinilo” se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo cíclico que tiene entre 6 y 16 átomos de carbono y 1, 2, o 3 anillos fusionados o puenteados que incluyen al menos 1 o más enlaces triples en la estructura del anillo.

De acuerdo con la presente, el término “heterocicloalquinilo” se refiere a un sistema cíclico de anillo de hidrocarburo que tiene entre 6 y 16 átomos de carbono, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre oxígeno, nitrógeno y azufre, y 1, 2 o 3 anillos que están fusionados o puenteados, incluyendo al menos 1 o más enlaces triples en la estructura del anillo.

De acuerdo con la presente, el término “cicloalquilo” solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico saturado o parcialmente insaturado que contiene 3, 4, 5, 6, 7, o 8 carbonos (los cuales puede ser reemplazados en un grupo

heterocíclico según se expone a continuación). Los ejemplos representativos de ciclo alquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y ciclooctilo. Estos anillos pueden estar opcionalmente sustituidos con sustituyentes adicionales según lo descripto en la presente, tales como halo o alquilo inferior. El término “cicloalquilo” es genérico y pretende incluir grupos heterocíclicos según lo expuesto a continuación salvo indicación en contrario.

De acuerdo con la presente, el término “heterocíclico” o “heterociclilo” solo o como parte de otro grupo, se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico alifático (por ejemplo, heterocíclico total o parcialmente saturado) o aromático (por ejemplo, heteroarilo). Los sistemas de anillos monocíclicos están ejemplificados por cualquier anillo de 3 a 8 miembros que contenga 1, 2, 3, o 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre oxígeno, nitrógeno y azufre. El anillo de 5 miembros tiene de 0 a 2 enlaces dobles y el anillo de 6 miembros tiene de 0 a 3 enlaces dobles. Los ejemplos representativos de sistemas de anillos monocíclicos incluyen, entre otros, azetidina, azepina, aziridina, diazepina, 1,3-dioxolano, dioxano, dittiano, furano, imidazol, imidazolina, imidazolidina, isotiazol, isotiazolina, isotiazolidina, isoxazol, isoxazolina, isoxazolidina, morfolina, oxadiazol, oxadiazolina, oxadiazolidina, oxazol, oxazolina, oxazolidina, piperazina, piperidina, piran, pirazina, pirazol, pirazolina, pirazolidina, piridina, pirimidina, piridazina, pirrol, pirrolina, pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, tetrazina, tetrazol, tiadiazol, tiadiazolina, tiadiazolidina, tiazol, tiazolina, tiazolidina, tiofeno, tiomorfolina, tiomorfolina sulfona, tiopiran, triazina, triazol, tritiano, y similares. Los sistemas de anillos bicíclicos están ejemplificados por cualquiera de los sistemas de anillos monocíclicos anteriores fusionados a un grupo arilo conforme se define en la presente, un grupo ciclo alquilo conforme se define en la presente, u otro sistema de anillo monocíclico conforme se define en la presente. Los ejemplos representativos de sistemas de anillos bicíclicos incluyen entre otros, por ejemplo, benzimidazol, benzotiazol, benzotiadiazol, benzotiofeno, benzoxadiazol, benzoxazol, benzofurano, benzopiran, benzotiopiran, benzodioxina, 1,3-benzodioxol, cinnolina, indazol, indol, indolina, indolizina, naftiridina, isobenzofurano, isobenzotiofeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, ftalazina, purina, piranopiridina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, quinazolina, tetrahidroisoquinolina, tetrahidroquinolina, tiopiranopiridina, y

similares. Estos anillos incluyen derivados cuaternizados de los mismos y pueden estar opcionalmente sustituidos con grupos orgánicos y/o inorgánicos adicionales, incluidos, entre otros, grupos seleccionados entre halo, alquilo, halo alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclo alquilo, ciclo alquilo, arilo, aril alquilo, heterocíclico, hetero ciclo alquilo, hidroxilo, alcoxi, alqueniloxi, alquiniloxi, halo alcoxi, ciclo alcoxi, cicloalquilalquiloxi, ariloxi, arilalquiloxi, heterociclooxi, heterociclolalquiloxi, mercapto, amino, alquilamino, alquenilamino, alquinilamino, halo alquilamino, ciclo alquilamino, cicloalquil alquilamino, arilamino, aril alquilamino, heterocicloamino, heterociclo alquilamino, amino disustituido, acilamino, aciloxi, ester, amida, sulfonamida, urea, alcoxiacilamino, aminoaciloxi, nitro, ciano, alquilo-$S(O)_m$ halo alquilo-$S(O)_m$, alquenil-$S(O)_m$, alquinil-$S(O)_m$, ciclo alquilo-$S(O)_m$, cicloalquil alquilo-$S(O)_m$, aril-$S(O)_m$, aril alquilo-$S(O)_m$, heterociclo-$S(O)_m$, heterociclo alquilo-$S(O)_m$, donde m = 0, 1, 2, o 3.

De acuerdo con la presente, el término “heteroarilo” se define según lo descripto para heterocíclico.

De acuerdo con la presente, el término “ciclo alquil alquilo,” “cicloalquil alquenilo,” y “cicloalquil alquinilo” de acuerdo con la presente, solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo ciclo alquilo, conforme se define en la presente, unido al resto molecular parental a través de un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo, respectivamente, conforme se define en la presente.

De acuerdo con la presente, el término “ alcoxi” solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo alquilo o alquilo inferior, conforme se define en la presente (y por lo tanto incluye versiones sustituidas como poli alcoxi), unido al resto molecular parental a través de un grupo oxi, -O-. Los ejemplos representativos de alcoxi incluyen, entre otros, metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi, hexiloxi y similares. En algunos aspectos, los grupos alcoxi, cuando formna parte de una molécula más compleja, comprenden un sustituyente alcoxi unido a un alquilo o alquilo inferior a través de un enlace de éter.

De acuerdo con la presente, el término “halo” o “halógeno” se refiere cualquier halógeno adecuado, incluyendo –F, –Cl, –Br, o –I.

De acuerdo con la presente, el término “acilo” solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical –C(O)R’, en donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como arilo,

alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclo alquilo u otro sustituyente adecuado de acuerdo con lo descripto en la presente.

De acuerdo con la presente, el término “alquiltio” solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo alquilo, conforme se define en la presente, unido al resto molecular parental a través de un resto tiol, conforme se define en la presente. Los ejemplos representativos de alquiltio incluyen, entre otros, metiltio, etiltio, terc-butiltio, hexiltio, y similares.

De acuerdo con la presente, el término “amida”, “amido”, o “amidilo” de acuerdo con la presente, solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical $–C(O)NR_aR_b$, donde R_a y R_b son independientemente cualquier sustituyente adecuado como alquilo, hidrógeno, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “éster” solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical –C(O)OR’, donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “éter” solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical –COR’ donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo, o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “sulfona” solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical –S(O)(O)R’, donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “sulfonamida” solo o como parte de otro grupo se refiere a un radical $–S(O)_2NR_aR_b$, donde R_a y R_b son independientemente cualquier sustituyente adecuado como H, alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “carboxilo” se refiere al radical –C(O)OH.

De acuerdo con la presente, el término “hidroxilo” se refiere al radical –OH.

De acuerdo con la presente, el término “amino” se refiere al radical $–NH_2$.

De acuerdo con la presente, vinilo se refiere al radical $–CH_2CH_2$.

De acuerdo con la presente, el término “sulfonato” se refiere al radical –S(O)(O)OR’, donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, el término “sulfonilo” se refiere al radical –S(O)(O)R’, donde R’ es cualquier sustituyente adecuado como alquilo, ciclo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

De acuerdo con la presente, tiol se refiere al radical –SH.

De acuerdo con la presente, oxiamina o aminoxi se refiere al radical $–ONH_2$.

De acuerdo con la presente, “hidrazida” o “hidrazidilo” se refiere al radical –C(O)-NH-NH_2.

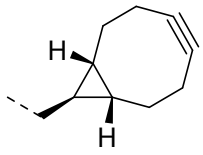
De acuerdo con la presente, “maleimida o maleimidilo” se refiere a un compuesto cíclico con la fórmula molecular $C_2H_2(C(O))_2NH$ o el radical $–N(C(O))_2C_2H_2$ que tiene al menos un doble enlace C-C.

De acuerdo con la presente, furano se refiere a un anillo aromático de cinco miembros con cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno.

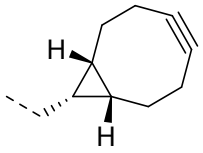
De acuerdo con la presente, “tetrazina” o “tetrazinilo” se refiere a un anillo aromático de seis miembros que contiene cuatro átomos de nitrógeno con la fórmula molecular $C_2H_2N_4$ o el radical $–C_2HN_4$.

De acuerdo con la presente, el término “azida,” “azidilo,” o “azido” se refiere a un grupo $–N_3$.

De acuerdo con la presente, el término “BCN” se refiere a un radical biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metilo, en el que el metileno exocíclico puede tener una orientación exo o endo con respecto al biciclo según lo ilustrado:



exo BCN

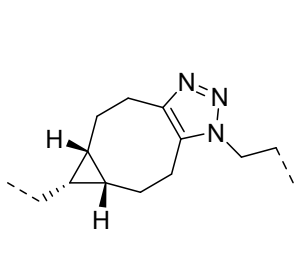


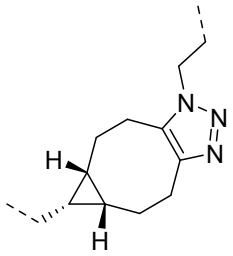
endo BCN

De acuerdo con la presente, a lo largo de la memoria, por conveniencia, la mayoría de las estructuras no representan la estereoquímica y, por lo tanto, representan todos los estereoisómeros posibles.

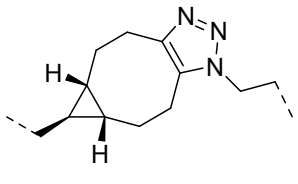
Específicamente con respecto a la estructura de los productos de triazol de la reacción entre un BCN y un compuesto azido, de acuerdo con la presente, a lo largo de la memoria, el sustituyente ligado a N en el anillo de triazol se muestra en una sola posición de regioquímica por conveniencia. El experto en el arte reconocerá que la

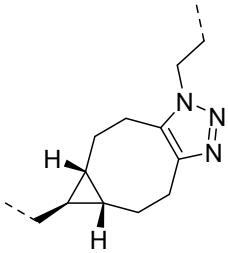
reacción de un alquino BCN con un compuesto azido dará como resultado una mezcla estereoisomérica de productos con el sustituyente unido a N en la posición 1 y 3 del triazol según lo ilustrado:





Productos de reacción estereoisómeros de endo BCN con alquil azida





Productos de reacción estereoisómeros de exo BCN con alquil azida

De acuerdo con la presente, “grupo funcional reactivo” se refiere a un grupo funcional, que es adecuado para reacciones de acoplamiento ortogonales. Los grupos funcionales reactivos adecuados son aquellos que se someten fácilmente a reacciones ortogonales. Los ejemplos no limitativos de reacciones químicas ortogonales incluyen los grupos funcionales ilustrados en la Tabla 1.

De acuerdo con la presente, "desencadenante" se refiere a un grupo funcional presente en el aducto de ligante que no deja huellas y fármaco D-R, que es capaz de experimentar una reacción química que da como resultado un nuevo grupo funcional. La presencia del nuevo grupo funcional disminuye sustancialmente la estabilidad del enlace entre el fármaco y el ligante que no deja huellas y da como resultado una mayor probabilidad de liberación del fármaco.

El término "peso molecular promedio en número" o "Mn" se refiere al peso molecular promedio estadístico de todas las moléculas en la muestra expresado en unidades de g/mol. El peso molecular promedio en número se puede determinar mediante técnicas conocidas en la técnica, como la cromatografía de permeación en gel (en donde Mn se puede calcular con base en estándares conocidos basados en un sistema de detección en línea como un índice de refracción, ultravioleta u otro detector), viscosimetría, espectrometría de masas, o métodos coligativos (por ejemplo, osmometría por presión de vapor, determinación del grupo final, o RMN de protones). El peso molecular promedio en número se define por la siguiente ecuación,

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

en donde M_i es el peso molecular de una molécula y N_i es el número de moléculas de ese peso molecular.

El término "peso molecular promedio en peso" o "Mw" se refiere al peso molecular promedio estadístico de todas las moléculas, teniendo en cuenta el peso de cada molécula para determinar su contribución al promedio de peso molecular, expresado en unidades de g/mol. Cuanto mayor sea el peso molecular de una molécula dada, más contribuirá esa molécula al valor de Mw. El peso molecular promedio en peso puede calcularse mediante técnicas conocidas en la técnica que son sensibles al tamaño molecular, tales como dispersión de luz estática, dispersión de neutrones de ángulo pequeño, dispersión de rayos X y velocidad de sedimentación. El peso molecular promedio en peso se define mediante la ecuación a continuación,

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

en donde 'M_i' es el peso molecular de una molécula y 'N_i' es el número de moléculas de ese peso molecular.

El término "peso molecular promedio de viscosidad" o "Mv" se refiere al peso molecular promedio estadístico de todas las moléculas, teniendo en cuenta el peso de cada molécula para determinar su contribución al promedio de peso molecular, expresado en unidades de g/mol. Las moléculas o polímeros grandes tienen viscosidades más altas que las moléculas más pequeñas. El peso molecular promedio de viscosidad se define mediante la ecuación a continuación,

$$M_v = \left(\frac{\sum N_i M_i^{(1+a)}}{\sum N_i M_i} \right)^{1/a}$$

en donde 'M_i' es el peso molecular de una molécula y 'N_i' es el número de moléculas de ese peso molecular y a es una constante determinada por la molécula, el disolvente y la temperatura. Las moléculas poliméricas flexibles tienen valores de $0.5 \leq a \leq 0.8$. Las moléculas poliméricas semiflexibles tienen ≥ 0,8. El peso molecular promedio de

viscosidad se puede determinar a partir de experimentos de viscosidad intrínseca o cromatografía de exclusión por tamaño.

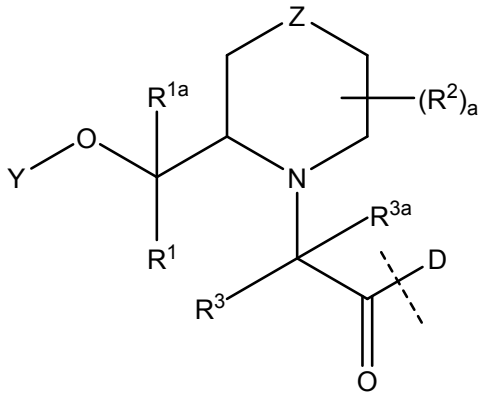
De acuerdo con la presente, un "fármaco" comprende uno o más restos biológicamente activos que comprenden por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. Los restos biológicamente activos pueden ser moléculas pequeñas, macromoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o combinaciones de las mismas. Específicamente en relación con el ligante que no deja huellas, R, el fármaco o el resto biológicamente activo comprende “D” en la representación D–R. Los términos o frases "fármaco", "molécula biológicamente activa", "fracción biológicamente activa", "agente biológicamente activo", "agente activo", se refieren a cualquier sustancia que pueda afectar las propiedades físicas o bioquímicas de un organismo biológico, incluyendo pero no limitado a virus, bacterias, hongos, plantas, animales y humanos. En particular, los fármacos o las moléculas biológicamente activas incluyen cualquier sustancia destinada al diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de humanos o animales. De acuerdo con la presente, se hace referencia a varios fármacos como D1–D4. D1 comprende brolucizumab (SEQ ID NO: 4). D2 comprende (SEQ ID NO: 5). D3 comprende (SEQ ID NO: 6). D4 comprende (SEQ ID NO: 7).

De acuerdo con la presente, un "resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo" se refiere tanto al resto biológicamente activo libre antes de la unión a un ligante que no deja huellas como al resto biológicamente activo libre "D–H", que resulta después de la escisión del aducto del ligante que no deja huellas "D–R". En algunos aspectos, el aducto de fármaco, D–R, puede tener actividad biológica.

De acuerdo con la presente, la "forma libre" de un fármaco o un resto biológicamente activo se refiere al fármaco en su forma farmacológicamente activa no modificada, tal como antes de unirse a un ligante que no deja huellas o después de ser liberado de un ligante que no deja huellas en un sistema de administración de fármacos.

De acuerdo con la presente, un “ligante que no deja huellas,” R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D

que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

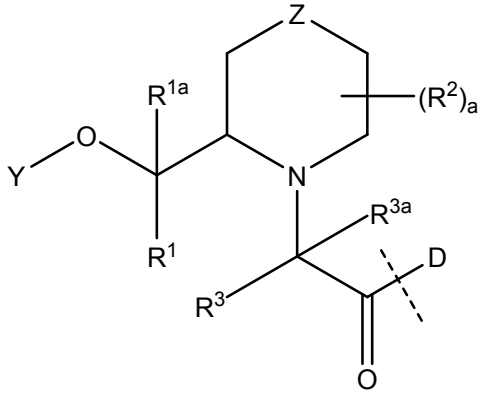
L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido;

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

En otra forma de realización, R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{3a} es hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido Q-$[Sp$-$Q]_h$-Q;

Q se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un enlace, O, C(O), N(H), N(C_1-C_4 alquilo), C(O)NH, C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(H)C(O), N(C_1-C_4 alquilo)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1-C_4 alquilo)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C1-C_4 alquilo), N(H)C(O)N(H), N(C_1-C_4 alquilo)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(C_1-C4 alquilo)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, N(C_1-

C_4 alquilo)$S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N(C_1$-C_4 alquilo), C_1-C_2 alquilo-C(O)N(H), N(H)C(O)C_1-C_2 alquilo, C_1-C_2 alquilo-C(O)O, OC(O)C_1-C_2 alquilo, 1,2,3-triazol, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1-C_4 alquilo-$P(O)_2$-O, o O-$P(O)_2$-C_1-$_4$ alquilo;

Sp se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un C_1-C_{20} alquilo, C_2-C_{20} alquenilo, C_2-C_{20} alquinilo, $[W\text{-}O]_g$, C_1-C_8 alquilo-$[O\text{-}W]_g$, $[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8C alquilo-$[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo opcionalmente sustituido u oligopéptido;

h es un entero de entre 1 y 20;

g es un número promedio ponderado de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

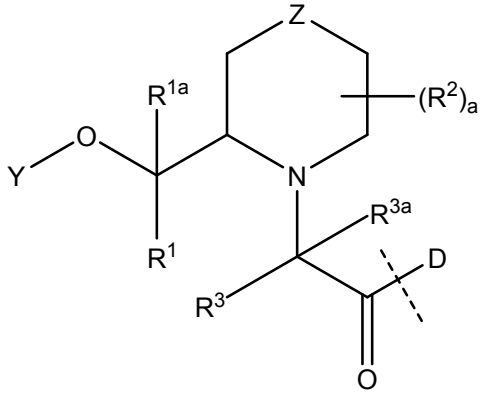
W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C(O)C_1-C_8 alquilo, C(O)OC_1-C_8 alquilo, C(O)N(H)C_1-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

En otra forma de realización, R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es independientemente en cada ocurrencia 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C(O)C_1-C_8 alquilo, C(O)N(H)C_1-C_8 alquilo, C(O)OC_1-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

En un aspecto, el ligante que no deja huellas es un ligante adecuado para la liberación sostenida de un resto biológicamente activo. En un aspecto, “R” es un ligante que no deja huellas en la representación D–R, en donde “D” se refiere a un fármaco que comprende un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo.

De acuerdo con la presente, un “aducto de fármaco” es un fármaco, D unido a un ligante que no deja huellas, R. Específicamente con respecto a un ligante que no deja huellas, R, el aducto de fármaco comprende “D–R.”

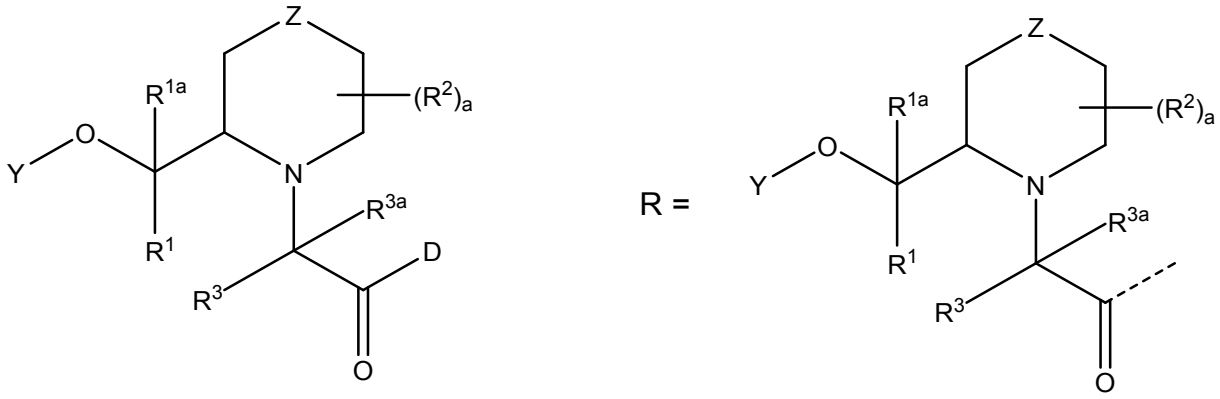
De acuerdo con la presente, un "portador" es un polímero soluble, biopolímero, o un polímero o biopolímero reticulado. Los portadores comprenden proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, o polietilén glicoles. En un aspecto, el portador o múltiples portadores están reticulados intermolecularmente, intramolecularmente, o una combinación de ello. En un aspecto, el portador reticulado comprende un hidrogel. Específicamente con respecto a un ligante que no deja huellas, R, el portador comprende R^{11}. En un aspecto, Z está unido a un portador, típicamente un polímero o un hidrogel. El portador está conectado al ligante que no deja huellas, R, ya sea directamente o mediante un espaciador no escindible. Como ejemplos no limitativos, los portadores pueden comprender polietilén glicoles, polímeros de ácido hialurónico, ácido hialurónico o polietilenglicol reticulado que son capaces de formar hidrogeles.

De acuerdo con la presente, un "polímero" se refiere a una molécula compuesta de unidades estructurales repetitivas (monómeros) conectadas por enlaces químicos de forma lineal, circular, ramificada, dendrimérica o una combinación de las mismas, que pueden ser de origen sintético o biológico o una combinación de ambos. Típicamente, un polímero tiene un peso molecular promedio de al menos 1 kDa. Un copolímero es un polímero compuesto de al menos dos monómeros químicamente distintos. Típicamente, un polímero está compuesto de moléculas que tienen cierta distribución de pesos moleculares. Una forma de describir la distribución del peso molecular de un polímero es el peso molecular promedio. Típicamente, un polímero está compuesto de moléculas que tienen cierta distribución del grado de polimerización. Una forma de describir el grado de distribución de polimerización de un polímero es el grado promedio de polimerización.

Según lo descripto y lo ilustrado en las estructuras de la presente, las moléculas poliméricas, como el polietilén glicol o el ácido hialurónico, se representan como $[P]_n$, donde *P* representa la unidad repetitiva monomérica y *n* representa el grado promedio de polimerización del monómero en el polímero. El experto en la técnica entenderá que dos moléculas poliméricas representadas con una unidad repetitiva *P* idéntica pero diferente *n* se consideran equivalentes si la diferencia es aproximadamente 10% o menos de *n*. Para los copolímeros de ácido hialurónico descriptos y representados en las estructuras de la presente, la distribución de monómeros en el polímero no está definida y se supone que es aleatoria. Además, la conectividad relativa de las moléculas independientes para hidrogeles o sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente es aleatoria dentro de una población. Las representaciones estructurales de hidrogeles o sistemas de administración de fármacos representan una única unidad estructural potencial en dos dimensiones, mientras que estos complejos son tridimensionales con muchas subunidades estructurales.

De acuerdo con lo descripto en la presente, la posición exacta de la formación del enlace amida no se conoce con precisión para un aducto de ligante que no deja huellas-fármaco, R – D. Esto puede ocurrir cuando D contiene más de una amina primaria o secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo capaz de formar un enlace amida con un ligante R (por ejemplo, una proteína). Por cuestión de

conveniencia, los aductos en los que la posición de la formación del enlace amida no se conoce con precisión se representan de la siguiente manera:



De acuerdo con la presente, un “hidrogel” se refiere a una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfifílica capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas de homopolímeros o copolímeros, y son insolubles debido a la presencia de enlaces cruzados químicos o físicos covalentes (iónicos, interacciones hidrofóbicas, enredos). Los enlaces cruzados proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles exhiben una compatibilidad termodinámica con el agua que les permite expandirse en medios acuosos. Las cadenas de la red están conectadas de tal manera que existen poros y los solutos solubles en agua con dimensiones más pequeñas que los poros pueden difundirse dentro y fuera de la red.

De acuerdo con la presente, un "ligante" o "ligante no biológicamente activo" se refiere a un ligante que no produce ningún efecto farmacológico. En algunas formas de realización, el ligante comprende un ligante orgánico bivalente o multivalente que es compatible con sistemas biológicos. "Bivalente" se refiere a que tiene un grupo reactivo adecuado para la unión a un ligante que no deja huellas o fármaco, D, en cada extremo del polímero. "Multivalente" se refiere a tener un grupo reactivo adecuado para la unión a un ligante que no deja huellas o fármaco, D, en cada extremo del polímero con restos reactivos adicionales intercalados a lo largo de la molécula ligante.

De acuerdo con la presente, un “sistema de administración de fármacos” comprende un portador unido a un aducto de fármaco, D–R–R^{11}, en donde el portador comprende R^{11}. El sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente es el conjugado molecular que comprende uno o más fármacos, D; uno o más ligantes que no dejan huellas, R; y uno o más portadores, R^{11}. En algunas formas

de realización, puede haber múltiples clases distintas de fármacos conjugados a una sistema de administración de fármacos. Por ejemplo, dos fármacos diferentes, como D1 y D2, pueden conjugarse en un único sistema de administración de fármacos.

De acuerdo con la presente, la frase "insoluble en agua" se refiere a una red molecular reticulada tridimensionalmente expandible que forma el hidrogel. El hidrogel, si está suspendido en un gran exceso de agua o un tampón acuoso de osmolalidad fisiológica, puede absorber una cantidad sustancial de agua, por ejemplo, hasta 10 veces en peso por peso y, por lo tanto, es expandible pero después de eliminar el exceso de agua todavía conserva la estabilidad física de un gel y una forma. Esta forma puede ser de cualquier geometría y se entiende que dicho objeto de hidrogel individual debe considerarse como una molécula única que consta de componentes en donde cada componente está conectado entre sí a través de enlaces químicos.

De acuerdo con la presente, “liberación sostenida” o “tasa de liberación sostenida” se refiere a la situación en la que se expanden los intervalos entre las dosis subsiguientes del respectivo sistema de administración de fármacos requerido para lograr un efecto terapéutico deseado. Los fármacos con una dosis diaria pueden, por ejemplo, convertirse en una forma de liberación sostenida en un intervalo de una semana o incluso más entre dos administraciones.

De acuerdo con la presente, un "grupo funcional" se refiere a un grupo de átomos dentro de moléculas que exhiben una actividad química específica. Los ejemplos son las amidas, aminas, alcoholes, carbonilos, ácidos carboxílicos, tioles.

De acuerdo con la presente, un "grupo protector" se refiere a un resto que protege temporalmente un grupo funcional de una molécula durante la síntesis para obtener quimioselectividad en reacciones químicas posteriores. Los grupos protectores para alcoholes son, por ejemplo, bencilo y tritilo, los grupos protectores para aminas son, por ejemplo, terc-butiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetililoxicarbonilo y bencilo, y los ejemplos de grupos protectores de tioles son 2,4,6-trimetoxibencilo, feniltiometilo, acetamidometilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, terc-butiltio, trifenilmetilo, 3-nitro-2-piridiltio, 4-metiltritilo.

De acuerdo con la presente, un "grupo funcional protegido" hace referencia a un grupo funcional protegido por uno o más grupos protectores.

De acuerdo con la presente, “PBS” hace referencia una solución salina tamponada con fosfato.

De acuerdo con la presente, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades del agente biológicamente activo y que, por lo general, no son biológicamente o por otras razones indeseables. En muchos casos, el agente biológicamente activo es capaz de formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, alcanfor sulfonato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofilina, citrato, etandisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, subsalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Los ácidos inorgánicos de los que se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

Los ácidos orgánicos de los que se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares.

Se pueden formar sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con bases inorgánicas y orgánicas.

Las bases inorgánicas de las cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas formas de realización, las sales se derivan de sodio, potasio, amonio, calcio,

magnesio, hierro, plata, zinc y cobre; las sales particularmente adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio iónico, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina o trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir de un compuesto parental, un resto básico o ácido, a través de métodos químicos convencionales.

En general, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido de Na, Ca, Mg, K, carbonato, bicarbonato, o similares), o haciendo reaccionar las formas básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Dichas reacciones se ejecutan típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, es deseable el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, siempre que sea posible. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1990); y en “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

De acuerdo con la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes y similares, y combinaciones de los mismos, tal como lo advertirán los expertos en la técnica (*véase, por ejemplo*, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18th ed. Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier

portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El término “una cantidad terapéuticamente efectiva” de un agente biológicamente activo se refiere a una cantidad del agente biológicamente activo que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, mejora de un síntoma, alivio de una afección, el retraso o demora del avance de la enfermedad, la prevención de una enfermedad, etc.

En otra forma de realización no limitativa, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente biológicamente activo que, cuando se administra a una célula, a un tejido, a un material biológico no celular, a un medio, es eficaz para tratar al menos parcialmente la enfermedad o trastorno. Según advertirán los expertos en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que sea efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente a administrar, el tejido objetivo, etc. Los expertos en la técnica entenderán que "una cantidad terapéuticamente efectiva" puede administrarse en una sola dosis o puede lograrse mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar la insuficiencia cardíaca, una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para resultar en una mejoría clínica del paciente, por ejemplo, aumento de la tolerancia/capacidad de ejercicio, aumento de la presión arterial, disminución de la retención de líquidos y/o resultados mejorados en una prueba cuantitativa de funcionamiento cardíaco, por ejemplo, fracción de eyección, capacidad de ejercicio (tiempo hasta el agotamiento), etc.

De acuerdo con la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere por ejemplo, a primates (por ejemplo, humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, pájaros y similares. En ciertas formas de realización, el sujeto es un primate. En aún otras formas de realización, el sujeto es un humano.

De acuerdo con la presente, el término “inhibir”, “inhibición” o “inhibiendo” se refiere a la reducción o supresión de una afección, síntoma, trastorno o enfermedad dada, o una disminución significativa en la actividad basal de una actividad o proceso biológico.

De acuerdo con la presente, el término “tratar”, “tratando” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una forma de realización a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retrasar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos). En otra forma de realización “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluidos aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra forma de realización, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a una modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambas. En aún otra forma de realización, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retrasar el inicio o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con la presente, los términos "prevenir", "prevenir" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia, inicio o desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes terapéuticos).

De acuerdo con la presente, un sujeto "necesita" o "tiene la necesidad de" un tratamiento si dicho sujeto se beneficiaría biológica, médicamente o en calidad de vida mediante dicho tratamiento.

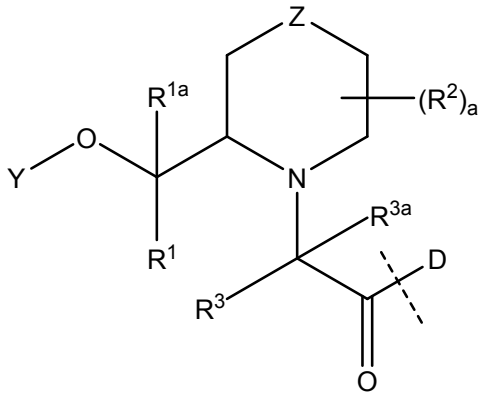
De acuerdo con la presente, los artículos “uno”, “el” y sus variantes de acuerdo con la presente (en especial en el contexto de las reivindicaciones) contemplan las formas plurales salvo que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente.

De acuerdo con la presente, el término “aproximadamente” se refiere a cualquier valor, incluidos los enteros y fracciones dentro de una variación de hasta ± 10% del valor modificado por el término "aproximadamente".

El término "o" puede ser conjuntivo o disyuntivo de manera que "o" abarque "y/o.”

Una forma de realización descripta en la presente es un aducto de fármaco que comprende un fármaco y un ligante que no deja huellas, D–R, en donde R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D

que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o -$(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

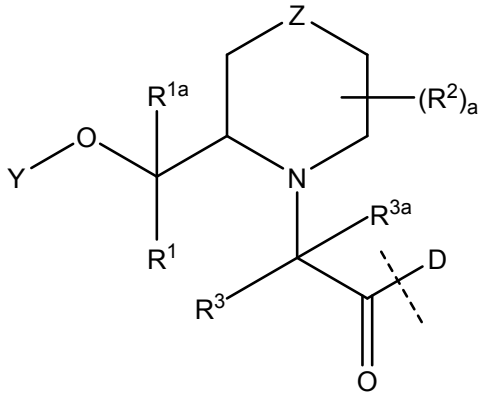
L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido;

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un aducto de fármaco que comprende un fármaco y un ligante que no deja huellas, D–R, en donde R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido Q-$[Sp$-$Q]_h$-Q;

Q se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un enlace, O, C(O), N(H), N(C_1-C_4 alquilo), C(O)NH, C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(H)C(O), N(C_1-C_4 alquilo)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1-C_4 alquilo)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C1-C_4 alquilo),

N(H)C(O)N(H), N(C_1-C_4 alquilo)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(C_1-C4 alquilo)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, N(C_1-C_4 alquilo)$S(O)_2$, $S(O)_2$N(H), $S(O)_2$N(C_1-C_4 alquilo), C_1-C_2 alquilo-C(O)N(H), N(H)C(O)C_1-C_2 alquilo, C_1-C_2 alquilo-C(O)O, OC(O)C_1-C_2 alquilo, 1,2,3-triazol, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1-C_4 alquilo-$P(O)_2$-O, o O-$P(O)_2$-C_1-$_4$ alquilo;

Sp se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un C_1-C_{20} alquilo, C_2-C_{20} alquenilo, C_2-C_{20} alquinilo, $[W\text{-}O]_g$, C_1-C_8 alquilo-$[O\text{-}W]_g$, $[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8C alquilo-$[O\text{-}W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo opcionalmente sustituido u oligopéptido;

h es un entero de entre 1 y 20;

g es un número promedio ponderado de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

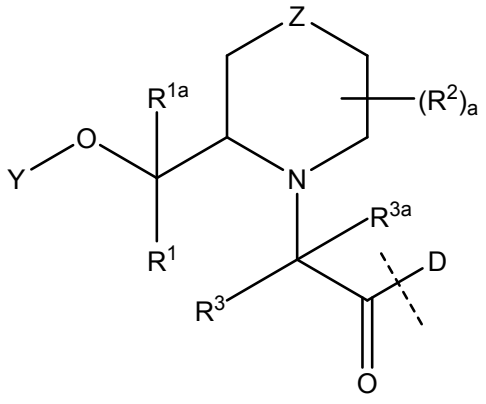
W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C(O)C_1-C_8 alquilo, C(O)OC_1-C_8 alquilo, C(O)N(H)C_1-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

Otra forma de realización descripta en la presente es un aducto de fármaco que comprende un fármaco y un ligante que no deja huellas, D–R, en donde R, es un ligante representado por la Fórmula (I) adecuado para liberar el resto biológicamente activo D que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo:



(I),

donde la línea de puntos indica la unión a la amina primaria, la amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo;

R^1 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{1a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o CR^1R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^2 se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre C_1-C_4 alquilo o oxo, o dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo C3-C6 ciclo alquilo o espiro C3-C6 cicloalq-1,1-diilo fusionado;

a es 0, 1, 2, 3 o 4;

R^3 es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

$R^{3a\ es}$ hidrógeno, C_1-C_4 alquilo, o CR^3R^{3a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

Y es $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$, o $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo;

R^{12a} es hidrógeno o C_1-C_4 alquilo, o $CR^{12}R^{12a}$, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo;

R^{13} es C_1-C_4 alquilo; o

$CHR^{12}OR^{13}$, tomados en combinación forman un éter cíclico de 5, 6 o 7 miembros;

R^4 es C_1-C_8 alquilo o C_3-C_7 ciclo alquilo, en donde ciclo alquilo está opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados y en donde el alquilo es opcionalmente sustituido por C_1-C_4 alcoxi;

R^5 y R^6 son respectivamente independientemente seleccionados entre C_1-C_4 alquilo y C_3-C_6 ciclo alquilo;

R^7 es C_1-C_8 alquilo, C_3-C_7 ciclo alquilo, C_1-C_8 alcoxi, C_3-C_7 cicloalquiloxi, hetero cicloalquiloxi, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo, en donde el hetero cicloalquiloxi es un anillo heterocíclico saturado de 4 a 7 miembros que tiene un heteroátomo anular seleccionado entre N, O, y S y opcionalmente sustituido con 0, 1, o 2 grupos C1-C4 alquilo independientemente seleccionados;

b es un entero de entre 1 y 10;

Z es CHR^8 o NR^9;

R^8 y R^9 son respectivamente independientemente seleccionados entre hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, o $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$-Q-A, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 Q-A;

q es independientemente en cada ocurrencia 1, 2, o 3;

g y p tienen respectiva e independientemente una longitud promedio ponderada de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

m es 1 o 0;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

Q es un enlace, O, N(H) o N(C_1-C_4 alquilo);

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

En algunos aspectos, R^1–R^8 de la Fórmula (I) tienen los siguientes significados. En un aspecto, R^1 es hidrógeno o metilo. En otro aspecto, R^{1a} es hidrógeno, o metilo. En otro aspecto, R^1 y R^{1a}, tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo. En otro aspecto, R^2 es metilo. En otro aspecto, dos grupos R^2 tomados en combinación forman un grupo ciclo alquilo C3-C6 fusionado o espiro. En otro aspecto, R^3 es hidrógeno o metilo. En otro aspecto, R^{3a} es hidrógeno o metilo. En otro aspecto, R^3 y R^{3a} tomados en combinación forman un C_3-C_6 cicloalq-1,1-diilo. En otro aspecto, Y es $C(O)R^4$ y R^4 es C_1-C_6 alquilo, C_1-C_2 alcoxi, C_1-C_2 alquilo o C_1-C_6 alcoxi. En otro aspecto, R^4 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, 1-metil-ciclopropilo, o metoximetilo. En otro aspecto, Y es $SiR^5R^6OR^7$; y R^5 y R^6 son respectivamente metilo, etilo, propilo o isopropilo; y R^7 es etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, etoxietilo, etoxiisopropilo, tetrahidropiranilo, o $-(OCHR^3CH_2)_bO$-C_1-C_4 alquilo donde b es 2, 3, o 4.

En algunos aspectos, R^8 y R^9 de la Fórmula (I) tienen los siguientes significados. En un aspecto, R^9 es, $C(O)C_2$ carbamoilo En otro aspecto, R^9 es $C(O)C_2$ amidilo. En otro aspecto, R^9 es $C(O)C_5$ alquilo. En otro aspecto, R^9 es $C(O)C_2$ alquilo. En otro aspecto, R^9 es $C(O)C_1$ alquilo. En otro aspecto, R^9 es $C(O)CH_2CH_2NHC(O)CH_2CH_2CH_2CH_2$. En otro

aspecto, R^9 es $C(O)(CH_2CH_2O)_bCH_2CH_2$ donde b es 1, 2, 3, o 4. En otro aspecto, R^9 es amidilo. En otro aspecto, R^9 es carbamoilo En otro aspecto, R^9 es C_1 alquilo amidilo. En otro aspecto, R^9 es C_2 alquilo amidilo.

En algunos aspectos, Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido;

A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y

R^{11} es un portador.

En algunos aspectos, Z es CH-L-A, CH-A, N-L-A, o N-A;

L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido Q-$[Sp-Q]_h$-Q;

Q se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un enlace, O, C(O), N(H), N(C_1-C_4 alquilo), C(O)NH, C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(H)C(O), N(C_1-C_4 alquilo)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1-C_4 alquilo)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C1-C_4 alquilo), N(H)C(O)N(H), N(C_1-C_4 alquilo)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), N(C_1-C4 alquilo)C(O)N(C_1-C_4 alquilo), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, N(C_1-C_4 alquilo)$S(O)_2$, $S(O)_2$N(H), $S(O)_2$N(C_1-C_4 alquilo), C_1-C_2 alquilo-C(O)N(H), N(H)C(O)C_1-C_2 alquilo, C_1-C_2 alquilo-C(O)O, OC(O)C_1-C_2 alquilo, 1,2,3-triazol, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1-C_4 alquilo-$P(O)_2$-O, o O-$P(O)_2$-C_1-$_4$ alquilo;

Sp se selecciona independientemente en cada ocurrencia entre un C_1-C_{20} alquilo, C_2-C_{20} alquenilo, C_2-C_{20} alquinilo, $[W-O]_g$, C_1-C_8 alquilo-$[O-W]_g$, $[O-W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo, C_1-C_8C alquilo-$[O-W]_g$-O-C_1-C_8 alquilo opcionalmente sustituido u oligopéptido;

h es un entero de entre 1 y 20;

g es un número promedio ponderado de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50;

W es C_2-C_4 alquilo-1,2-diilo en donde la cadena lateral de hidrógeno, metilo o etilo puede estar presente en cualquier átomo de carbono del esqueleto;

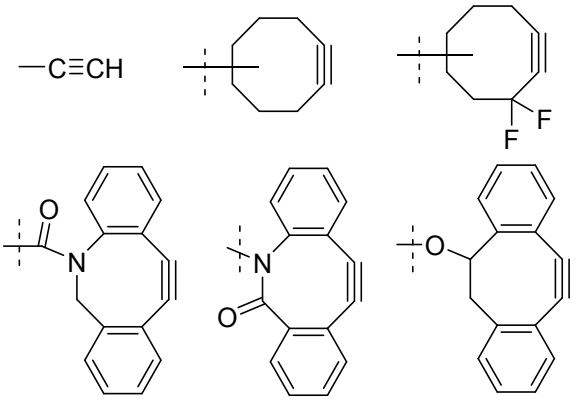
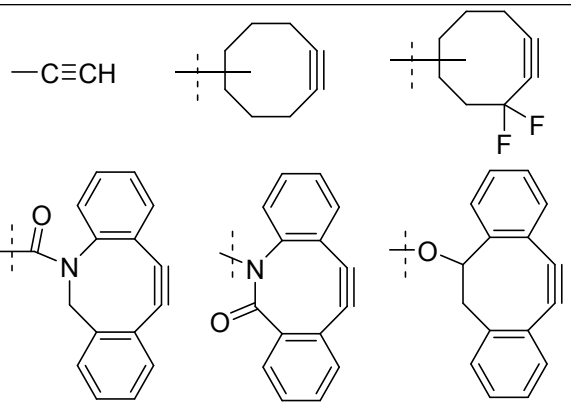
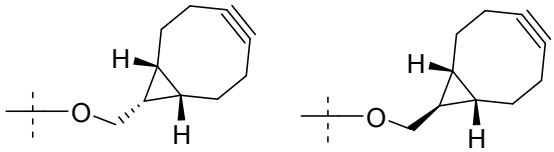
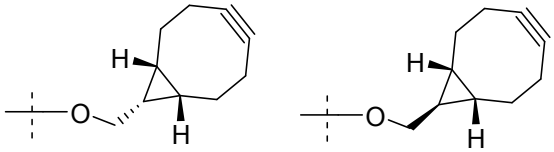
A es hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, $C(O)C_1$-C_8 alquilo, $C(O)OC_1$-C_8 alquilo, $C(O)N(H)C_1$-C_8 alquilo, R^{10}, o R^{11}, en donde el grupo alquilo es opcionalmente sustituido con 0 o 1 R^{10};

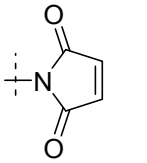
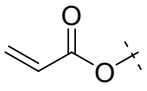
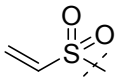
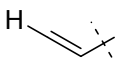
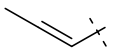
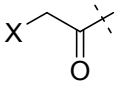
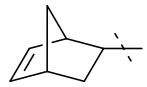
R^{10} es un grupo funcional reactivo adecuado para acoplar la Fórmula I a un portador; y R^{11} es un portador.

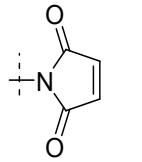
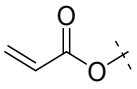
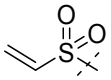
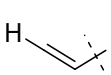
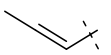
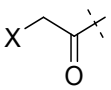
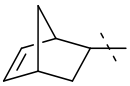
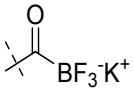
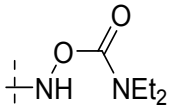
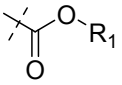
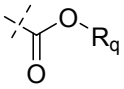
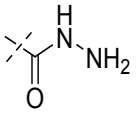
En ciertos aspectos, g y h son 1 y aproximadamente 25 o entre 1 y aproximadamente 10.

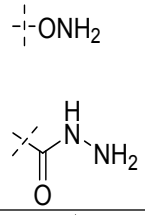
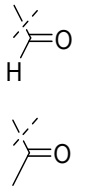
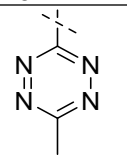
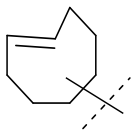
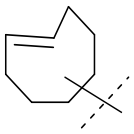
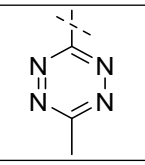
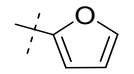
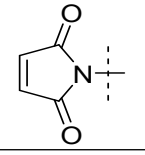
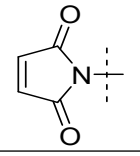
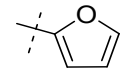
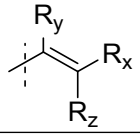
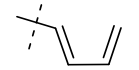
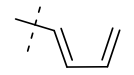
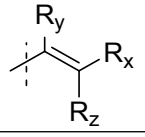
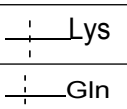
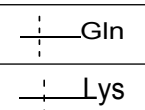
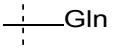
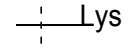
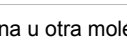
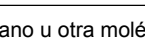
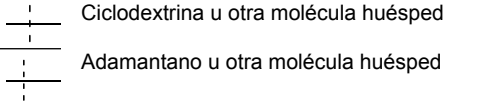
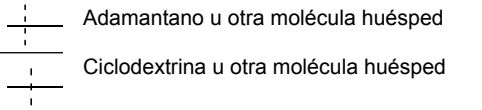
En algunos aspectos, Z de la Fórmula (I) es NR^9. En un aspecto, R^9 además está sustituido con R^{10}. En otro aspecto, R^9 además está sustituido con R^{11}.

De acuerdo con la Fórmula (I), R^{10} es un grupo funcional reactivo que es adecuado para reacciones de acoplamiento ortogonales. Los grupos funcionales reactivos adecuados son aquellos que se someten fácilmente a reacciones ortogonales. Los ejemplos no limitativos de reacciones químicas ortogonales incluyen grupos funcionales que se muestran en la Tabla 1. Para una fila dada en la Tabla 1, un grupo funcional X (columna izquierda) es adecuado para una reacción de acoplamiento con un grupo funcional Y (columna derecha). Las reacciones de acoplamiento pueden ser enlaces covalentes o complejos intermoleculares. En la mayoría de las formas de realización, la reacción de acoplamiento da como resultado un enlace covalente. En otras reacciones, como el adamantano con ciclodextrano, el acoplamiento es una asociación molecular no covalente. En un aspecto, el grupo funcional se selecciona entre azidilo, alquinilo, C_6-C_{12} ciclo alquinilo sustituido o no sustituido, C_6-C_{12} heterociclo alquinilo, C_6-C_{12} ciclo alquenilo, norbornilo, vinil carboxilo, vinil sulfonilo, C_2-C_8 alquenilo, C_1-C_8 alcoxi sustituido o no sustituido, tiol, C_1-C_8 carboxilo, C_1-C_8 carbonilo, oxiamina, carbohidrazida, maleimida, alfa-halo carbonilo, furano, tetrazinilo sustituido o no sustituido, lisina, glutamina, ciclodextrina y adamantanilo. En otro aspecto, el grupo funcional es un C_6-C_{12} ciclo alquinilo sustituido, en donde la sustitución incluye un grupo ciclopropilo fusionado. En otro aspecto, el grupo funcional es biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il. En otro aspecto, el grupo funcional es azidilo.

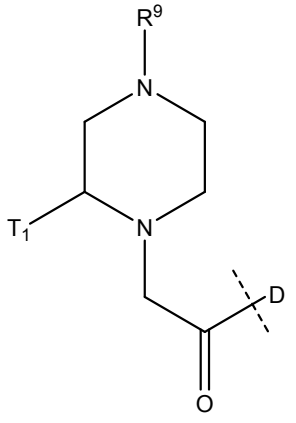
Tabla 1. Ejemplo de química ortogonal	
Compuesto (o polímero) 1-X **X:**	**Compuesto (o polímero) 2-Y** **Y:**
	
	
	
	

	       X = halógeno

       X = halógeno	
	
	 R_1 = H o Éster activado
 R_q = H o Éster activado	
 	 

En algunas formas de realización, el ligante que no deja huellas, R, comprende la Fórmula (II):

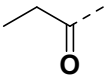
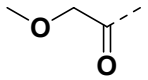
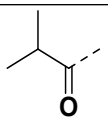
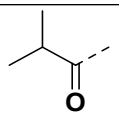
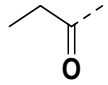
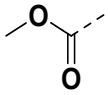
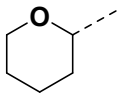
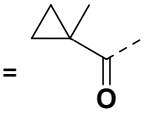
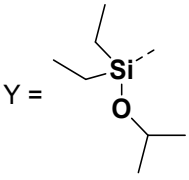
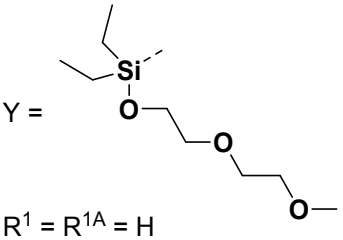
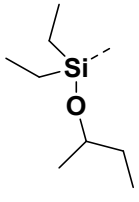
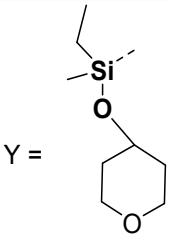
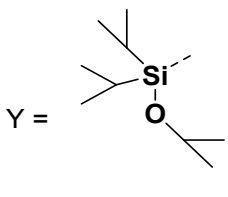
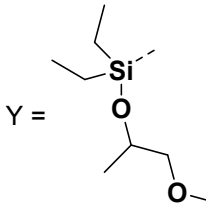


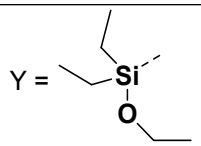
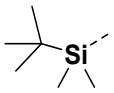
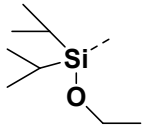
(II)

en donde, R^9 y D mantienen la definición para la Fórmula (II) precedente y T_1 comprende un éster C2-C10 sustituido o no sustituido, un sililéter C3-C10 sustituido o no sustituido que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre nitrógeno u oxígeno.

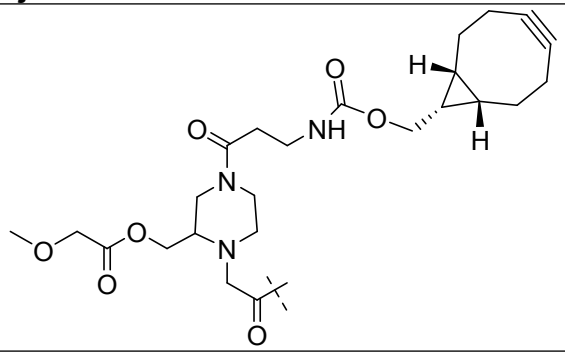
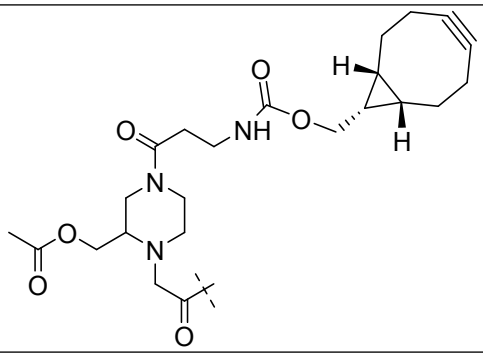
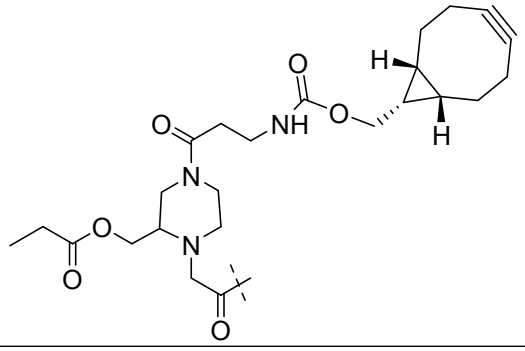
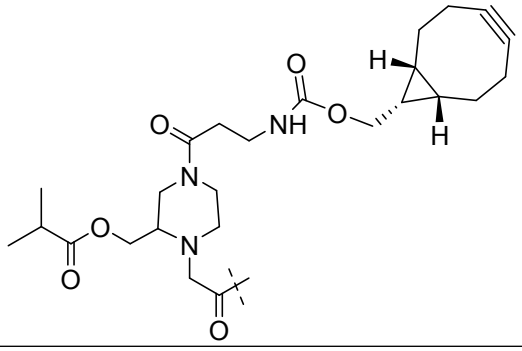
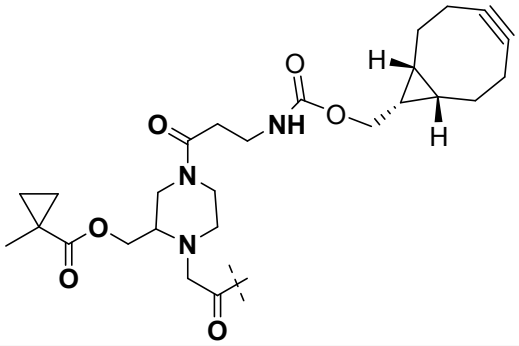
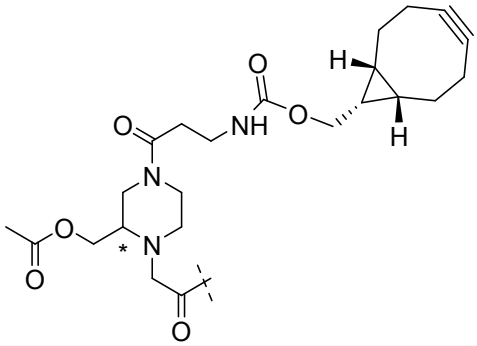
En algunos aspectos, T_1 es $-CR^1R^{1a}OY$, que contiene un resto desencadenante y comprende una de las siguientes estructuras en la Tabla 2.

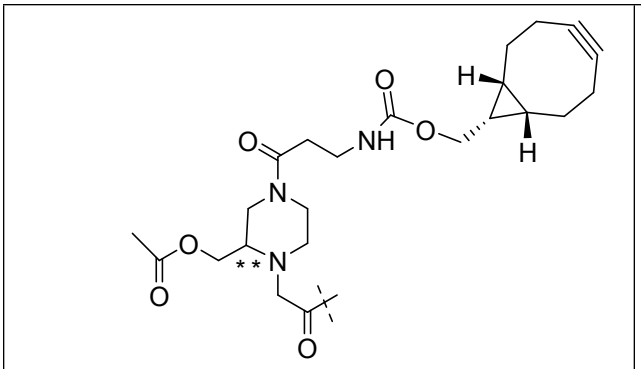
Tabla 2. Restos desencadenantes

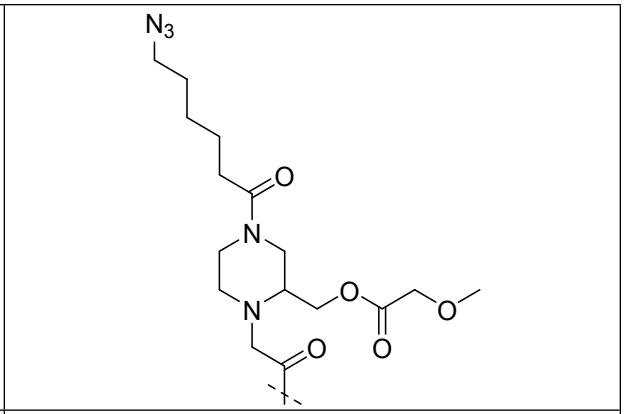
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = H$; $R^{1A} = CH_3$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = H$; $R^{1A} = CH_3$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$

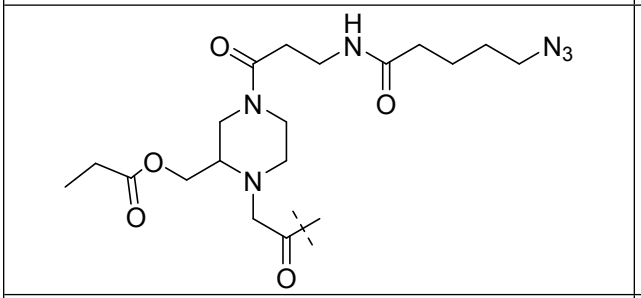
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	-

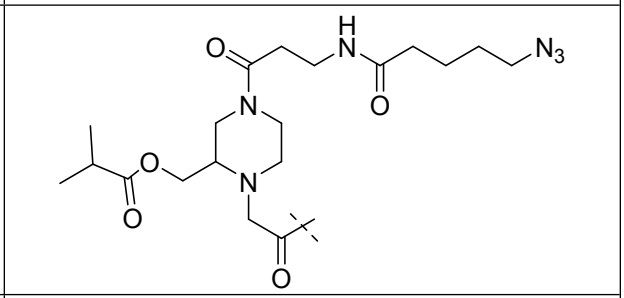
En algunas formas de realización, el ligante que no deja huellas, R, de acuerdo con la Fórmula I o II comprende cualquiera de las siguientes estructuras en la Tabla 3.

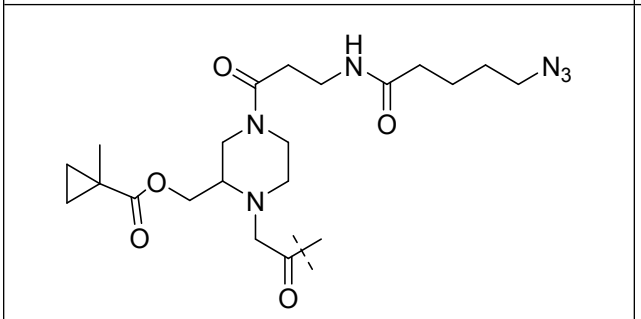
Tabla 3. Ejemplos de Ligantes que no dejan Huellas	
	
	
	

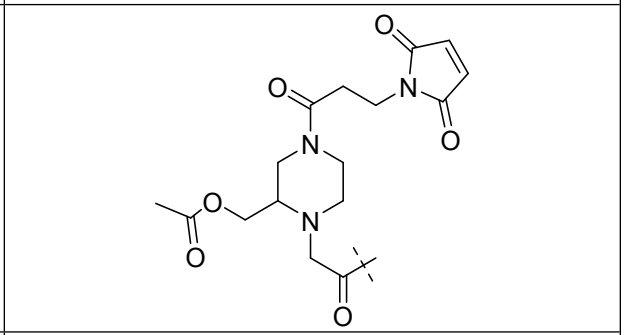


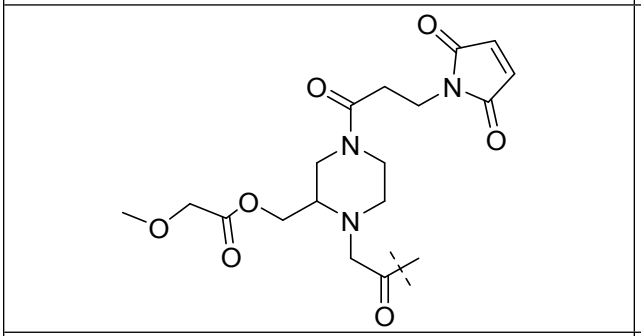


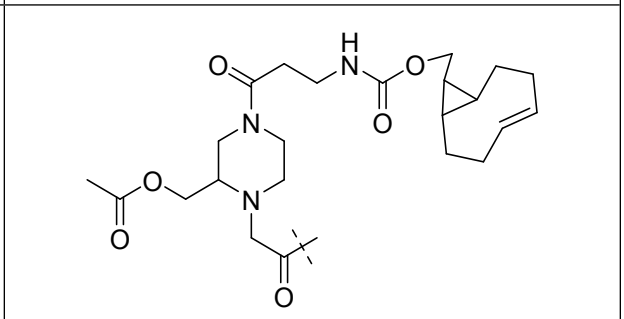


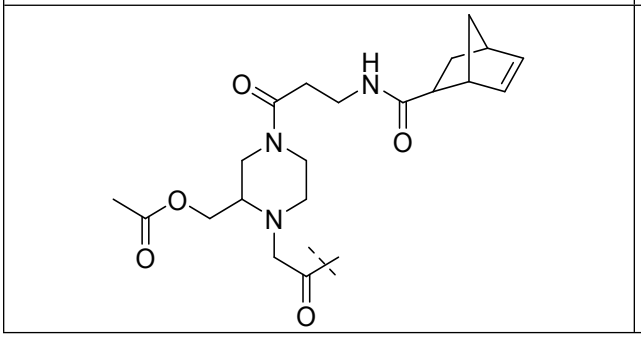


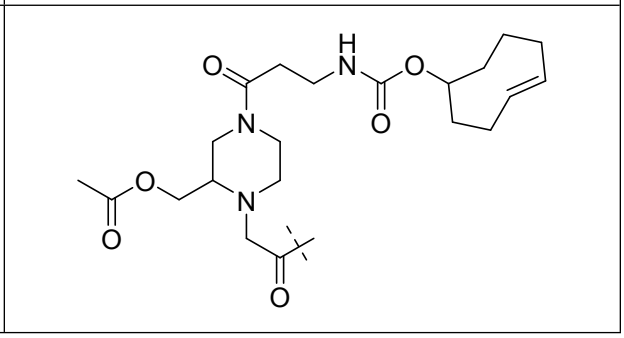


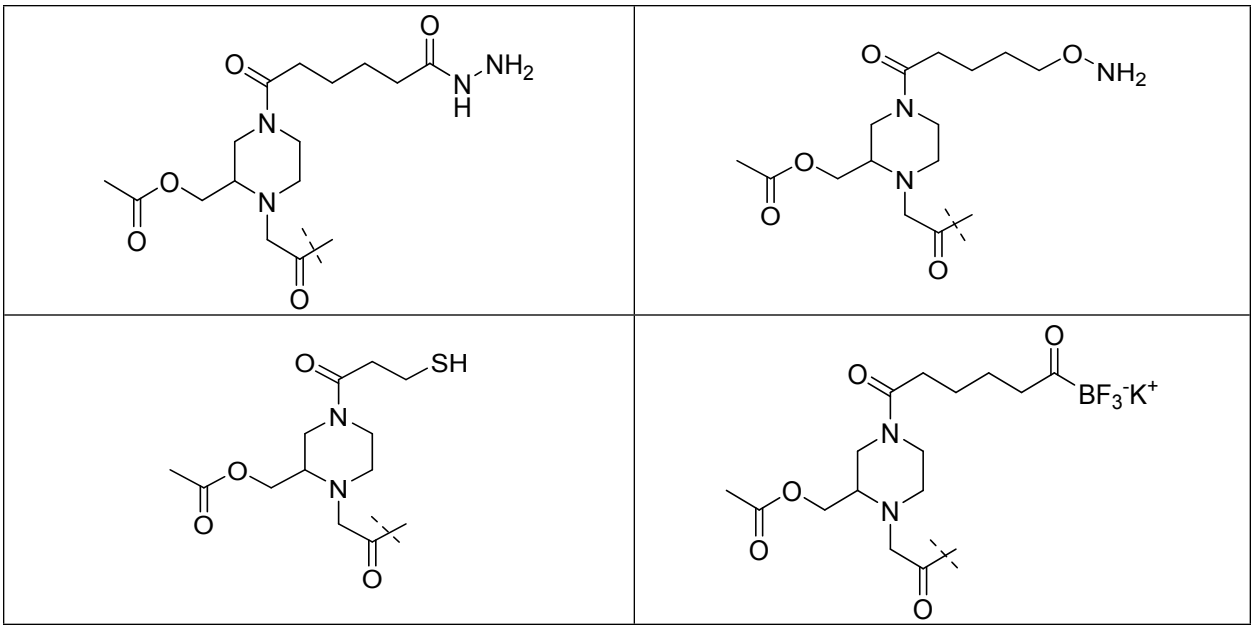






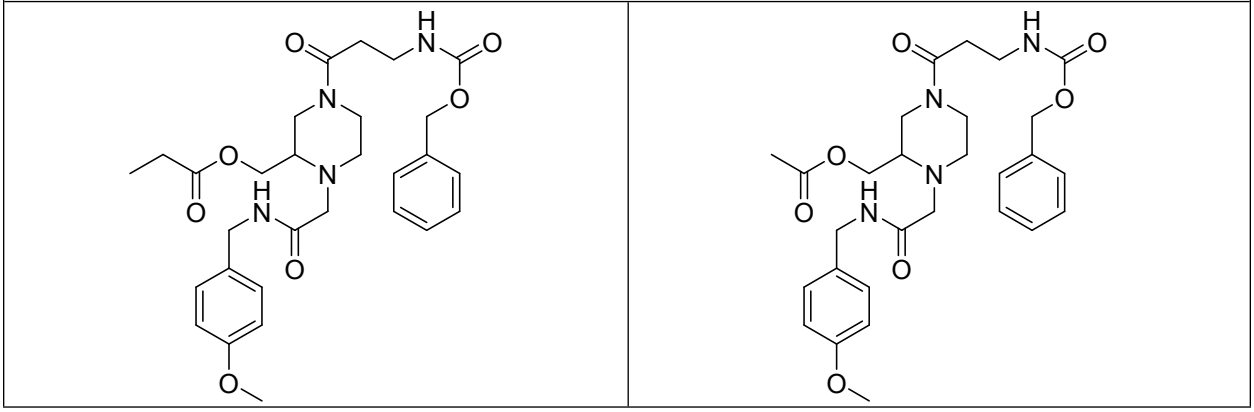


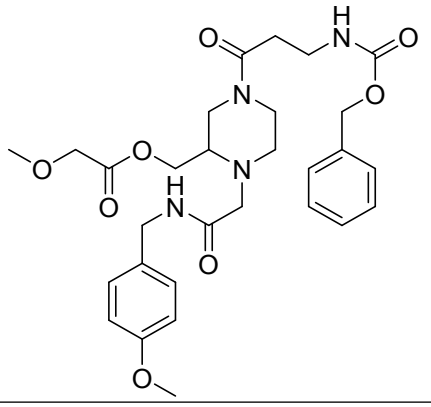
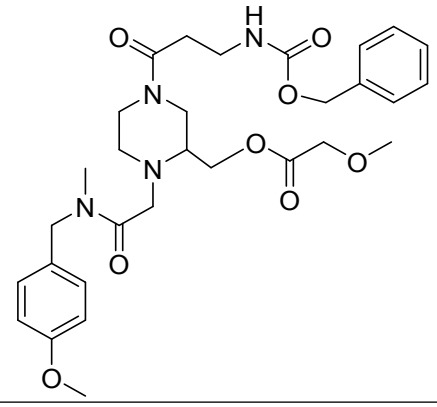
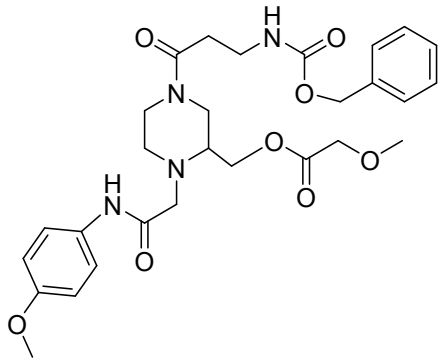
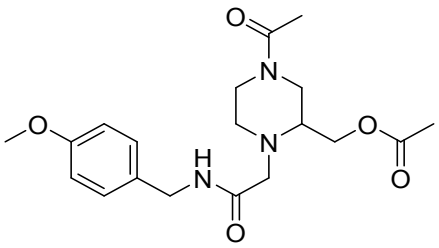
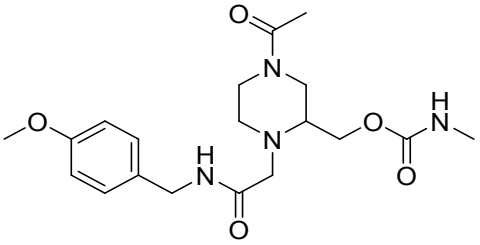
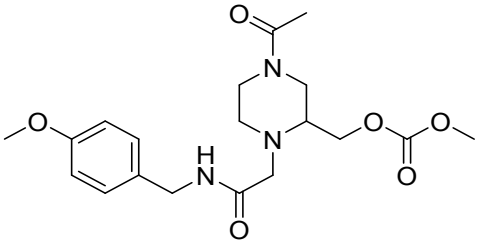
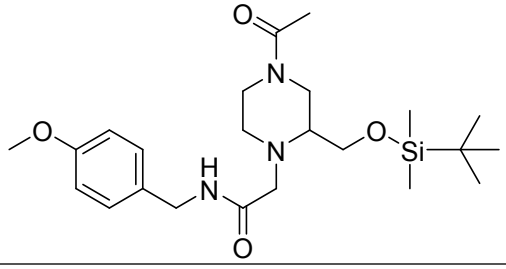
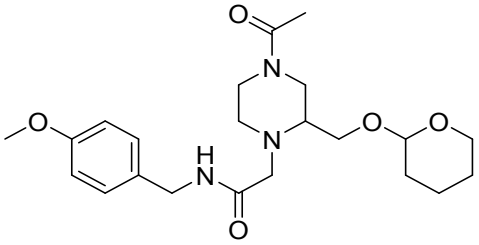
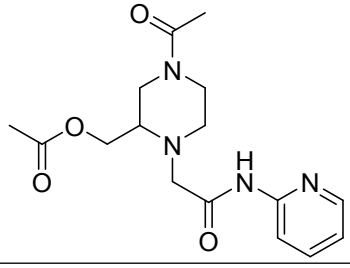
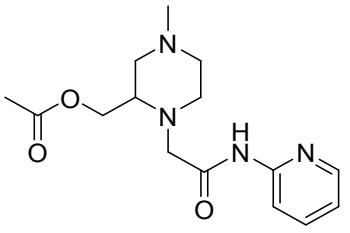


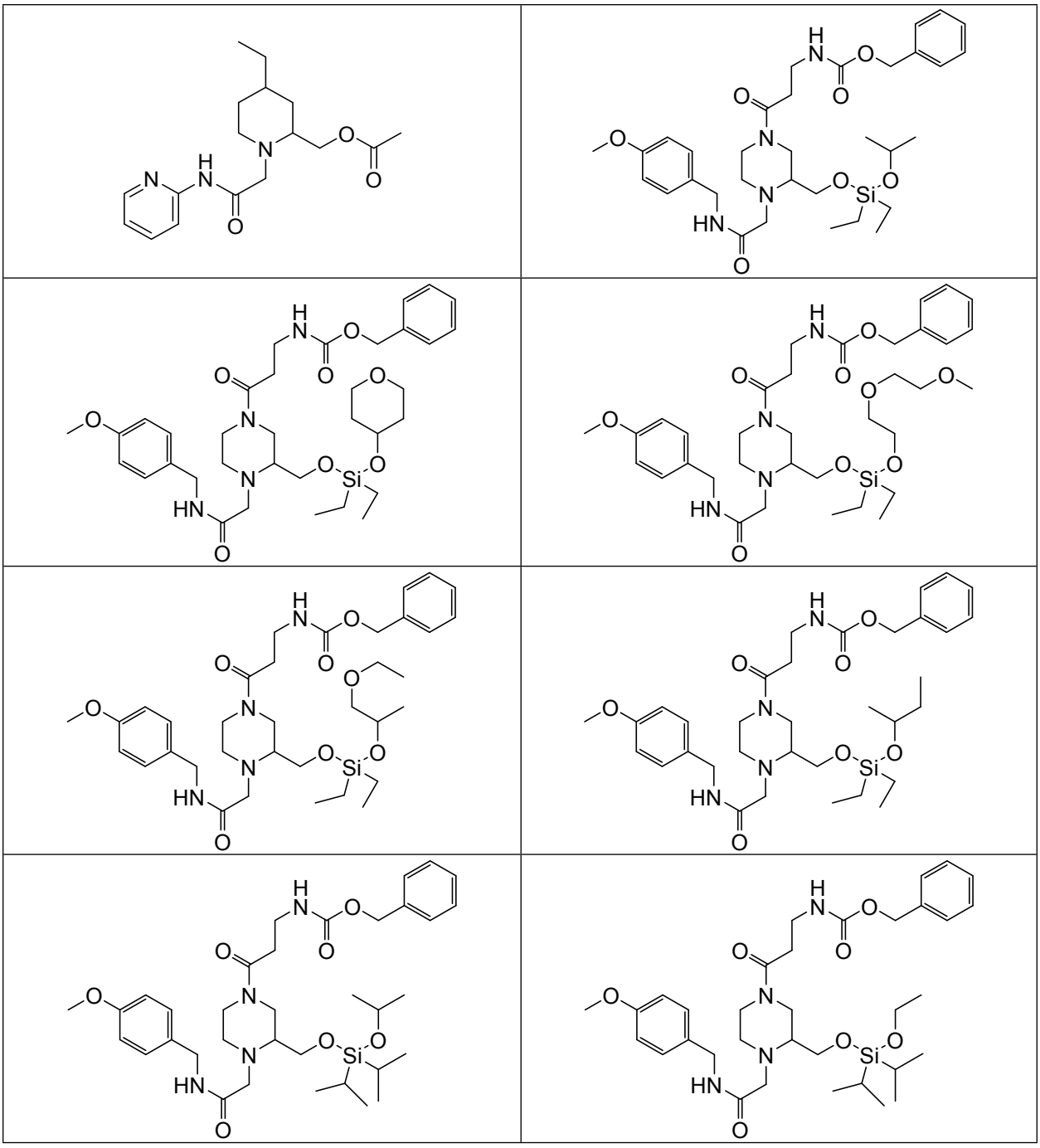


En otra forma de realización, el ligante que no deja huellas, R, de la Fórmula (I) o la Formula (II) está conjugado a un fármaco o resto bioactivo. En un aspecto, el ligante que no deja huellas conjugado a un fármaco comprende cualquiera de las siguientes estructuras en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de Ligantes que no dejan huellas





Síntesis de un Ligante que no deja huellas, R

Otra forma de realización es un método de fabricación de un ligante que no deja huellas, R, de la Fórmula (I) que comprende cualquiera de los pasos: (A) hacer reaccionar el nitrógeno N4 de un compuesto de piperazina que contiene un grupo nucleofílico en la posición C2 con un compuesto ligante de acilo funcionalizado para formar una N4-

acilpiperazina; (B) carboximetilar el nitrógeno N1 del anillo de piperazina de la N4-acilpiperazina, en donde el grupo carboxilo está unido covalentemente a un grupo protector adecuado; (C) hacer reaccionar el grupo nucleofílico de la N4-acilpiperazina con un compuesto desencadenante descripto en la presente; (D) de ser necesario, elaborar el ligante de acilo funcionalizado en N4 para contener un grupo funcional adecuado para unir el ligante que no deja huellas a un compuesto portador. En un aspecto, el grupo nucleofílico en la posición C2 del compuesto de piperazina comprende un hidroxilo. En otro aspecto, el grupo nucleófilo en la posición C2 del compuesto de piperazina es un alcohol primario. En otro aspecto, el alcohol primario presente en el compuesto de piperazina del paso (A) o (D) se conjuga con un grupo protector o grupo desencadenante adecuado. En otro aspecto, el grupo protector o grupo desencadenante comprende un éster, silil éter, acetal, carbamato, carbonato, o un compuesto que contiene disiloxano. En un aspecto, el grupo protector de éster de carboximetilo N4 se desprotege para formar un ácido carboxílico, que es adecuado para formar un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En otro aspecto, en el paso de carboximetilación, el grupo carboxilo del reactivo de carboximetilación se une covalentemente a través de un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En un aspecto, el grupo funcional del paso A es adecuado para unir el ligante que no deja huellas a un compuesto portador.

Otra forma de realización es un método de fabricación de un ligante que no deja huellas, R, de la Fórmula (I) que comprende cualquiera de los pasos: (A) carboximetilar el nitrógeno N1 de un compuesto de piperazina que contiene un grupo nucleofílico en la posición C2, en donde el grupo carboxilo está unido covalentemente a un grupo protector adecuado; (B) hacer reaccionar el nitrógeno N4 del compuesto de piperazina con un ligante alquilo funcionalizado para formar una N4-alquilpiperazina; (C) hacer reaccionar el grupo nucleofílico de la N4-alquilpiperazina con un compuesto desencadenante descripto en la presente; (D) de ser necesario, elaborar el ligante alquilo funcionalizado en N4 para que contenga un grupo funcional adecuado para unir el ligante que no deja

huellas a un compuesto portador. En un aspecto, el grupo reactivo en el compuesto de piperazina comprende un hidroxilo. En otro aspecto, el grupo nucleófilo en la posición C2 del compuesto de piperazina es un alcohol primario. En otro aspecto, el alcohol primario presente en el compuesto de piperazina del paso (A) o (D) se conjuga con un grupo protector o grupo desencadenante adecuado. En otro aspecto, el compuesto desencadenante comprende un éster, silil éter, acetal, carbamato, carbonato, o un compuesto que contiene disiloxano. En un aspecto, el grupo protector del carboximetil éster N4 se desprotege para formar un ácido carboxílico, que es adecuado para formar un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En otro aspecto, en la etapa de carboximetilación, el grupo carboxilo del reactivo de carboximetilación se une covalentemente a través de un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En un aspecto, el grupo funcional del paso A es adecuado para unir el ligante que no deja huellas a un compuesto portador.

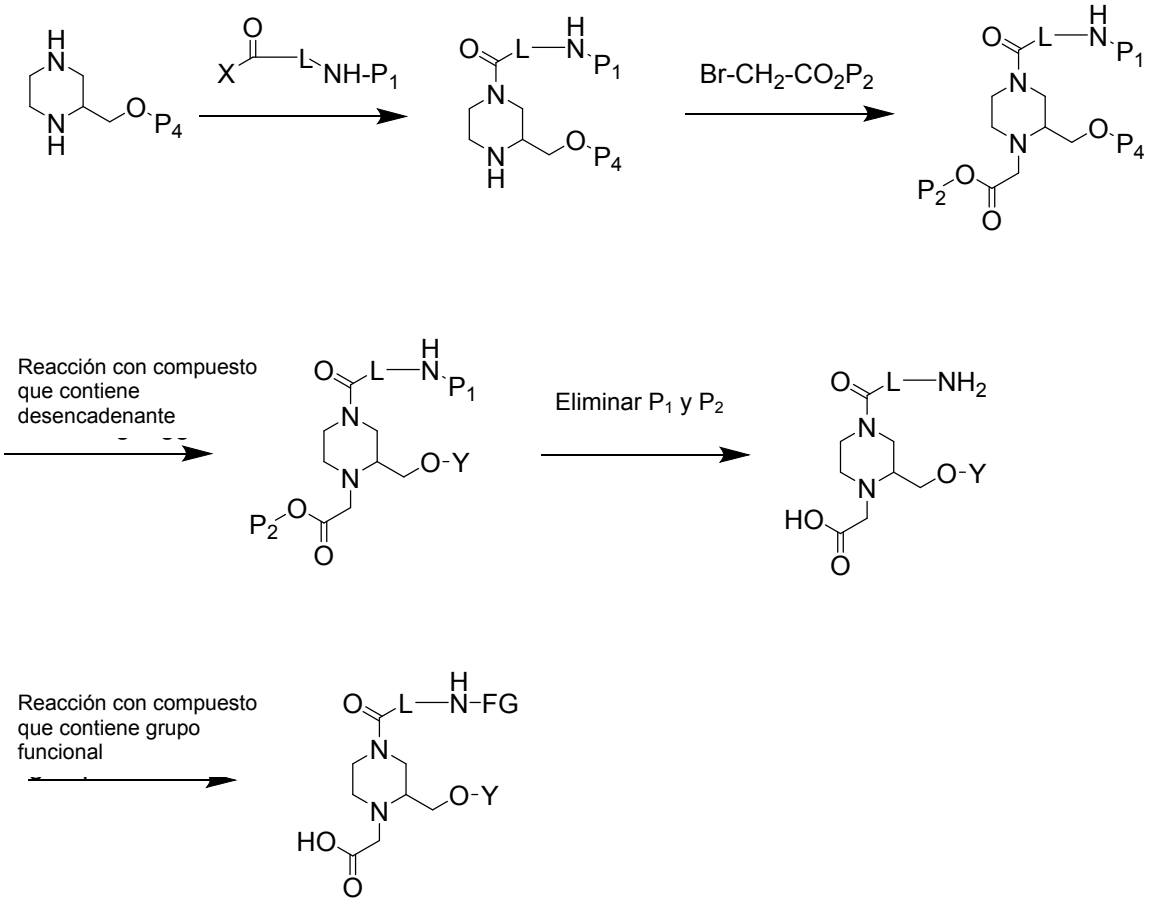
Otra forma de realización es un método de fabricación de un ligante que no deja huellas, R, de la Fórmula (I) que comprende cualquiera de los pasos: (A) introducir un ligante funcionalizado en la posición C4 de un compuesto de piridina que contiene un grupo nucleofílico en la posición C2 mediante una reacción de acoplamiento cruzado o de sustitución; (B) hidrogenar el compuesto de piridina 4-sustituido para formar un compuesto de piperidina 4-sustituido; (C) carboximetilar el nitrógeno N1 del compuesto de piperidina 4-sustituido, en donde el grupo carboxilo está unido covalentemente a un grupo protector adecuado; (D) hacer reaccionar el grupo nucleofílico del compuesto de piperidina 4-sustituido con un compuesto desencadenante descripto en la presente; (E) de ser necesario, elaborar el ligante alquilo funcionalizado en C4 para que contenga un grupo funcional adecuado para unir el ligante que no deja huellas a un compuesto portador. En un aspecto, el grupo nucleofílico en los compuestos de piridina o piperidina comprende un hidroxilo. En otro aspecto, el grupo nucleófilo en la posición C2 de los compuestos de piridina o piperidina es un alcohol primario. En otro aspecto, el compuesto desencadenante comprende un éster, silil éter, acetal, carbamato, carbonato, o un

compuesto que contiene disiloxano. En un aspecto, el grupo protector del carboximetil éster N4 se desprotege para formar un ácido carboxílico, que es adecuado para formar un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En otro aspecto, en la etapa de carboximetilación, el grupo carboxilo del reactivo carboximetilante está unido covalentemente a través de un enlace amida a un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo. En un aspecto, el grupo funcional del paso A es adecuado para unir el ligante que no deja huellas a un compuesto portador.

Los grupos protectores adecuados son restos que están conectados de forma reversible a grupos funcionales reactivos o grupos funcionales químicos para hacerlos incapaces de reaccionar con, por ejemplo, otros grupos funcionales químicos. Los ejemplos no limitativos de grupos protectores de amino incluyen un grupo fluorenilmetilenoxi (FMOC), terc-butiloxicarbonilo (BOC), carboxibencilo (Cbz) y similares. Los ejemplos no limitativos de grupos protectores de alcohol incluyen éter t-butílico, éter alílico, éter bencílico, éteres terc-butildimetilsilílicos (TBDMS), y similares. Los grupos desprotectores pueden agregarse o eliminarse según sea necesario a lo largo de la síntesis para bloquear y exponer restos particulares.

En una forma de realización, el método de fabricación de un ligante que no deja huellas está de acuerdo con los Esquemas de Reacción **1–3**. Los siguientes esquemas son esquemas generales y no limitativos para la preparación de ligantes que no dejan huellas. Según lo ilustrado en los Ejemplos de la presente algunas vías de síntesis no se ajustan específicamente a estos esquemas generales. En otro aspecto, el método de fabricación de un ligante que no deja huellas está de acuerdo con los esquemas de reacción del Ejemplo 1.

Esquema 1



en donde uno o más de los pasos que se ilustran arriba pueden ejecutarse en un orden secuencial diferente u omitirse dependiendo de los reactivos utilizados;

X es un grupo de activación que comprende Cl, O-NHS, O(C=O)-R^{2a}, o X-OH y la reacción incluye reactivos de acoplamiento de péptidos estándar tales como 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexa fluoro fosfato (HATU);

R^{2a} es C_1-C_8 alquilo o arilo;

P_4 es un grupo protector adecuado o H;

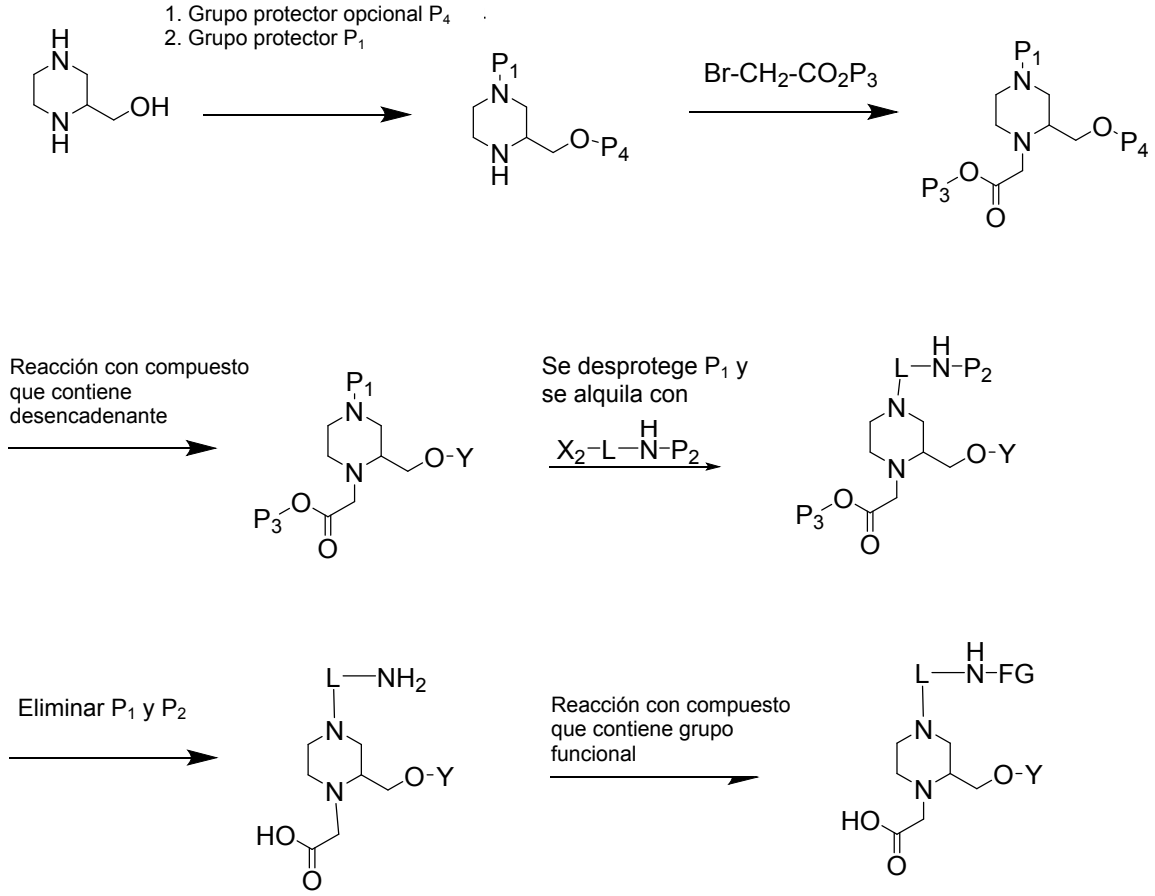
L es un ligante bivalente opcionalmente sustituido;

P_1 y P_2 son grupos protectores que pueden ser idénticos;

Y es un desencadenante adecuado provisto en la Tabla 2; y

FG comprende uno o más grupos funcionales adecuados capaces de conjugarse a un portador descripto en la presente.

Esquema 2



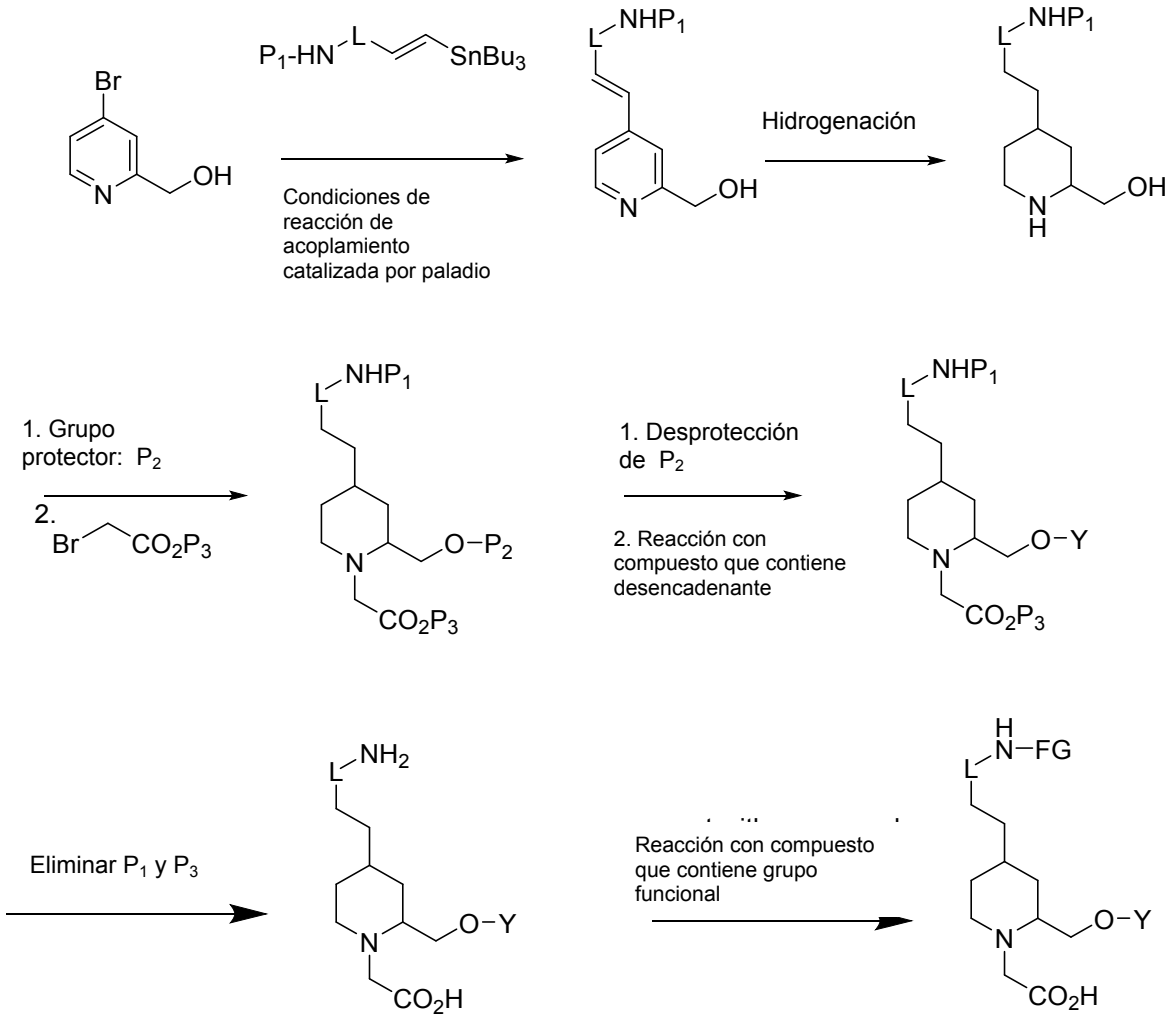
en donde uno o más de los pasos que se ilustran arriba pueden ejecutarse en un orden secuencial diferente u omitirse dependiendo de los reactivos utilizados;

donde, X_2 es un grupo de activación como Cl, Br, I, o triflato;

Y, L, P_1, P_2, P_4, y FG responden a la descripción del Esquema 1;

P_3 es un grupo protector que puede ser idéntico a P_1 y P_2.

Esquema 3



en donde uno o más de los pasos que se ilustran arriba pueden ejecutarse en un orden secuencial diferente u omitirse dependiendo de los reactivos utilizados; y

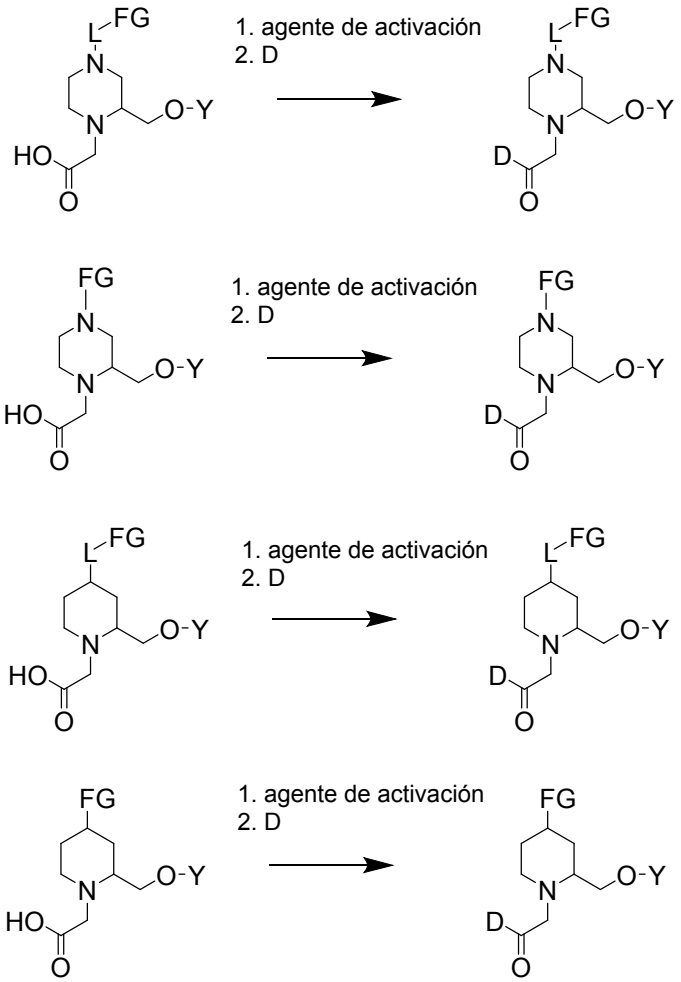
L, P_1, P_2, P_3, Y, y FG responden a lo descripto en el Esquema 2.

De acuerdo con lo descripto en la presente, el aducto D–R de la Fórmula (I) o la Formula (II) se prepara haciendo reaccionar la forma de ácido carboxílico del ligante que no deja huellas R con un grupo amino de un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo para formar un enlace amida. Este proceso está descripto en el Esquema 4. Se usa un agente activador de ácido carboxílico adecuado para promover la reacción de formación del enlace amida. Como ejemplo, el ácido carboxílico puede convertirse en una forma aminorreactiva por la acción del carbonato

de disuccinimidilo para formar un éster de NHS; el éster NHS del ligante que no deja huellas R se hace reaccionar luego con el fármaco que contiene amino D para formar el aducto D–R.

En el Esquema 4, L, Y, y FG responden a lo descripto en los Esquemas 1–3; D es un agente biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria o secundaria o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo.

Esquema 4



Una forma de realización descripta en la presente es un ligante que no deja huellas, R, de la Fórmula (I) o la Fórmula (II) unido a una composición portadora a través de un ligante que tiene uno o más grupos funcionales. En un aspecto, la composición portadora comprende R^{11} de un ligante que no deja huellas de acuerdo con lo descripto en la presente. En un aspecto, R^{11} comprende un polímero, biopolimero o polietilenglicol

conectado a R^8 o R^9 a través de un ligante. En un aspecto, la composición portadora es un hidrogel. En un aspecto, la composición de hidrogel comprende ácido hialurónico, polietilenglicol, polipropilenglicol, óxido de polietileno, poliglutamato, polilisina, ácido polisálico, alcohol polivinílico, poliacrilato, polimetacrilato, copolímeros de poliacrilato/polimetacrilato, poliacrilamida, polimetacrilamida, polivinilpirrolidona, polioxazolina, poliiminocarbonato, poliaminoácidos, poliésteres hidrófilos, poliamida, poliuretano, poliurea, dextrano, agarosa, xilano, manano, carragenano, alginato, gelatina, colágeno, albúmina, celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietil almidón, quitosano, ácidos nucleicos, derivados de los mismos, copolímeros de los mismos, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, R^{11} comprende una nanopartícula o una superficie molecular. En un aspecto, el hidrogel comprende ácido hialurónico o polietilenglicol. En otro aspecto, R^{11} comprende un hidrogel reticulado de ácido hialurónico o polietilenglicol. En un aspecto, donde el sistema de administración de fármacos se utiliza en el ojo o en las articulaciones sinoviales, R^{11} comprende ácido hialurónico o ácido hialurónico reticulado.

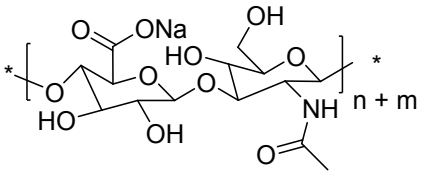
De acuerdo con lo descripto en la presente, las composiciones portadoras R^{11} se pueden reticular para unir múltiples moléculas juntas y facilitar la formación del hidrogel. La reticulación se puede lograr utilizando cualquier medio conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Liu et al., *Chem. Commun.* 51, (2015). En una forma de realización descripta en la presente, el ácido hialurónico o polietilenglicol son funcionalizados con uno o más grupos funcionales indicados en la Tabla 1 para proporcionar grupos funcionales reactivos para la reticulación. En otro aspecto, el ácido hialurónico o polietilenglicol son funcionalizados con un grupo funcional seleccionado entre azidilo, alquinilo, C7-C12 ciclo alquinilo sustituido o no sustituido, C_7-C_{12} ciclo alquenilo, C7-C12 heterociclo alquinilo sustituido o no sustituido, vinil carboxilo, vinil sulfonilo, C_2-C_8 alquenilo, amino, tiol, C_1-C_8 carboxilo, C_1-C_8 carbonilo, oxiamina, carbohidrazida, maleimida, alfa-halo carbonilo, furano, tetrazinilo sustituido o no sustituido, lisina, glutamina, ciclodextrina, y adamantanilo. En otro aspecto, el ácido hialurónico está funcionalizado con un grupo azidilo.

El grado de funcionalización puede determinar la porosidad del hidrogel. En un aspecto, entre aproximadamente 5% y aproximadamente 50% del polímero portador está

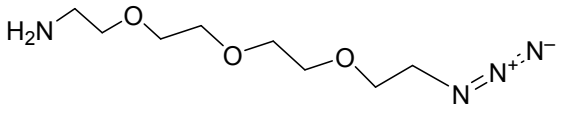
funcionalizado, incluidos todos los enteros dentro del rango especificado. En un aspecto, el polímero portador está funcionalizado aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, o aún más.

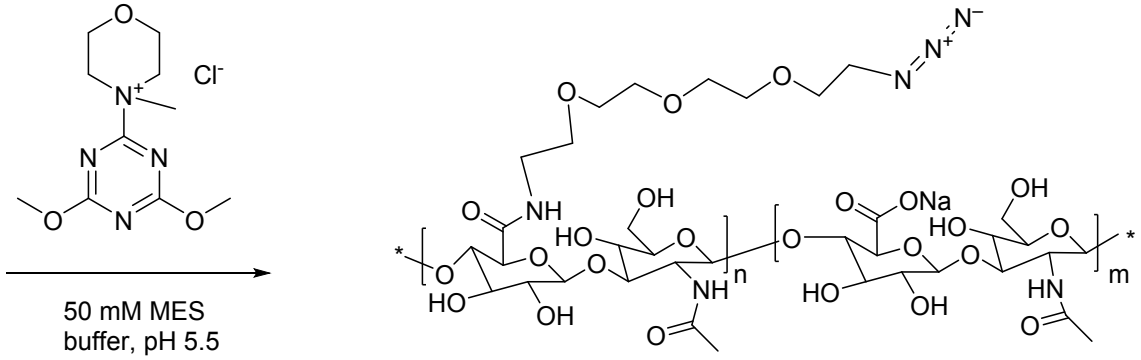
En un aspecto, el portador es ácido hialurónico. En otro aspecto, el ácido hialurónico se hace reaccionar con cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolin-4-io (Número de Registro CAS 3945-69-5) y 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etanamina (Número de Registro CAS 134179-38-7) para formar un ácido hialurónico funcionalizado con azida ([HA-N_3]). En un aspecto, la reacción es:

.



Ácido hialurónico, sal de sodio (HA)





[HA-N_3]

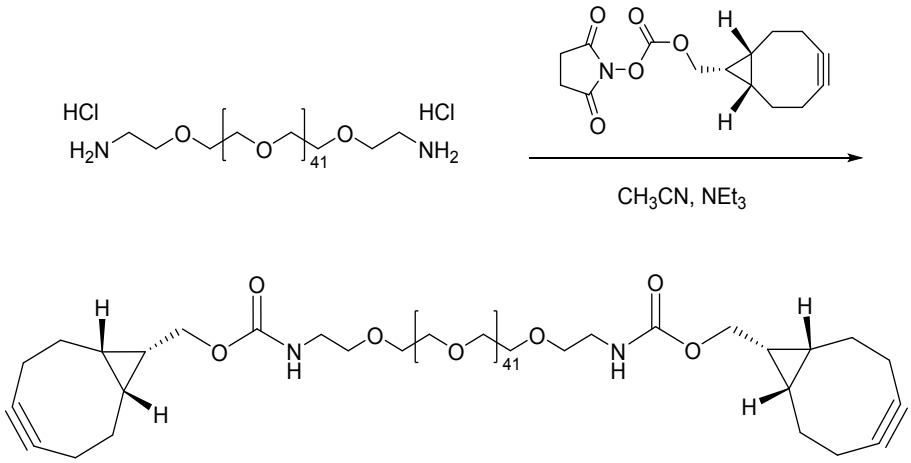
Las condiciones experimentales están descriptas en el Ejemplo 3. En un aspecto, aproximadamente 5% y aproximadamente 50% del ácido hialurónico está funcionalizado, incluyendo todos los enteros dentro del rango especificado. En un aspecto, el ácido hialurónico está funcionalizado aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%,

aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, o aún más.

En otra forma de realización, el polietilenglicol está funcionalizado con varios reactivos para formar reticuladores para enlazar los monómeros de ácido hialurónico funcionalizado según se ha expuesto.

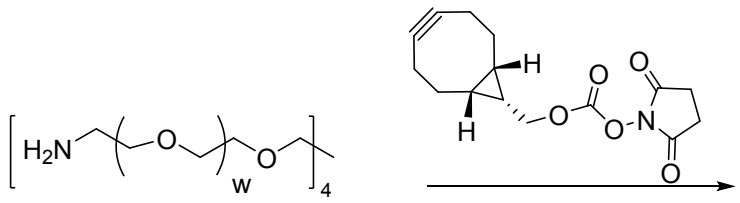
Síntesis del reticulador PEG-BCN de 2 brazos de 2kDa

En un aspecto, se hace reaccionar polietilen glicol diamina clorhidrato M_n ~ 2 kDa según lo ilustrado. Las condiciones de reacción están descriptas en el Ejemplo 4.

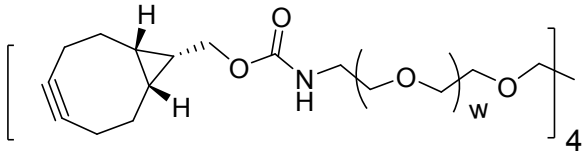


Síntesis del reticulador PEG-BCN de 4 brazos de 10 kDa

En otro aspecto, se hace reaccionar polietilen glicol amina clorhidrato de cuatro brazos M_n ~ 10 kDa (núcleo de pentaeritritol, JenKem Technology) se hace reaccionar según lo ilustrado. Las condiciones de reacción están descriptas en el Ejemplo 4.

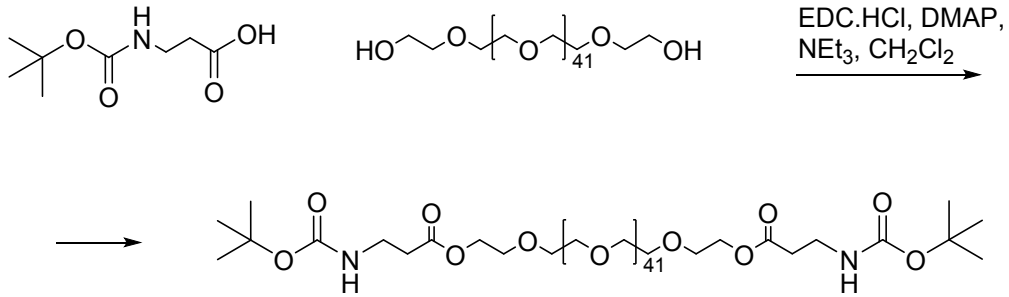


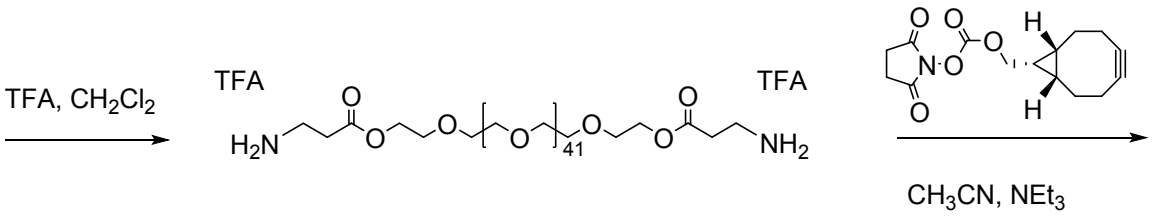
Sal de HCl, w ~ 56,
núcleo de pentaeritritol
JenKem

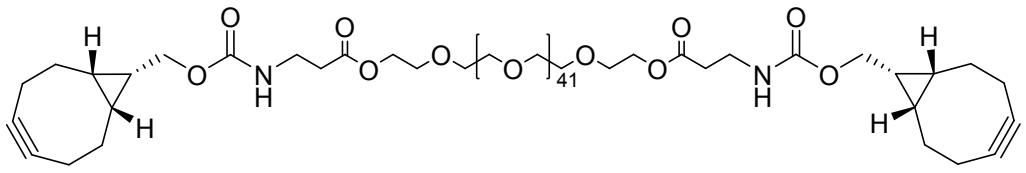


Síntesis del reticulador PEG-BCN Beta-alanina de 2 brazos de 2kDa

En otro aspecto, polietilen glicol M_n ~ 2 kDa y ácido 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoico se hacen reaccionar según lo ilustrado. Las condiciones de reacción están descriptas en el Ejemplo 4.



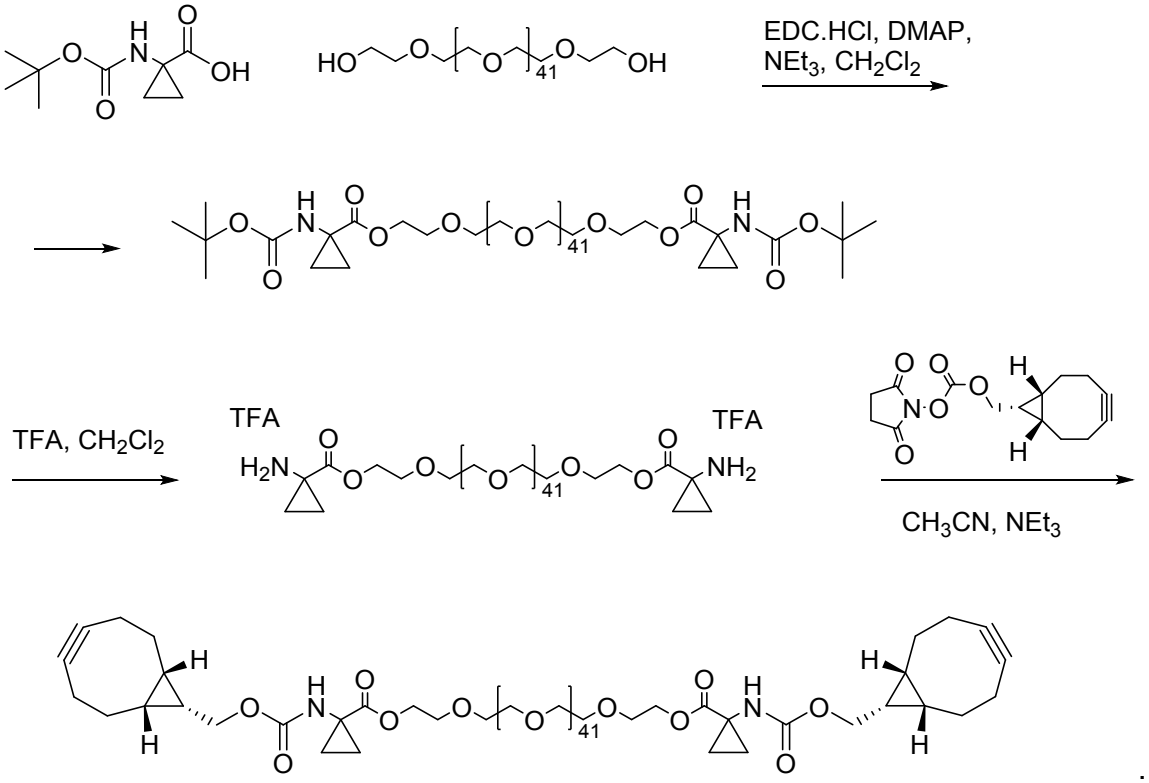




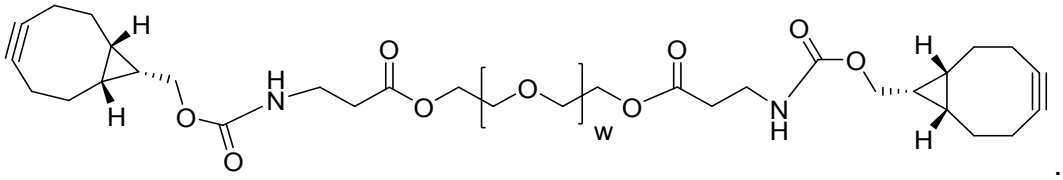
.

Síntesis de reticulador PEG-BCN de ácido aminociclopropanocarboxílico de 2 brazos, 2kDa

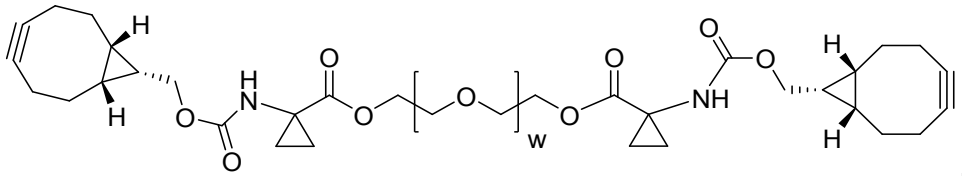
En otro aspecto, Polietilen glicol Mn ~ 2 kDa y ácido 1-((terc-butoxicarbonil)amino)ciclopropano-1-carboxílico se hacen reaccionar según lo ilustrado. Las condiciones de reacción están descriptas en el Ejemplo 4.



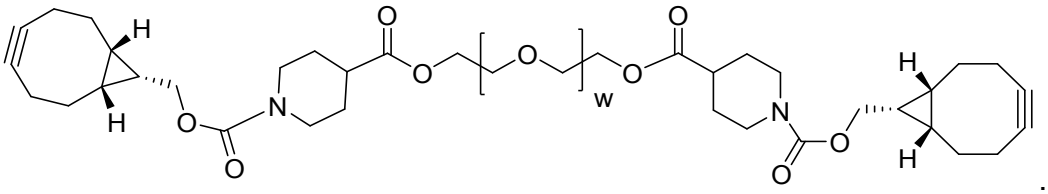
Otra forma de realización descripta en la presente es uno o más agentes de reticulación. En un aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula V:



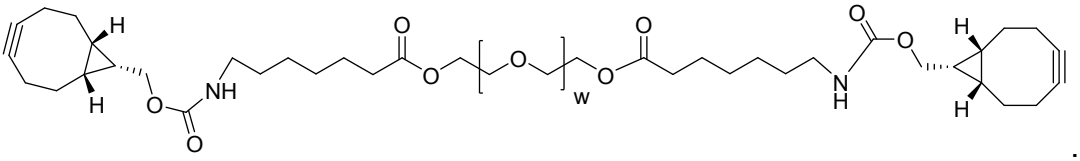
En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VI:



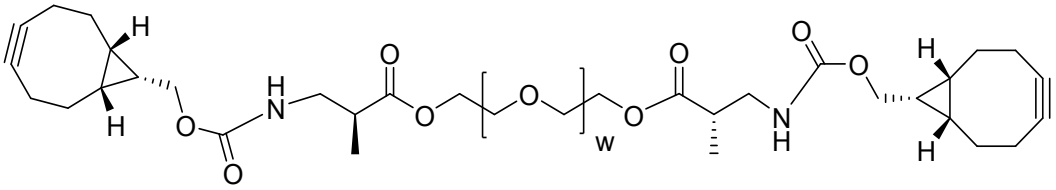
En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VIa:



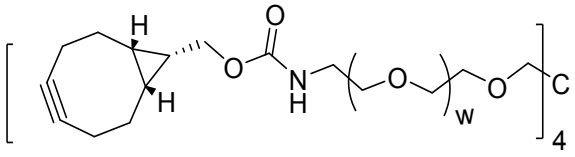
En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VIb:



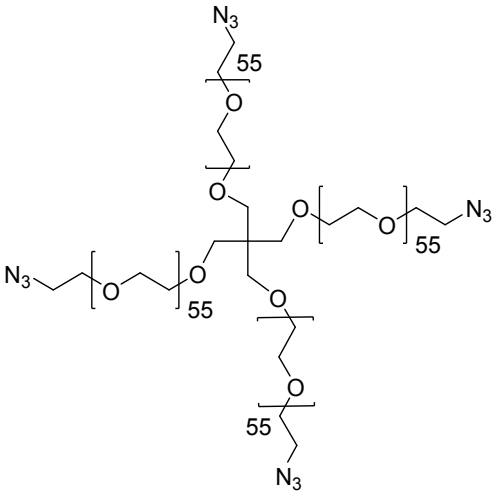
En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VIc:



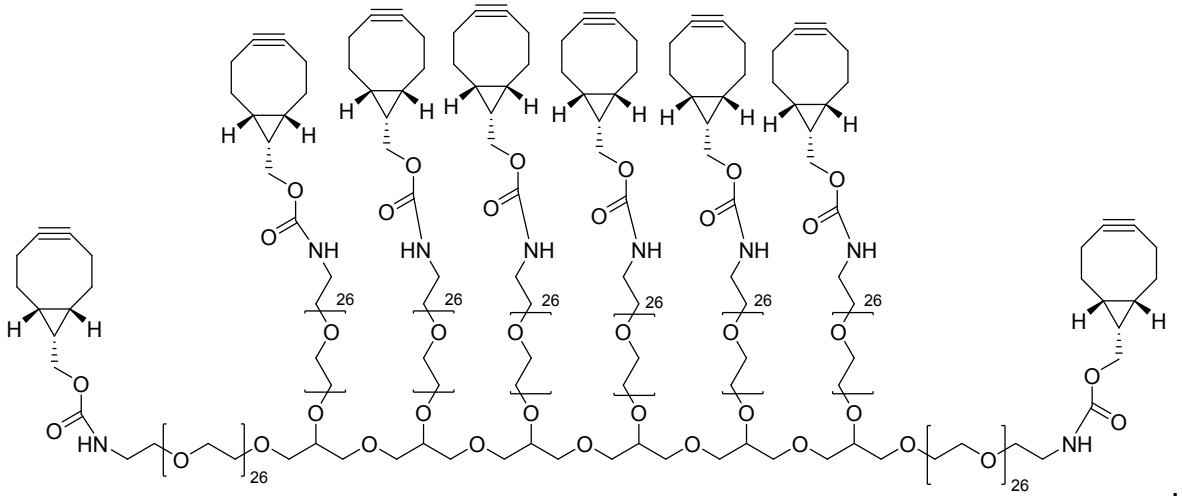
En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VII:



En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula VIII:

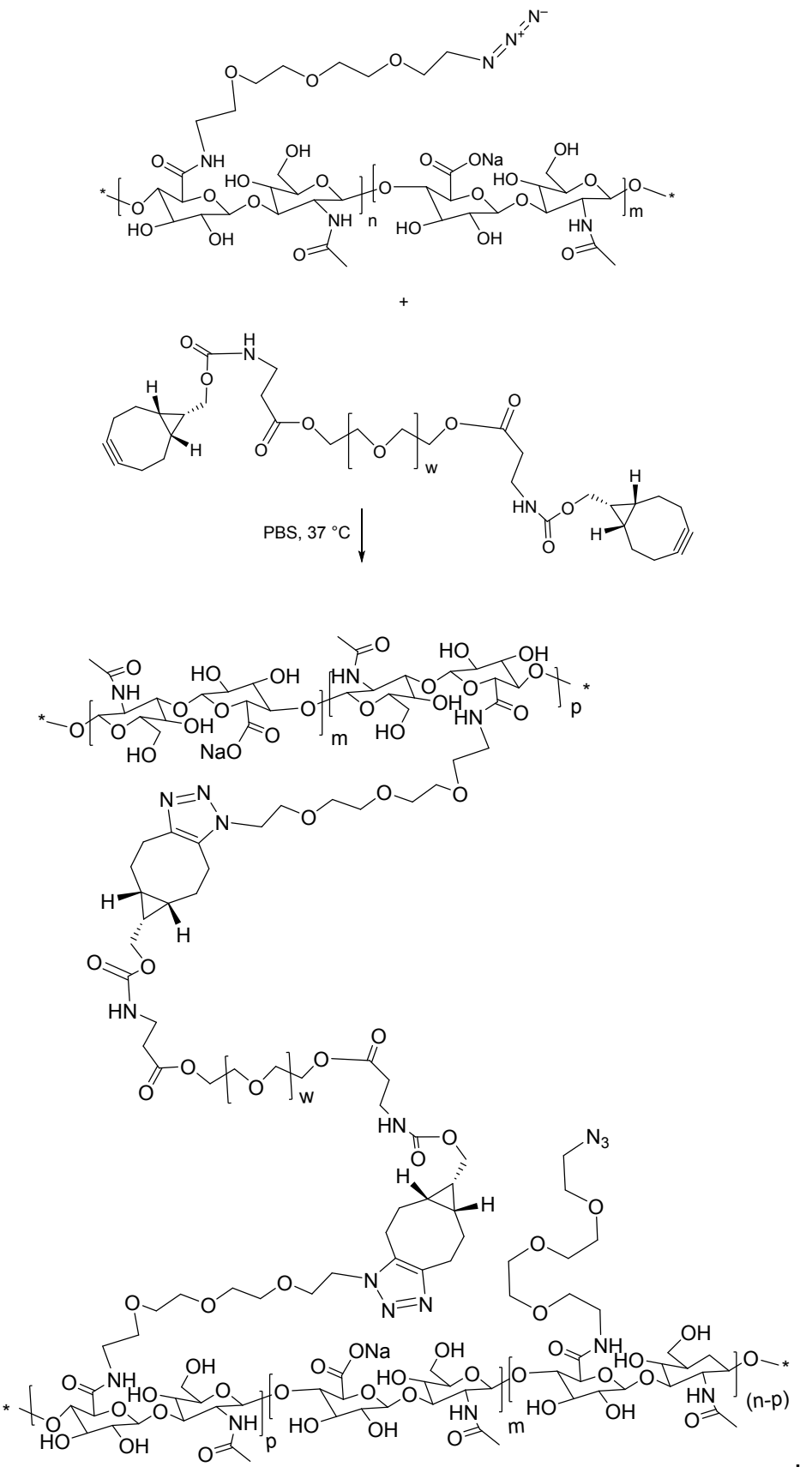


En otro aspecto, el agente de reticulación comprende la Fórmula IX:



En otra forma de realización descripta en la presente, R^{11} comprende un portador funcionalizado que se ha hecho reaccionar con uno o más agentes de reticulación para formar un portador reticulado. En una forma de realización, el portador reticulado forma un hidrogel. En un aspecto, el portador reticulado es ácido hialurónico que se ha funcionalizado y reticulado con uno o más reticuladores de polietilenglicol de acuerdo con lo descripto en la presente para formar un hidrogel.

En una forma de realización, se puede preparar un portador reticulado que comprende ácido hialurónico haciendo reaccionar polímeros funcionalizados apropiadamente según lo ilustrado:

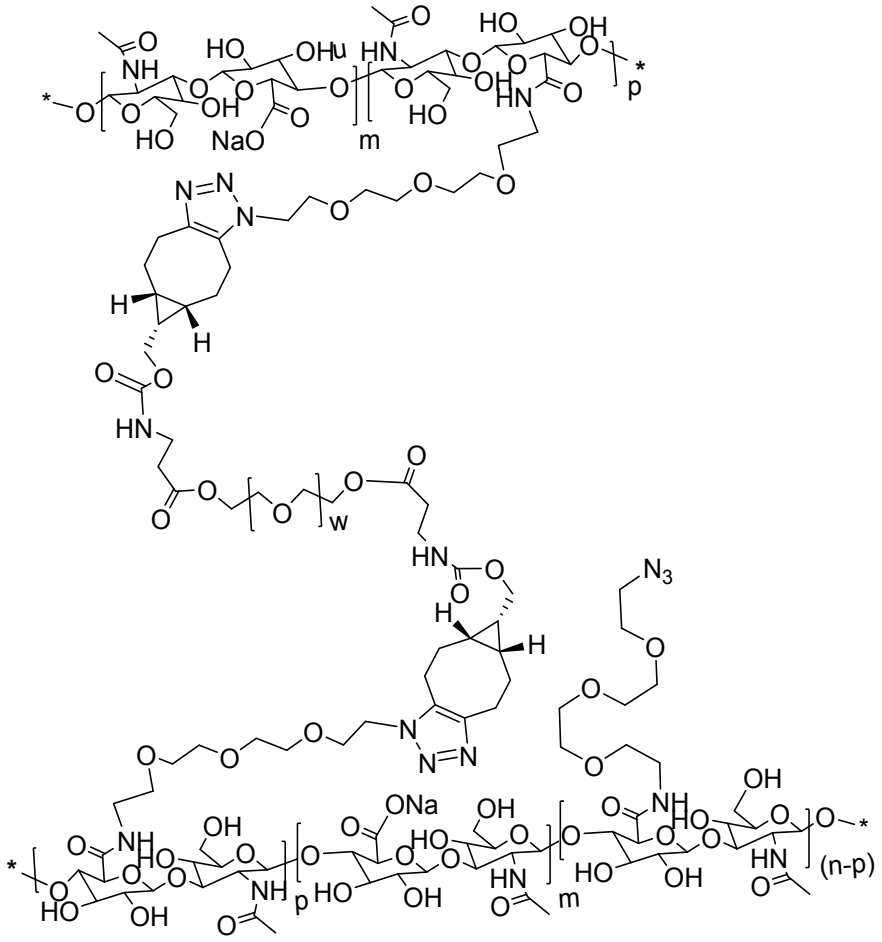

PBS, 37 °C
(n-p)

Sin limitarnos a ningún ejemplo específico y a título ilustrativo, en una forma de realización, se usa sal sódica de ácido hialurónico del proveedor, Lifecore Biomedical (HA200K, Chaska, MN) que tiene un peso molecular promedio nominal que varía de un lote a otro de 151 a 300 kDa, según lo determinado por viscosimetría. A los fines de la presente exposición, una molécula de sal de sodio de ácido hialurónico con un peso molecular promedio nominal supuesto de 200 kDa estaría compuesta por un promedio de aproximadamente 500 unidades de monómero. En esta y en las siguientes estructuras, la unidad de monómero no modificado se define como "m", la unidad de monómero modificada con un grupo azido como "n", la unidad de monómero azido conjugada con la molécula de reticulación como "p" y la unidad de monómero azido conjugada con el aducto de fármaco-ligante que no deja huellas como "q" para una cadena polimérica que comprende ≈500 unidades de monómero, (n + m + p + q ≈ 500). Si el porcentaje de modificación de la molécula de sal de sodio de ácido hialurónico es del 25%, entonces m = 75% y (n + p + q) = 25% .

Del mismo modo, la unidad PEG presente en una forma de realización del reticulador deriva de un PEG inicial descripto como con un peso molecular promedio nominal de 2 kDa, y que consistiría en aproximadamente 44 unidades monoméricas de PEG repetidas, descriptas en estas estructuras ilustradas como "w".

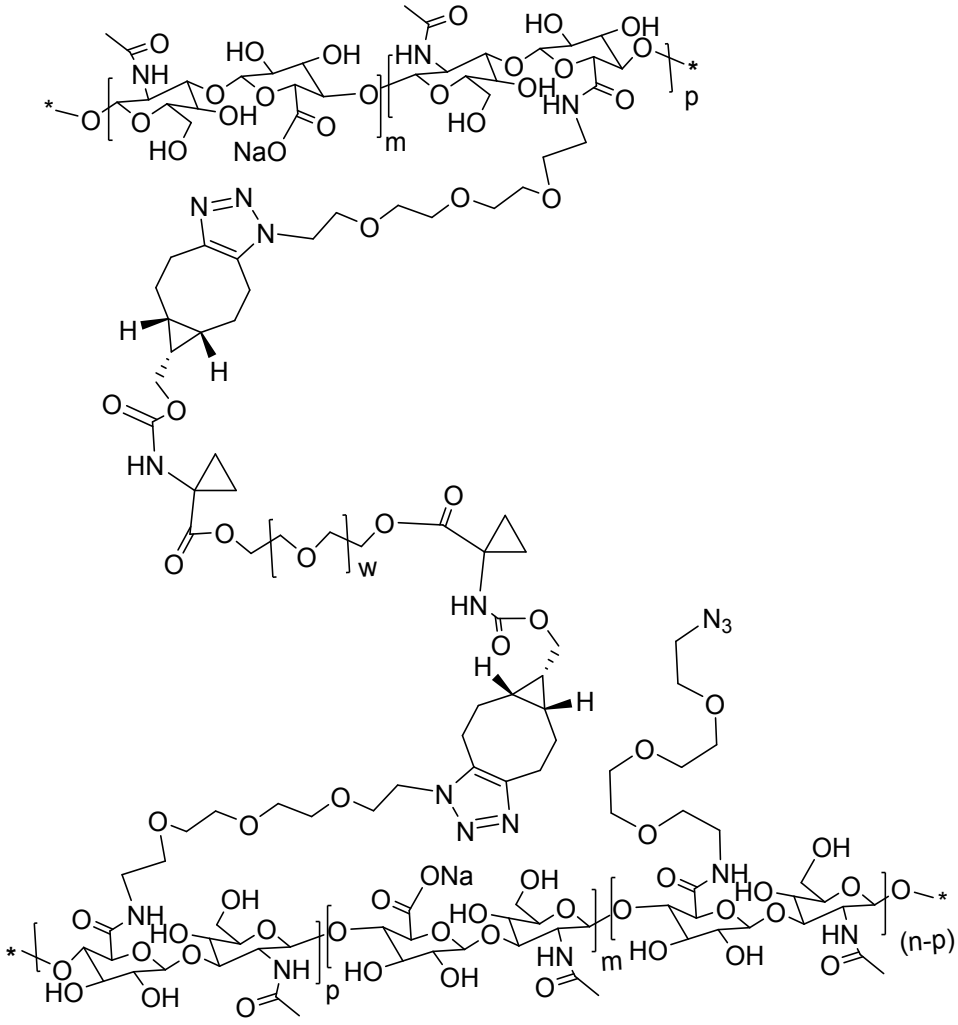
En las siguientes Fórmulas, en una forma de realización, la suma de la unidad repetitiva de disacárido no modificado de ácido hialurónico (m) más la unidad repetitiva de disacárido modificado de ácido hialurónico (n + p + q) en una distribución aleatoria (= m + n + p + q) puede comprender aproximadamente 500 unidades para un peso molecular promedio nominal determinado por viscosimetría de aproximadamente 200 kDa. Esto se aplica a las Fórmulas X a XXII.

En un aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula X:



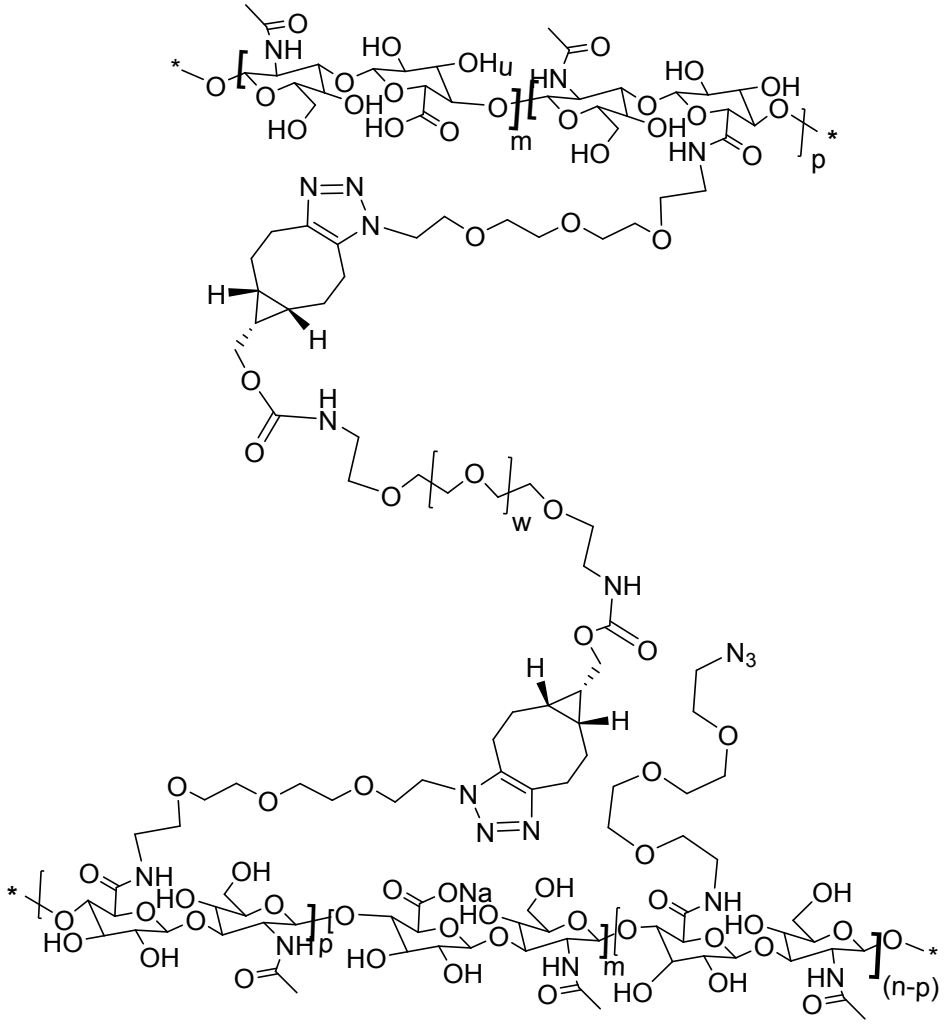
(X).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XI:



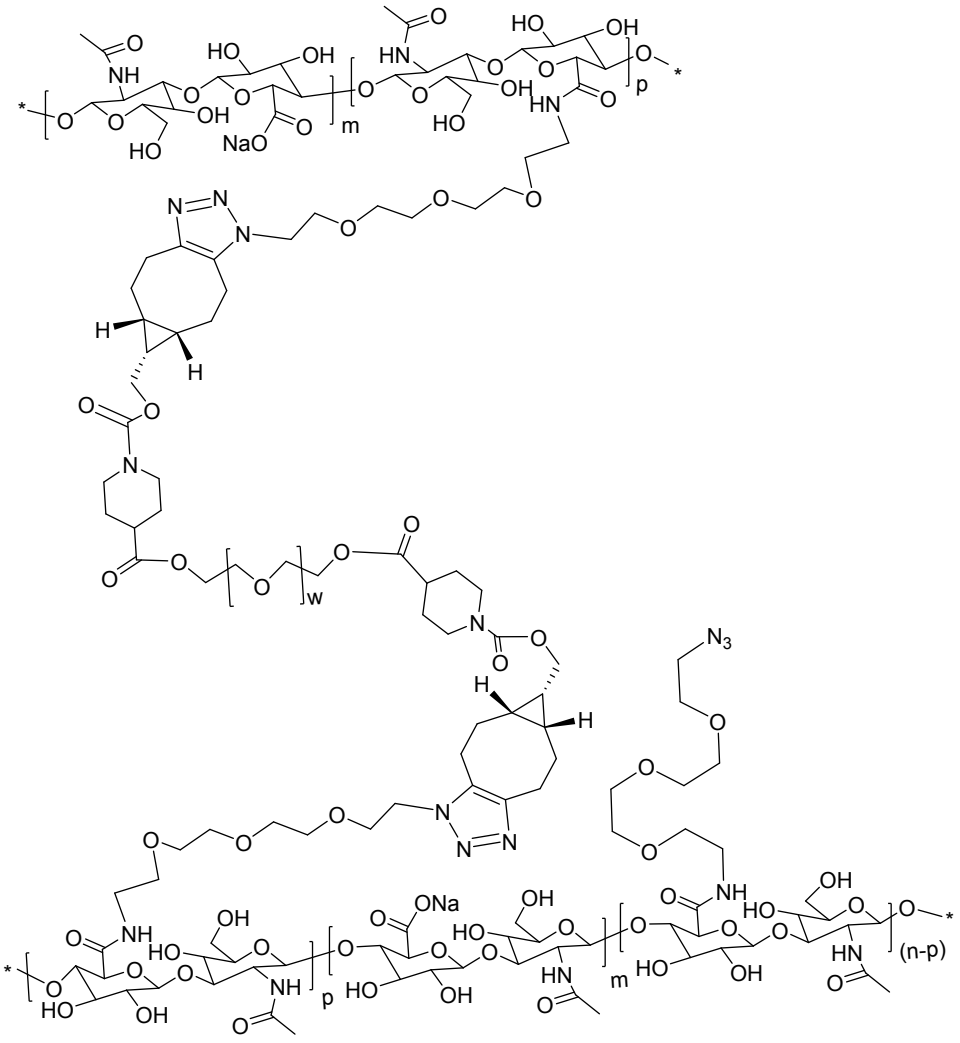
(XI).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XII:



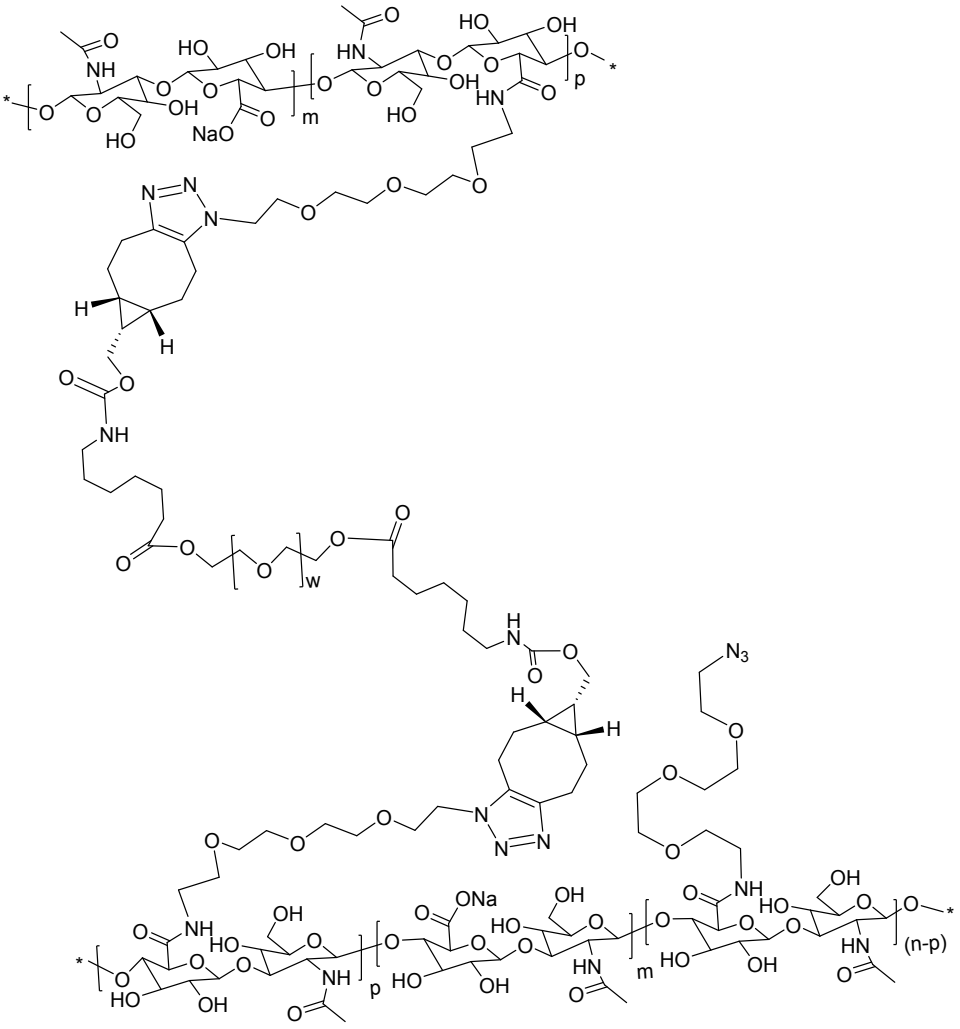
(XII).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XIIa:



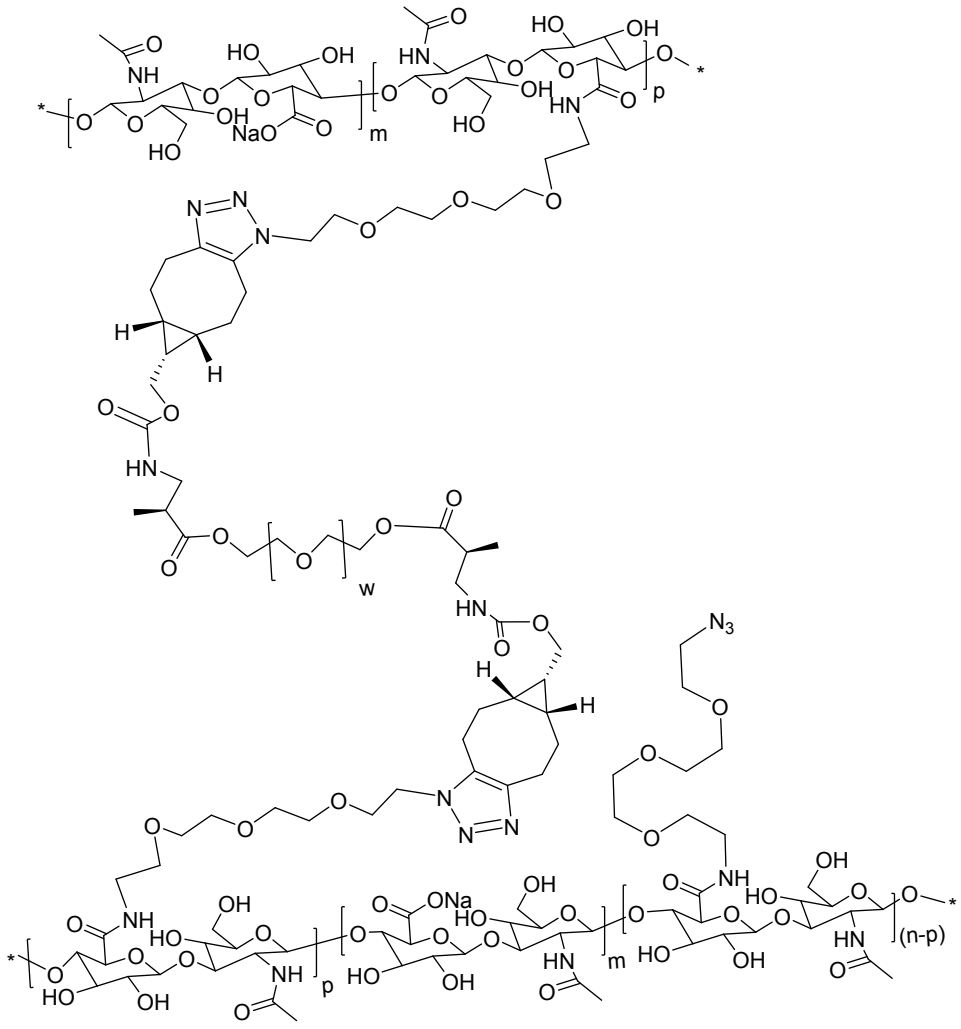
(XIIa).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XIIb:



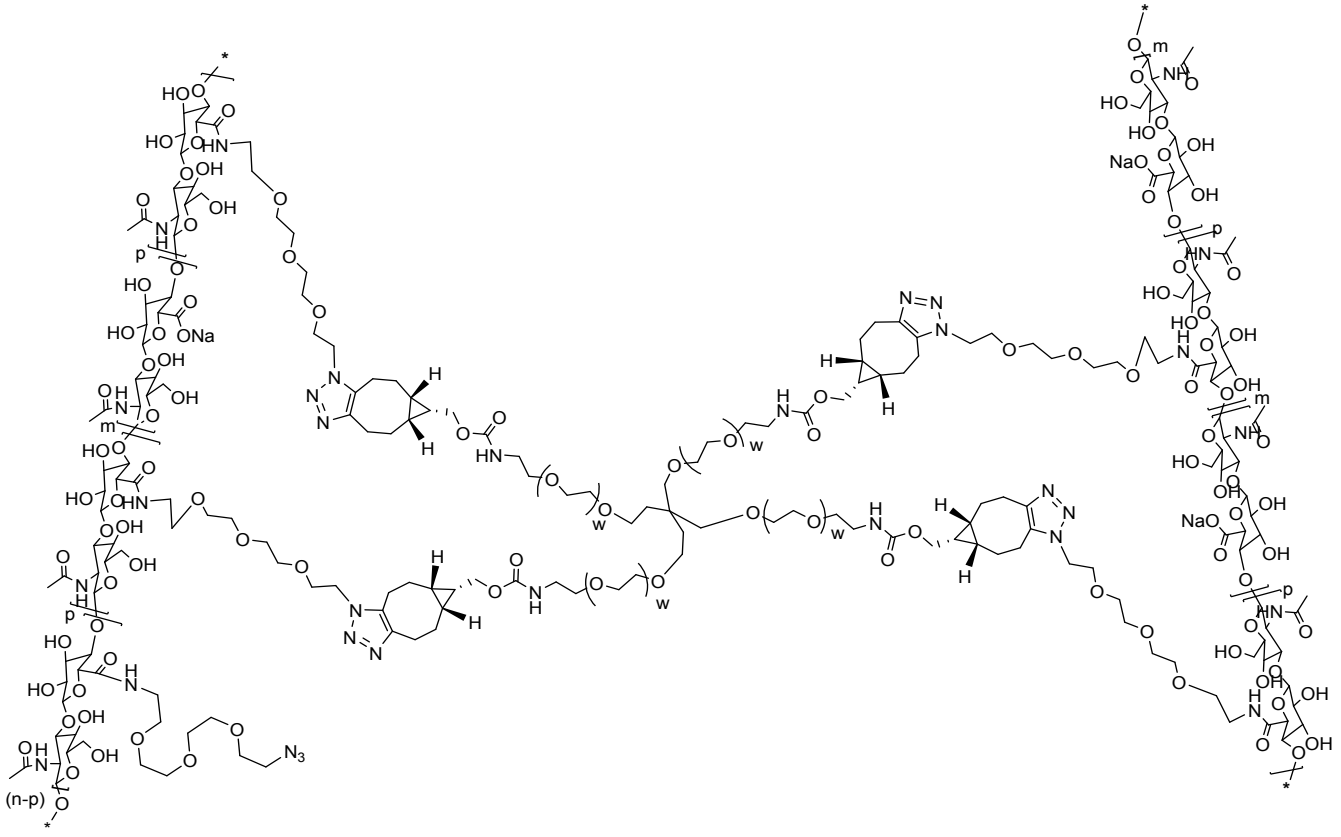
(XIIb).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XIIc:



(XIIc).

En otro aspecto, el portador reticulado comprende la Fórmula XIII:



(XIII).

Otra forma de realización descripta en la presente es un aducto de fármaco, D–R, en donde D es un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo; y R es un ligante adecuado para liberar un resto biológicamente activo. En un aspecto, D comprende una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, péptido, nucleótido, oligosacárido, o molécula pequeña, cada una de los cuales tiene al menos una amina primaria o secundaria y la molécula pequeña tiene un peso molecular de entre aproximadamente 100 g/mol y aproximadamente 2000 g/mol.

En una forma de realización descripta en la presente, D comprende una molécula biológicamente activa de bajo peso molecular. En un aspecto, D comprende una molécula biológicamente activa que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo y un peso molecular de aproximadamente entre 100 g/mol y aproximadamente 2000 g/mol, incluyendo todos los enteros dentro del rango especificado. En un aspecto, D comprende

una molécula biológicamente activa que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo y un peso molecular de aproximadamente 100 g/mol, aproximadamente 150 g/mol, aproximadamente 200 g/mol, aproximadamente 250 g/mol, aproximadamente 300 g/mol, aproximadamente 350 g/mol, aproximadamente 400 g/mol, aproximadamente 450 g/mol, aproximadamente 500 g/mol, aproximadamente 550 g/mol, aproximadamente 600 g/mol, aproximadamente 650 g/mol, aproximadamente 700 g/mol, aproximadamente 750 g/mol, aproximadamente 800 g/mol, aproximadamente 850 g/mol, aproximadamente 900 g/mol, aproximadamente 950 g/mol, aproximadamente 1000 g/mol, aproximadamente 1050 g/mol, aproximadamente 1100 g/mol, aproximadamente 1150 g/mol, aproximadamente 1200 g/mol, aproximadamente 1250 g/mol, aproximadamente 1300 g/mol, aproximadamente 1350 g/mol, aproximadamente 1400 g/mol, aproximadamente 1450 g/mol, aproximadamente 1500 g/mol, aproximadamente 1550 g/mol, aproximadamente 1600 g/mol, aproximadamente 1650 g/mol, aproximadamente 1700 g/mol, aproximadamente 1750 g/mol, aproximadamente 1800 g/mol, aproximadamente 1850 g/mol, aproximadamente 1900 g/mol, aproximadamente 1950 g/mol, o aproximadamente 2000 g/mol.

En otra forma de realización, D comprende una molécula biológicamente activa que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo y un peso molecular de entre aproximadamente 100 g/mol y aproximadamente 2000 g/mol que modula al menos un objetivo biológicamente relevante de una manera terapéuticamente beneficiosa. En un aspecto, D comprende agentes activos del sistema nervioso central, antiinfecciosos, antialérgicos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-obesidad, anticoagulantes, agentes antidiabéticos, antineoplásicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos, anticonceptivos, antiinflamatorios, anti angiogénicos, anti-glaucoma, agentes regenerativos, esteroides, agentes vasodilatadores, agentes vasoconstrictores, o agentes cardiovasculares. En un aspecto, D comprende acarbosa, alaproclato, alendronato, amantadina, amikacina, amineptina, aminoglutetimida, amisulprida, amlodipina, amotosalen, amoxapina, amoxicilina, anfetamina, anfotericina B, ampicilina, amprenavir, aminona, anileridina, apraclonidina, apramicina, articaina, atenolol,

atomoxetina, avizafona, baclofeno, benazepril, benserazida, benzocaina, betaxolol, bleomicina, bromfenaco, brofaromina, carvedilol, catina, catinona, carbutamida, cefalexina, clinafloxacina, ciprofloxacina, deferoxamina, delavirdina, desipramina, daunorubicina, dexmetilphenidato, dexmetilphenidato, diafenilsulfon, dizocilpina, dopamina, dobutamina, dorzolamida, doxorubicina, duloxetina, eflornitina, enalapril, epinefrina, epirubicina, ergolina, ertapenem, esmolol, enoxacina, etambutol, fenfluramina, fenoldopam, fenoterol, fingolimod, flecamida, fluvoxamina, fosamprenavir, frovatriptan, furosemida, fluoexetina, gabapentina, gatifloxacina, gemiflocacina, gentamicina, grepafloxacina, hexilcaina, hidralazina, hidroclorotiazida, icofungipen, idarubicina, imiquimod, inversina, isoproterenol, isradipina, kanamicina A, ketamina, labetalol, lamivudina, levobunolol, levodopa, levotiroxina, lisinopril, lomefloxacina, loracarbef, maprotilina, mefloquina, melfalán, memantina, meropenem, mesalazina, mescalina, metildopa, metilenedioximetanfetamina, metoprolol, milnacipran, mitoxantron, moxifloxacina, norepinefrina, norfloxacina, nortriptilina, neomicina B, nistatina, oseltamivir, ácido pamidrónico, paroxetina, pazufloxacina, pemetrexed, perindopril, fenmetrazina, fenelzina, pregabalina, procaina, pseudoefedrina, protriptilina, reboxetina, ritodrina, sabarubicina, salbutamol, serotonina, sertralina, sitagliptina, sotalol, espectinomicina, sulfadiazina, sulfamerazina, sertralina, espectinomicina, sulfalen, sulfametoxazol, tacrina, tamsulosina, terbutalina, timolol, tirofiban, tobramicina, tocamida, tosufloxacina, trandolapril, ácido tranexámico, tranilcipromina, trimetrexato, trovafloxacina, valaciclovir, valganciclovir, vancomicina, viomicina, viloxazina, y zalcitabina.

En otra forma de realización, D comprende uno o más péptidos biológicamente activos que incluyen, entre otros un péptido natriurético tipo C (CNP), un péptido natriurético atrial (ANP), exendina-4, insulina, hormona adrenocorticotrópica, adrenomedulina, adropina, ω-agatoxina, proteína relacionada con agouti, angiotensina/s, apelina 12, apelina 13, apelina 36, o derivados de los mismos, transcripción regulada por bradiquinina, calcitonina, cocaína y anfetaminas (CART), factor liberador de corticotropina (CRF), α-defensinas, β-defensinas, péptido delta inductor del sueño (DSIP), inhibidor específico de elastasa (Elafina), endoquininas, endomorfinas, endorfinas, endotelinas, exendina, fragmento activo de fibronectina, galanina, péptido

similar a la galanina, gastrina grande, gastrina I, péptido relacionado con gastrina, polipéptido inhibidor gástrico, péptido liberador de gastrina, grelina, des-acil grelina, glucagón, péptido similar al glucagón, factor liberador de hormona del crecimiento, Grammostola spatulata GsMTx-4, guangxitoxina-1E, guanilina, hepcidina 1, hepcidina/LEAP-1, histatina 5, hormona de crecimiento humano, humanina, huwentoxina, iberiotoxina, imperatoxina A, factores de crecimiento similares a la insulina, intermedina, IRL 1620, péptido de unión, kaliotoxina, kisspeptinas, kurtoxina, lipotropina, lipotropina, factor de crecimiento de células hepáticas, péptido antimicrobiano expresado en hígado 2, hormona liberadora de hormona luteinizante, lisenina, LL-37, margatoxina, mastoparán, péptido desgranulador de mastocitos, hormona concentradora de melanina, hormona estimuladora de melanocitos, factor inhibidor de liberación de MSH, midkina, neuropéptido cardioexcitador de moluscos, péptido de tolerancia a la morfina, motilina, toxinas muscarínicas, péptido regulador neuroendocrino-2, neuroquinina A, neuroquinina B, neuromedinas, neuronostatina-13, neuropéptidos, neurotensina, neurotoxina NSTX-3, nocistatina, nociceptina, obestatina, péptidos opioides (encefalinas, endorfinas, BAM-12P, casomorfina, dinorfinas, endomorfinas, neo-endorfinas, nociceptina), orexina-A/-B, ofanim, osteocalcina, oxitocina, pancreastatina, hormona paratiroidea, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, péptido234, péptido histidina-metionina, péptido T, péptido YY, fisalamina, polipéptidos activadores de adenilato ciclasa hipofisaria, factor plaquetario 4, plectasina, pleiotrofina, proadrenomedulina, péptido liberador de prolactina, psalmotoxina 1, purotoxina-1, péptido RFamida piroglutamilado, renina, péptido relacionado con RFamida-1, péptido relacionado con RFamida-3, salusina-α/β, sarafotoxinas, péptido relacionado con la esquizofrenia, escilatoxina, secretina, serelaxina, factor tímico sérico, inhibidor de la ATPasa de sodio y potasio-1, somatostatina, toxina de stichodactyla, sustancia K, estrescopina, péptido relacionado con la estrescopina, sustancia P, taquiquininas, SNX-482 de tarántula, ProTx-I de tarántula, ProTx-II de tarántula, tertiapina, tityustoxina Ka, hormona liberadora de tirotropina, tuftsina, uroguanilina, isómero A o B de uroguanilina, urocortina, urocortina II, urotensina II, péptido relacionado con la urotensina II, péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, vasotocina, péptido inhibidor de la replicación de virus, xenina, o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, D comprende uno o más de ACTH, adenosina desaminasa, agalsidasa, alfa-1 antitripsina (AAT), inhibidor de la alfa-1 proteinasa (API), alteplasa, amilinas (amilina, simlina), anistreplasa, ancrod serina proteasa, anticuerpos (monoclonales o policlonales, y fragmentos o fusiones), antitrombina III, antitripsinas, aprotinina, asparaginasas, atosiban, bifalina, bivalirudina, proteínas óseas morfogénicas, inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI), fragmentos de cadherina, calcitonina (salmón), colagenasa, inhibidor de la esterasa del complemento C1, conotoxinas, fragmentos de receptores de citoquinas, DNasa, dinorfina A, endorfinas, enfuvirtida, encefalinas, eritropoyetinas, exendinas, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, fibrinolisina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), péptido liberador de hormona de crecimiento 2 (GHRP2), proteínas de fusión, hormonas foliculoestimulantes, gramicidina, grelina, desacil-grelina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), galactosidasa, glucagón, péptidos similares al glucagón, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), proteínas de choque térmico humano (HSP), proteína activadora de fosfo lipasa (PLAP), gonadotropina coriónica (hCG), hemoglobinas, vacunas contra la hepatitis B, hirudina, inhibidor de la serina proteasa humana, hialuronidasas, iduronidasa, inmunoglobulinas, vacunas contra la gripe, interleuquinas (1 alfa, 1 beta, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 21), antagonista del receptor de IL-1 (rhIL-1ra), insulinas, factores de crecimiento similares a la insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (rhIGFBP), interferones (alfa 2a, alfa 2b, alfa 2c, beta 1a, beta 1b, gamma 1a, gamma 1b), molécula de adhesión intracelular, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), ligando de glicoproteína P-selectina (PSGL), factores de crecimiento transformantes, lactasa, leptina, leuprolide, levotiroxina, hormona luteinizante, vacuna de Lyme, péptidos natriuréticos (ANP, BNP, CNP y fragmentos), neuropéptido Y, pancrelipasa, polipéptido pancreático, papaína, hormona paratiroidea, PDGF, pepsina, péptido YY, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), prolactina, proteína C, timmalfasina, octreotida, secretina, sermorelina, receptor soluble del factor de necrosis tumoral (TNFR), superóxido dismutasa (SOD), somatropina (hormona del crecimiento), somatostatina, estreptoquinasa, sacarasa, terlipresina, fragmento de toxina tetánica, tilactasa, trombinas, timosina, hormona estimulante de la tiroides, tirotropina, factor de

necrosis tumoral (TNF), receptor de TNF-IgG Fc, activador de plasminógeno tisular (tPA), TSH, urodilatina, urato oxidasa, uroquinasa, vacunas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), péptido intestinal vasoactivo, vasopresina, ziconotida, lectina, ricina, o combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, D comprende abciximab, adalimumab, aflibercept, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, daclizumab, daratumumab, denosumab, eculizumab, efalizumab, golimumab, ibritumomab, infliximab, ipilimumab, lampalizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nivolumab, ofatumumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pegpleranib, pembrolizumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab, o derivados o combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, D comprende abatacept, albúmina, alefacept, inhibidor de la proteasa alfa-1, alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, toxina botulínica A, toxina botulínica B, darbepoetina, denileukina, dornasa alfa, colagenasa, proteínas del complemento, eritropoyetina, etanercept, factor VIII, fibrina, fibrinógeno, filgrastim, hormona folículo estimulante, glucocerebrosidasa, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), sargramostim, hormona de crecimiento humano, gonadotropina coriónica humana, hialuronidasa, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), interferones (IF), lutropina, oprelvekina, pramlintida, mecasermina, N-acetilgalactosamina-4- sulfatasa (galsulfasa), activador de plasminógeno tisular (TPA), vacunas a base de proteínas, o combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, D comprende una o más de proteínas, péptidos, anticuerpos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos, Fabs, scFvs, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas pequeñas, o combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, D comprende uno o más entre nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, que incluyen pero no se limitan a DNAs, RNAs, PNAs, siRNAs, miRNAs, mRNAs, tRNAs, rRNAs, o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, D comprende brolucizumab (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), o D4 (SEQ ID NO:7), ranibizumab, bevacizumab, ácido 5-

(5,6,7,8-Tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos.

Otra forma de realización descripta en la presente es un sistema de administración de fármacos que comprende un conjugado de agente biológicamente activo-ligante que no deja huellas-portador, D–R–R^{11}, en donde D comprende un resto biológicamente activo que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo de acuerdo con lo descripto en la presente, R comprende un ligante que no deja huellas de acuerdo con lo descripto en la presente unido a R^{11}, que comprende un polímero o hidrogel portador de acuerdo con lo descripto en la presente. En un aspecto, R^{11} comprende ácido hialurónico, ácido hialurónico reticulado, polietilen glicol, polietilen glicol reticulado u otro polímero adecuado de acuerdo con lo descripto en la presente. En otro aspecto, R comprende un ligante que no deja huellas de acuerdo con lo descripto en la presente. En otro aspecto, D comprende uno o más entre proteínas, péptidos, anticuerpos, Fabs, Fcs, scFvs, ácidos nucleicos, siRNAs, miRNAs, mRNAs, carbohidratos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), pequeñas moléculas orgánicas que comprenden por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, o combinaciones de los mismos. En un aspecto, D comprende brolucizumab (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), o D4 (SEQ ID NO:7), ranibizumab, bevacizumab, ácido 5-(5,6,7,8-Tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos.

En otra forma de realización, D–R–R^{11} comprende la Fórmula XIV, en donde el "Fármaco" puede ser uno o más entre brolucizumab (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), o D4 (SEQ ID NO:7), ranibizumab, bevacizumab, ácido 5-(5,6,7,8-tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos.

En algunas formas de realización, D–R–R^{11} comprende cualquiera de las especies ilustradas en las Fórmulas XIV–XXIII.

En una forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende polipéptidos D2 (SEQ ID NO:5), o una versión pegilada de los mismos, como por ejemplo, D3 (SEQ ID NO:6). Los polipéptidos D2 y D3, así como sus derivados, pueden prepararse según lo descripto en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 2007/146689, que se incorpora a la presente como referencia.

En otra forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende brolucizumab (SEQ ID NO:4). Brolucizumab es un fragmento variable de cadena simple (scFv) que comprende una región VH (SEQ ID NO:1), una región VL (SEQ ID NO:2), y una región ligante (SEQ ID NO:3). Brolucizumab, así como sus derivados, puede prepararse según lo descripto en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 2009/155724, que se incorpora a la presente como referencia. Una metionina derivada del codón de inicio está presente en la VL de brolucizumab. En algunos casos, la metionina puede escindirse postraduccionalmente antes de ensamblarse a un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente.

En otra forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende D4 (SEQ ID NO:7). D4 es un péptido de 13 aminoácidos que comprende la secuencia pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH (SEQ ID NO:7), que comprende un enlace disulfuro entre C_6 y C_{12} y donde pE indica piroglutamato y Nle indica norleucina. D4 así como sus derivados, puede prepararse según lo descripto en la Publicación de

Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 2013/111110, que se incorpora a la presente como referencia.

En otra forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende apelina 12, apelina 13, apelina 36, o un derivado de las mismas. Apelina y sus derivados están descriptos en WO2013/111110, WO 2014/081702, WO 2015/013168, WO 2015/013165, o WO 2015/013167, que se incorporan a la presente como referencia.

En otra forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende uno o más fármacos anti-factor de crecimiento endotelial vascular, como bevacizumab o ranibizumab. Bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado recombinante que se une e inhibe la actividad biológica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano en sistemas de ensayo in vitro e in vivo. Bevacizumab contiene regiones marco humanas y las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino que se une al VEGF. El anticuerpo tiene un peso molecular aproximado de 149 kDa. Bevacizumab se produce en el sistema de expresión Ovario de Hámster Chino en un medio nutriente. Ranibizumab es un fragmento de anticuerpo monoclonal IgG1 kappa humanizado recombinante diseñado para uso intraocular. Ranibizumab se une e inhibe la actividad biológica del factor de crecimiento endotelial vascular humano A (VEGF-A). El ranibizumab, que carece de una región Fc, tiene un peso molecular de aproximadamente 48 kDa y es producido por un sistema de expresión de E. coli en un medio nutriente. Bevacizumab y ranibizumab están descriptos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 1994/004679 y WO 1998/45331, respectivamente, que se incorporan a la presente como referencia.

En otra forma de realización, el fármaco o agente biológicamente activo D, comprende ácido 5-(5,6,7,8-tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; o (S)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida. La síntesis de estas

moléculas está descripta en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nro. WO 2010/066684, que se incorpora a la presente como referencia.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para armar un sistema de administración de fármacos; el proceso puede comprender una de las siguientes secuencias de pasos:

(a) preparar una molécula portadora, R^{11}, donde R^{11} es un hidrogel reticulado, luego este paso comprende el proceso usado para preparar ese hidrogel; la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa;

(b) conjugar por separado el ligante que no deja huellas, R, a un agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, por medio de lo cual se forma el aducto de ligante que no deja huellas; el aducto de ligante que no deja huellas-D puede ser opcionalmente purificada en esta etapa,

(c) conjugar la molécula portadora, R^{11}, con el aducto de ligante que no deja huellas-D; y

(d) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos. Este proceso se ilustra en el **Esquema 5A** a continuación.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para armar un sistema de administración de fármacos que comprende los siguientes pasos:

(a) preparar una molécula portadora, R^{11}, donde R^{11} es un hidrogel reticulado, luego este paso comprende el proceso usado para preparar ese hidrogel; la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa;

(b) conjugar el ligante que no deja huellas, R, a la molécula portadora, R^{11}, por medio de lo cual se forma el aducto de molécula portadora-ligante que no deja huellas, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa;

(c) conjugar el agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, al aducto de molécula portadora-ligante que no deja huellas; y

(d) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos. Este proceso se ilustra en el **Esquema 5B** a continuación.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para armar un sistema de administración de fármacos que comprende los siguientes pasos:

(a) preparar una molécula portadora no reticulada, R^{11}, la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa;

(b) conjugar por separado el ligante que no deja huellas, R, a un agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, por medio de lo cual se forma el aducto de ligante que no deja huellas; el aducto de ligante que no deja huellas-D puede ser opcionalmente purificado en esta etapa;

(c) conjugar la molécula portadora, R^{11}, con el aducto de ligante que no deja huellas-D, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa;

(d) preparar el hidrogel reticulado incubando la molécula portadora no reticulada-ligante que no deja huellas-agente biológicamente activo, R^{11}-R-D, con el reactivo de reticulado adecuado para formar el hidrogel; y

(e) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos. Este proceso se ilustra en el **Esquema 5C** a continuación.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para armar un sistema de administración de fármacos que comprende los siguientes pasos:

(a) preparar una molécula portadora no reticulada, R^{11}, la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa;

(b) conjugar el ligante que no deja huellas, R, a la molécula portadora, R^{11}, por medio de lo cual se forma el aducto de molécula portadora-ligante que no deja huellas, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa; y

(c) conjugar el agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, al aducto de molécula portadora-ligante que no deja huellas;

(d) preparar el hidrogel reticulado incubando la molécula portadora no reticulada-ligante que no deja huellas-agente biológicamente activo, R^{11}-R-D, con el reactivo de reticulado adecuado para formar el hidrogel; y

(e) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos. Este proceso se ilustra en el **Esquema 5D** a continuación.

Otra forma de realización descripta en la presente es un proceso para armar un sistema de administración de fármacos que comprende los siguientes pasos:

(a) preparar una molécula portadora no reticulada, R^{11}, la molécula portadora puede ser opcionalmente purificada en esta etapa;

(b) conjugar el ligante que no deja huellas, R, a la molécula portadora, R^{11}, por medio de lo cual se forma el aducto de molécula portadora-ligante que no deja huellas, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa;

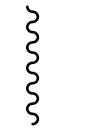
(c) preparar el hidrogel reticulado incubando el aducto de molécula portadora no reticulada-ligante que no deja huellas, R^{11}-R, con el reactivo de reticulado adecuado para formar el hidrogel, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa;

(d) conjugar el agente biológicamente activo, D, que comprende una amina primaria, amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo, al aducto de molécula portadora reticulada-ligante que no deja huellas, que puede ser opcionalmente purificado en esta etapa; y

(e) purificar el sistema de administración de fármacos a partir de los reactivos. Este proceso se ilustra en el **Esquema 5E** a continuación.

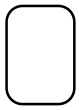
Esquemas 5A–E. El esquema 5 ilustra cinco procesos, A–E, para armar sistemas de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente.

Leyenda:



Molécula portadora, R^{11}, no reticulada

Reticulante



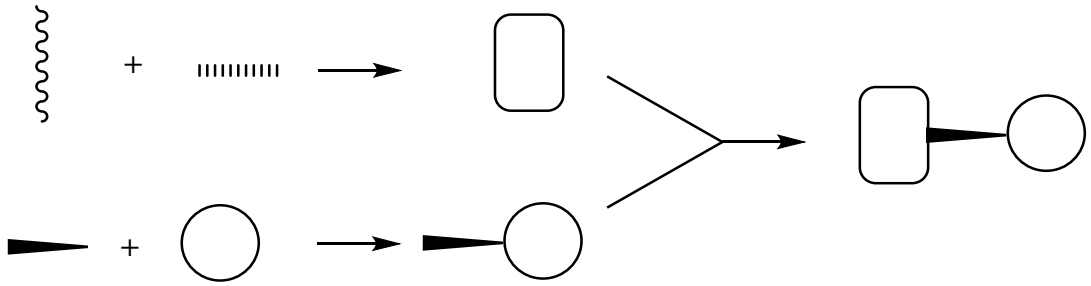
Molécula portadora, R^{11}, reticulada con hidrogel

Ligante que no deja huellas

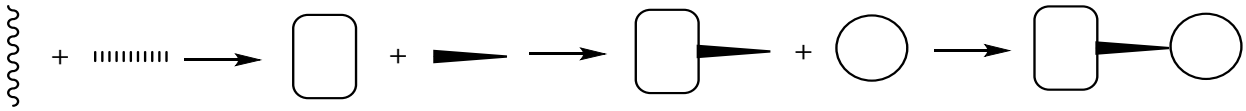


Agente biológicamente activo, D

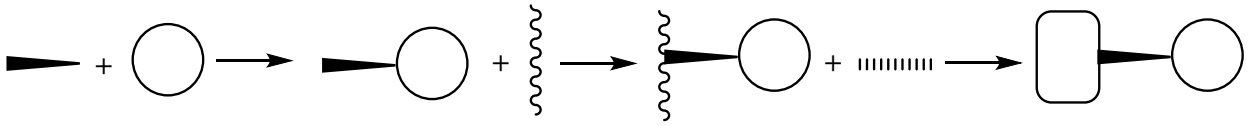
Esquema 5A



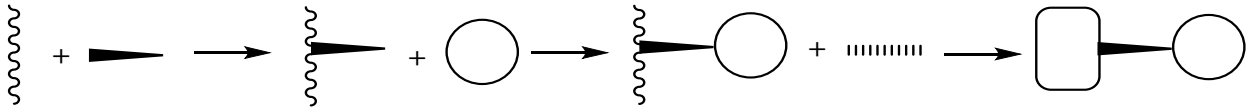
Esquema 5B



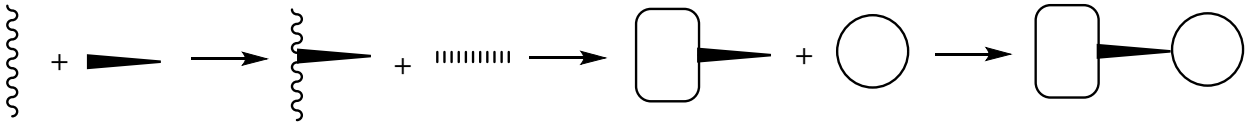
Esquema 5C



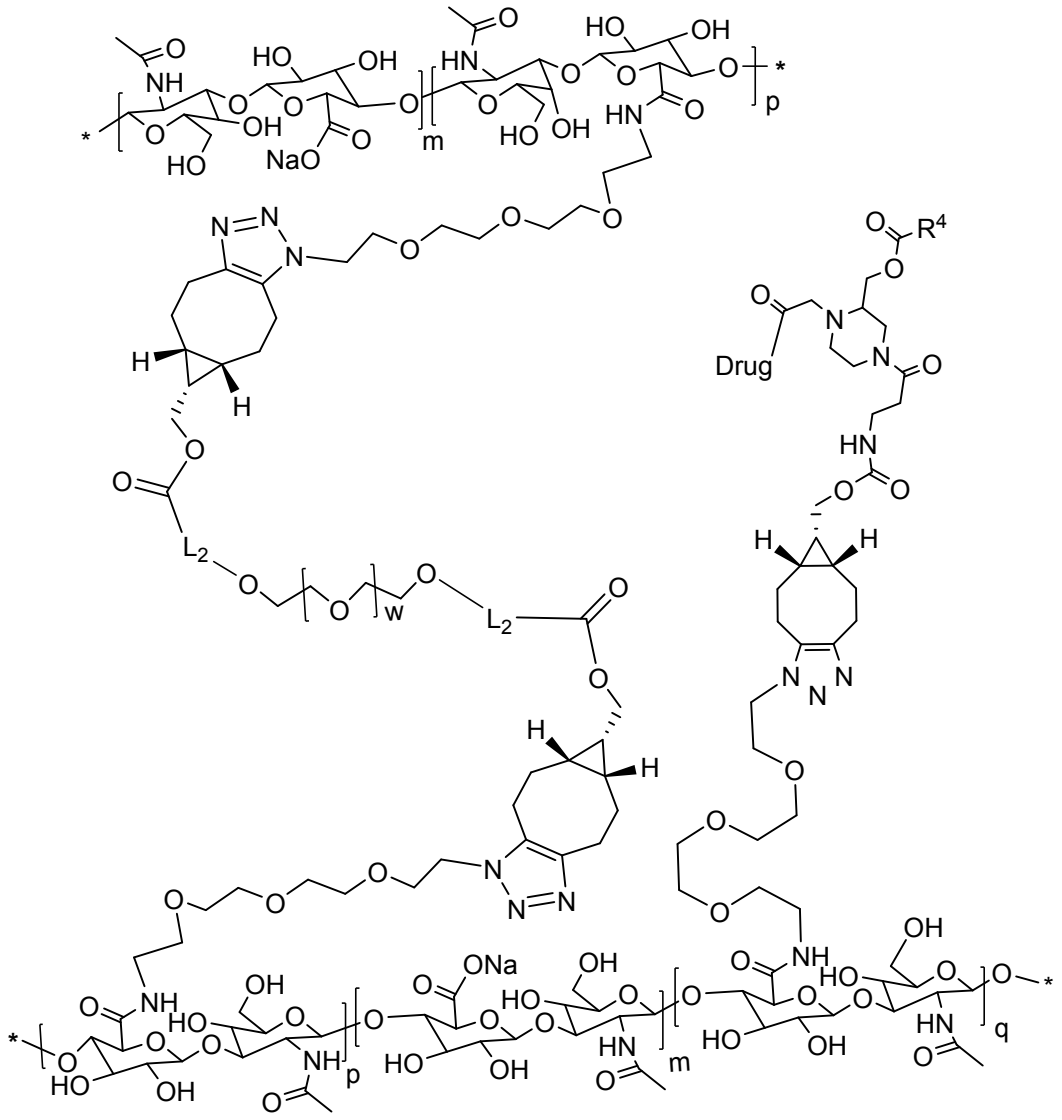
Esquema 5D



Esquema 5E



En una forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XIV):



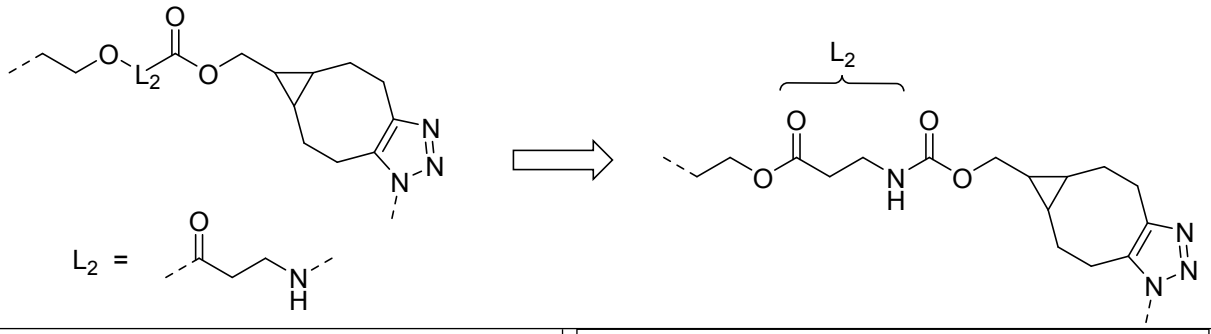
(XIV),

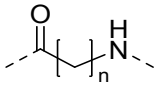
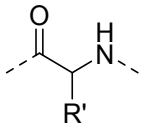
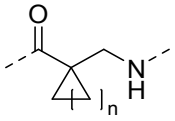
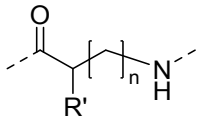
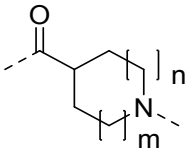
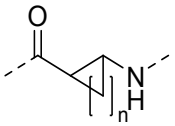
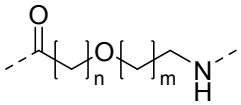
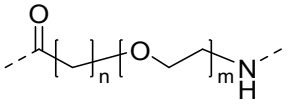
en donde L_2 representa un grupo espaciador, que puede ser específico para un reticulador particular, y "Fármaco" representa una molécula biológicamente activa que comprende por lo menos una amina primaria, una amina secundaria, o un átomo de nitrógeno anular de un anillo azaheteroarilo que modula al menos un objetivo biológicamente relevante de una manera terapéuticamente beneficiosa.

En una forma de realización, los espaciadores, L_2, comprenden cualquiera de las especies ilustradas en la Tabla 5.

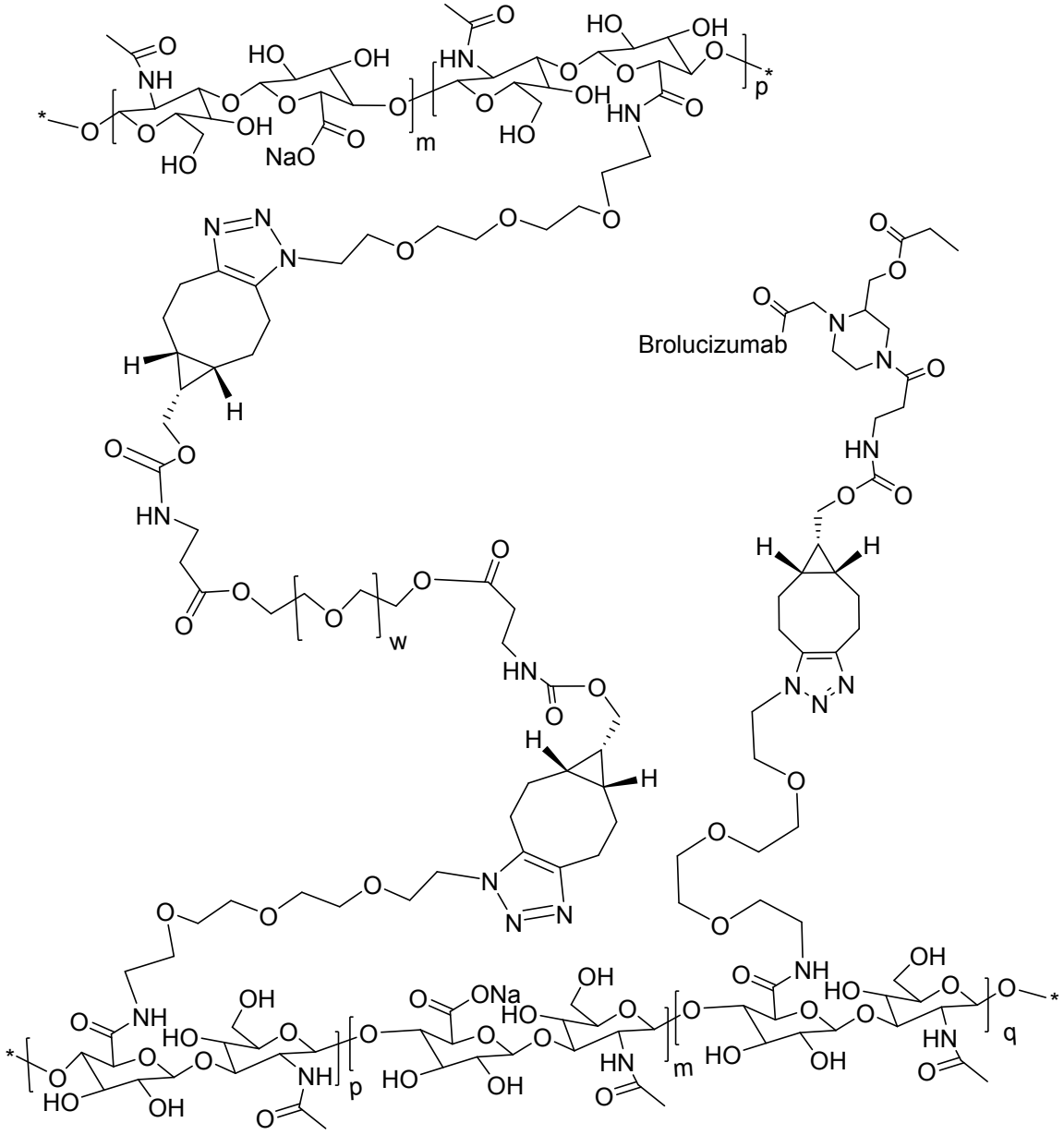
Tabla 5. Ejemplos de Espaciadores L_2

En la tabla a continuación, L_2 representa el espaciador entre O y C(O)O. Por ejemplo



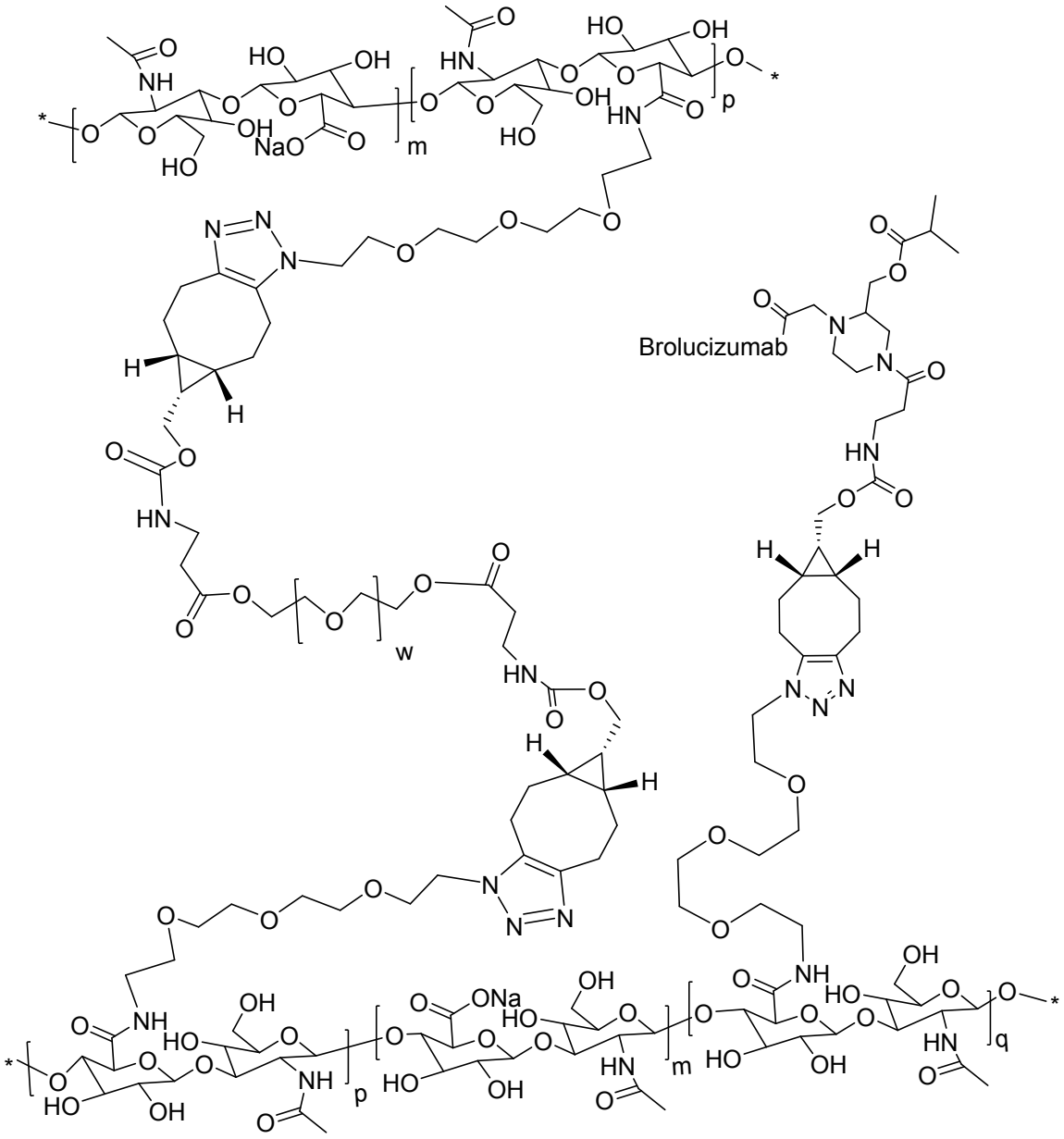
 n = 1-10	 R' = Me, Et, Pr, iPr, C1-C6 alky, C1-C6 cycloalkyll
 n = 1-6	 R' = Me, Et, Pr, iPr, C1-C6 alkyl, C1-C6 cycloalkyl n = 1-5
 n=0-2 m=0-2	 n = 1-5
 n = 1-6 m = 1-6	 n = 1-6 m = 1-6

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XV) en tanto el fármaco es brolucizumab:



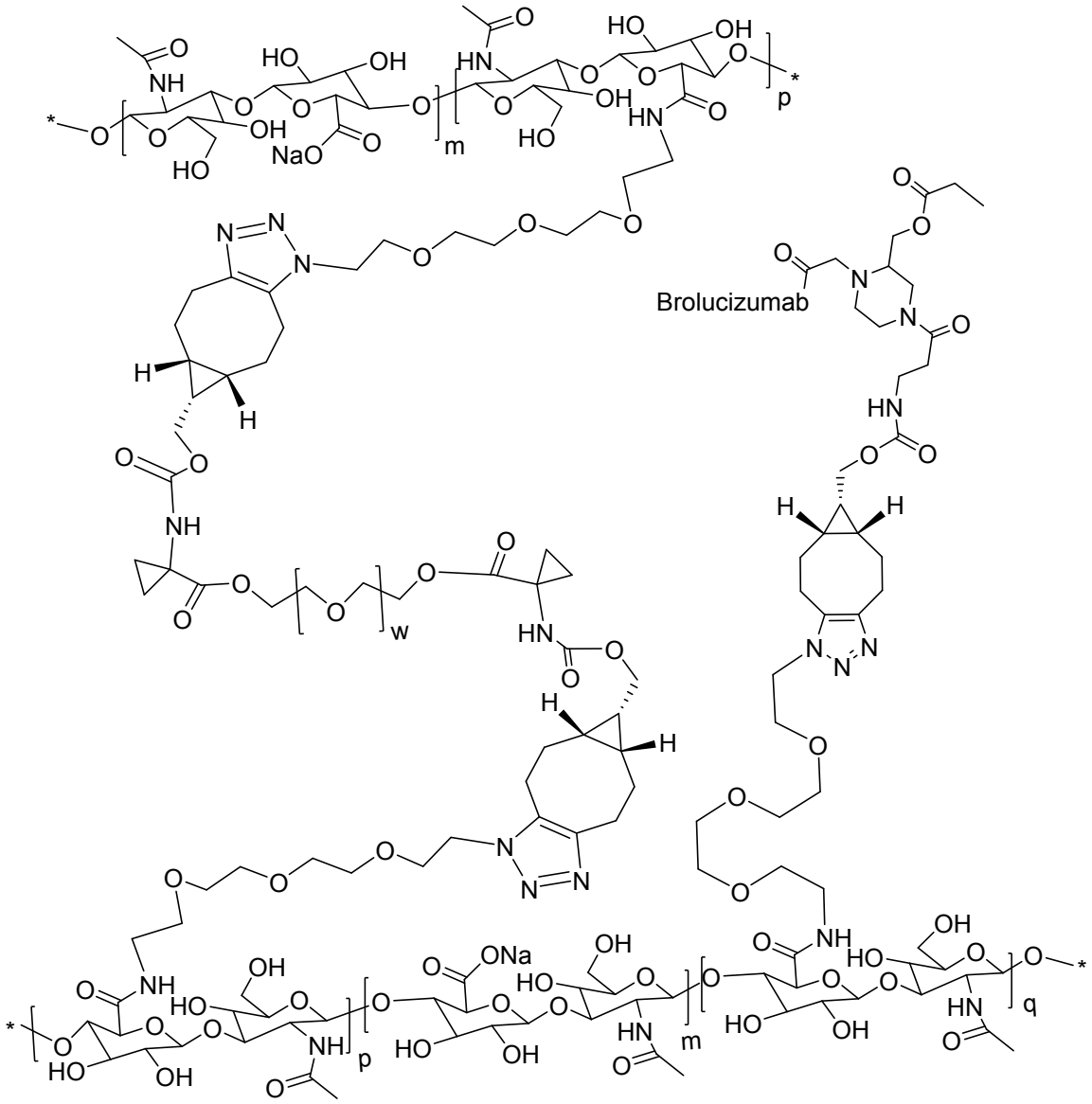
(XV).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVI) en tanto el fármaco es brolucizumab:



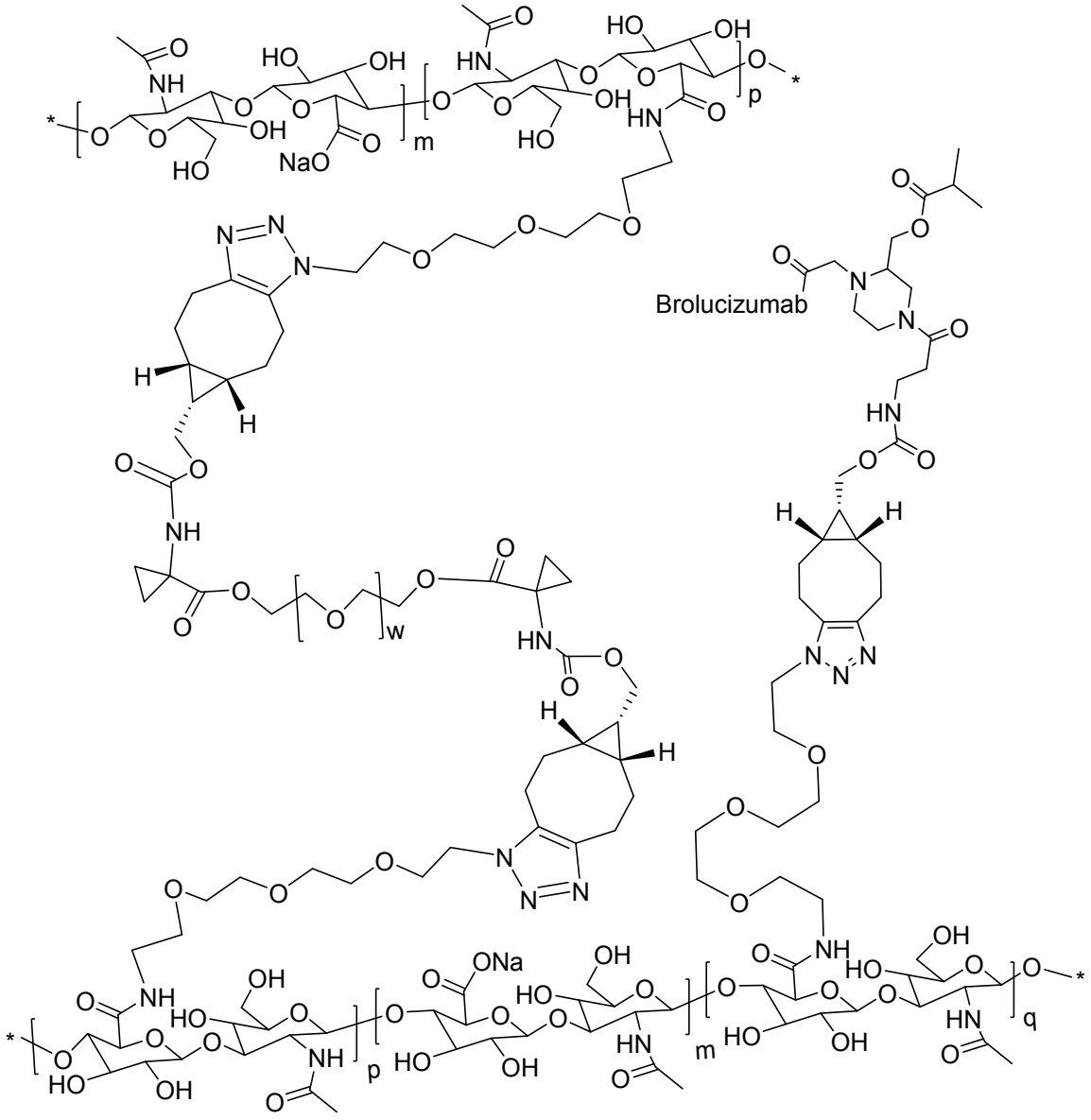
(XVI).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVII) en tanto el fármaco es brolucizumab:



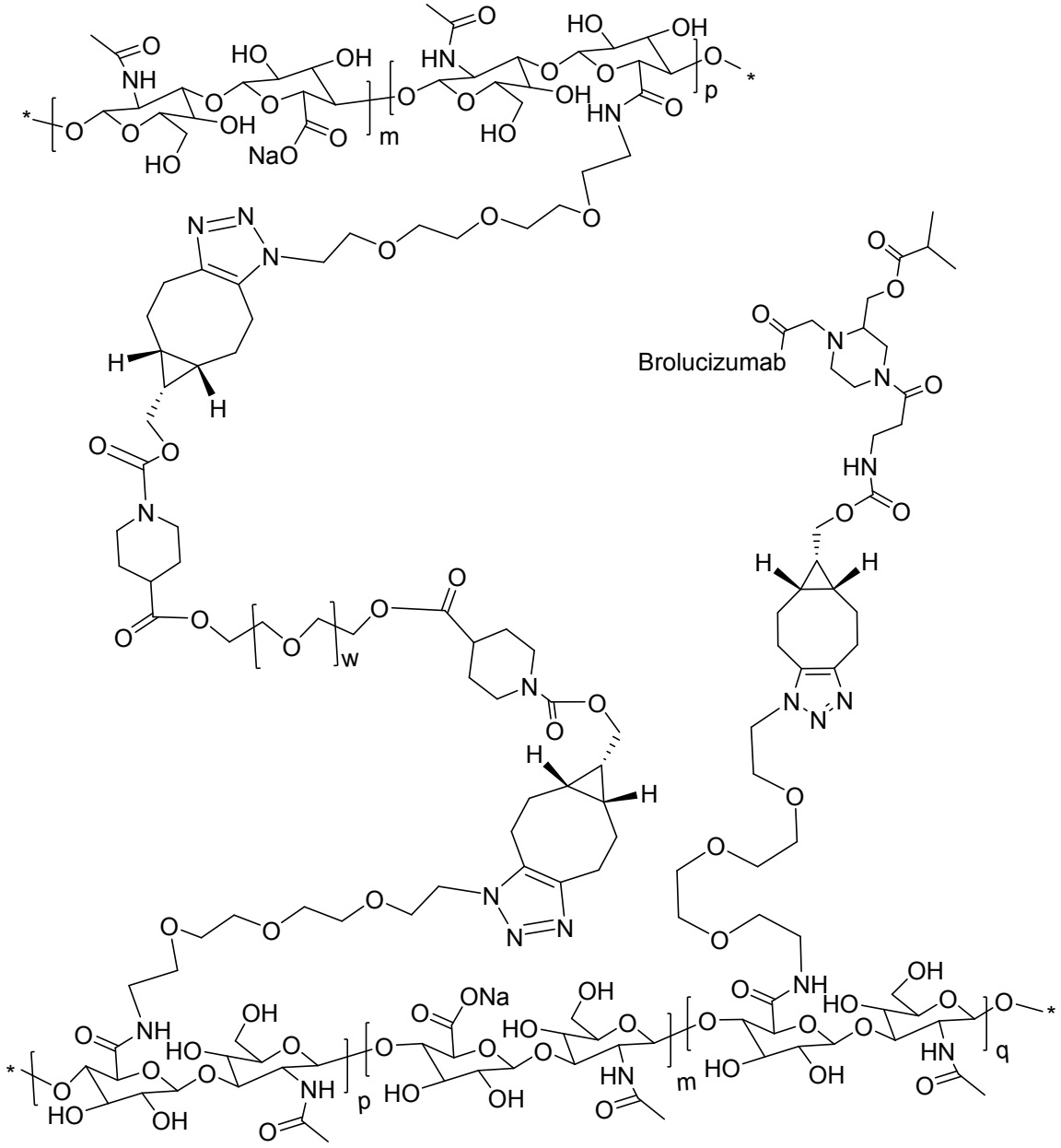
(XVII).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIII) en tanto el fármaco es brolucizumab:



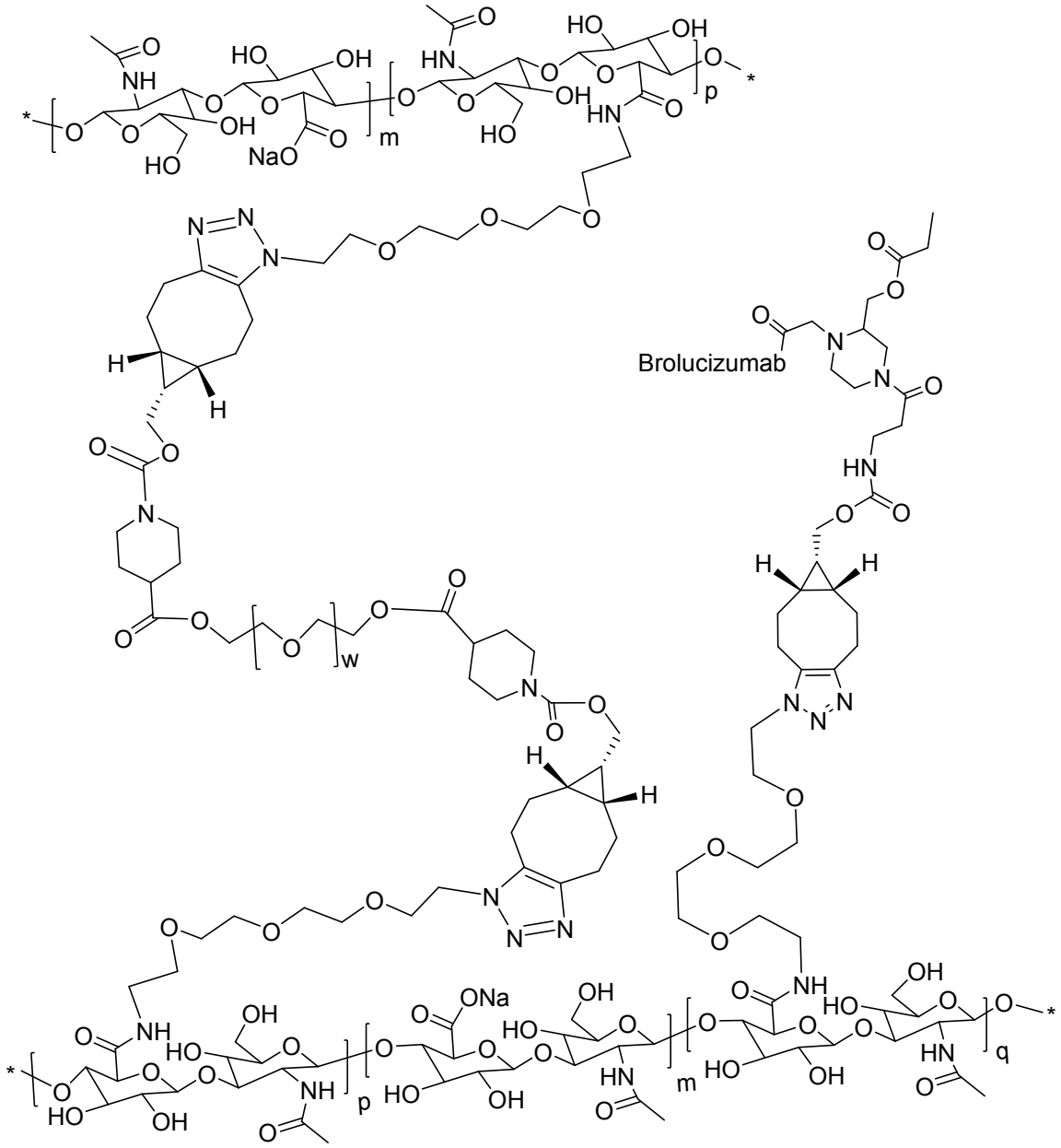
(XVIII).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIIa) en tanto el fármaco es brolucizumab:



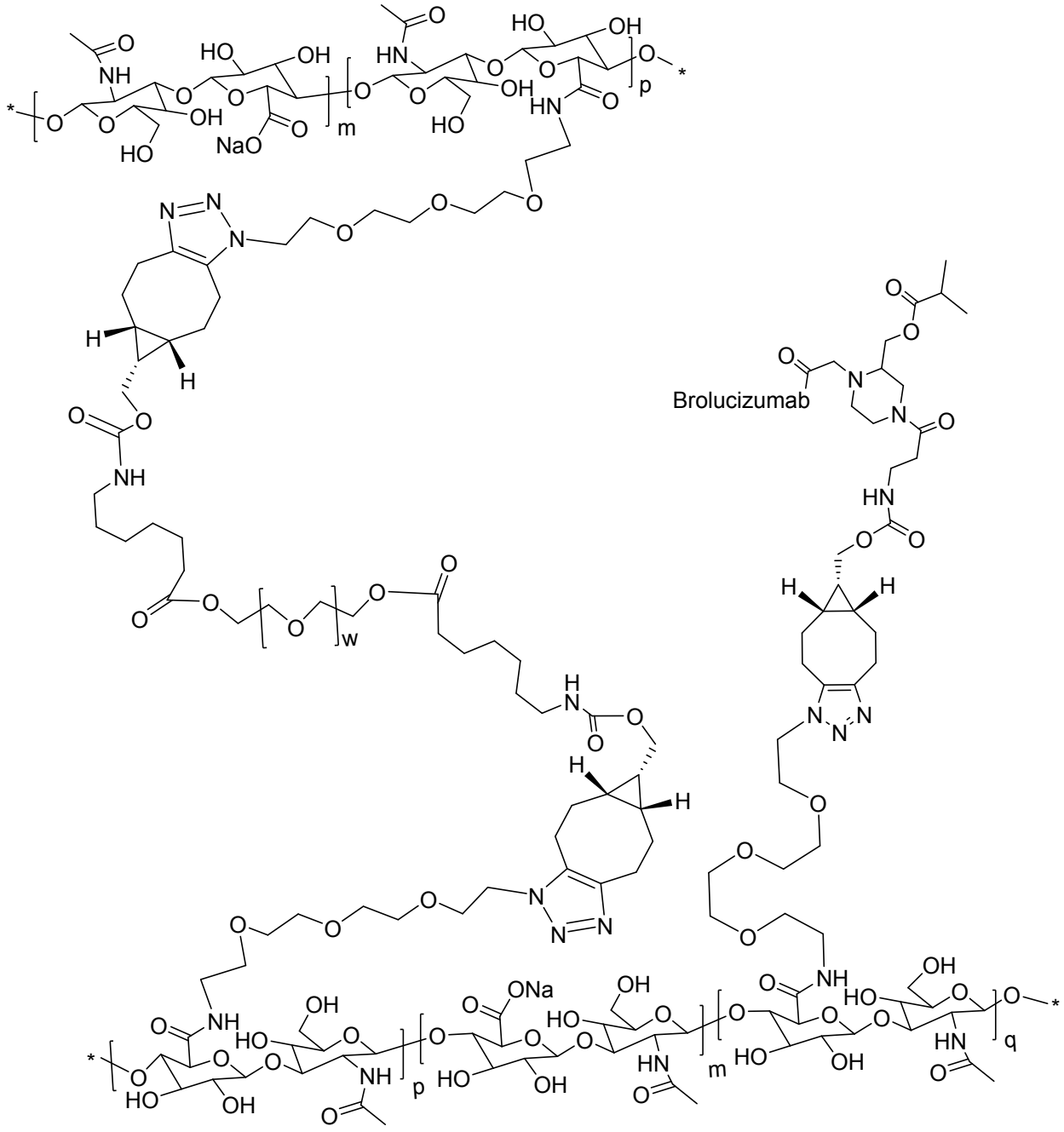
(XVIIIa).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIIb) en tanto el fármaco es brolucizumab:



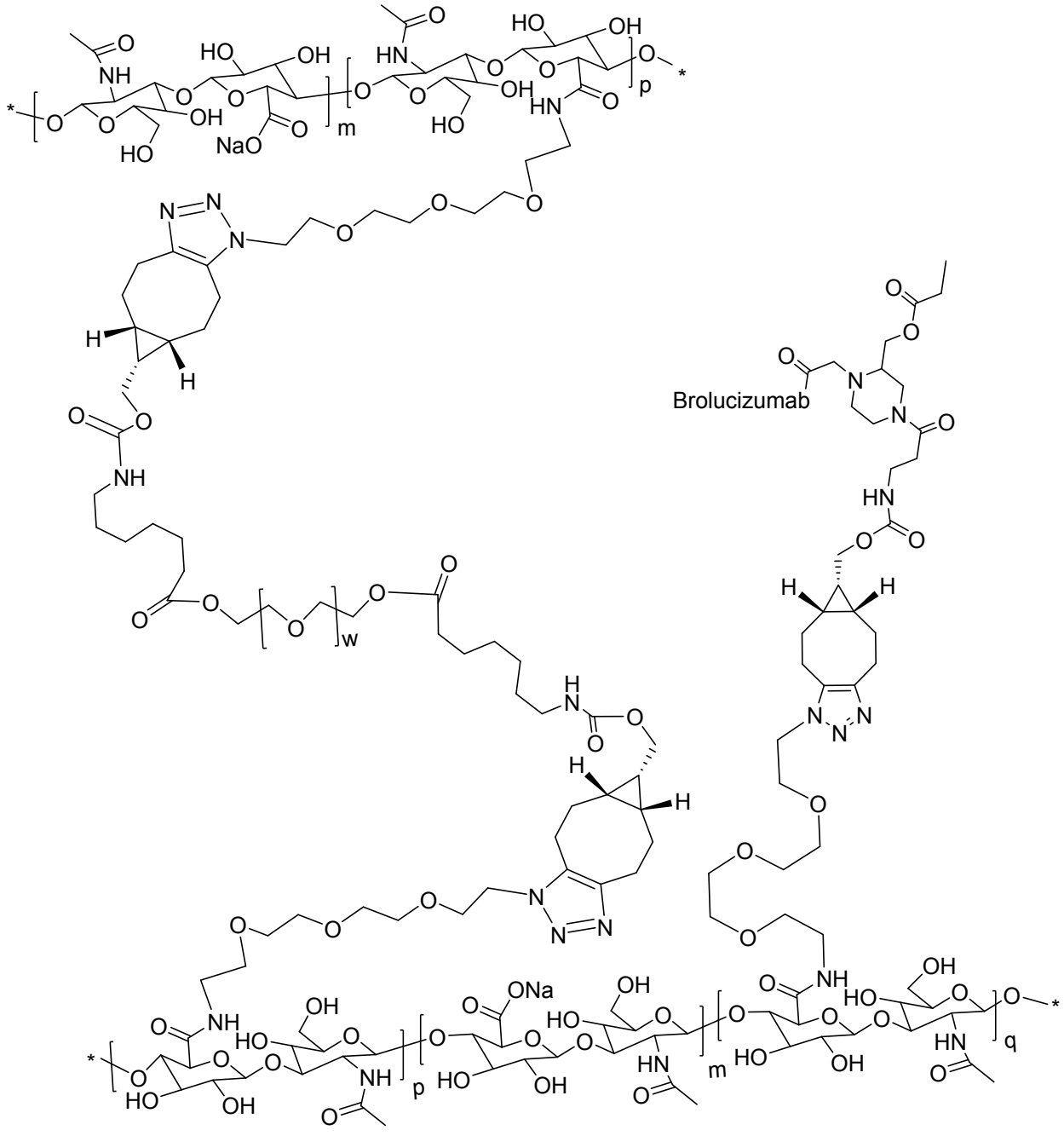
(XVIIIb).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIIc) en tanto el fármaco es brolucizumab:



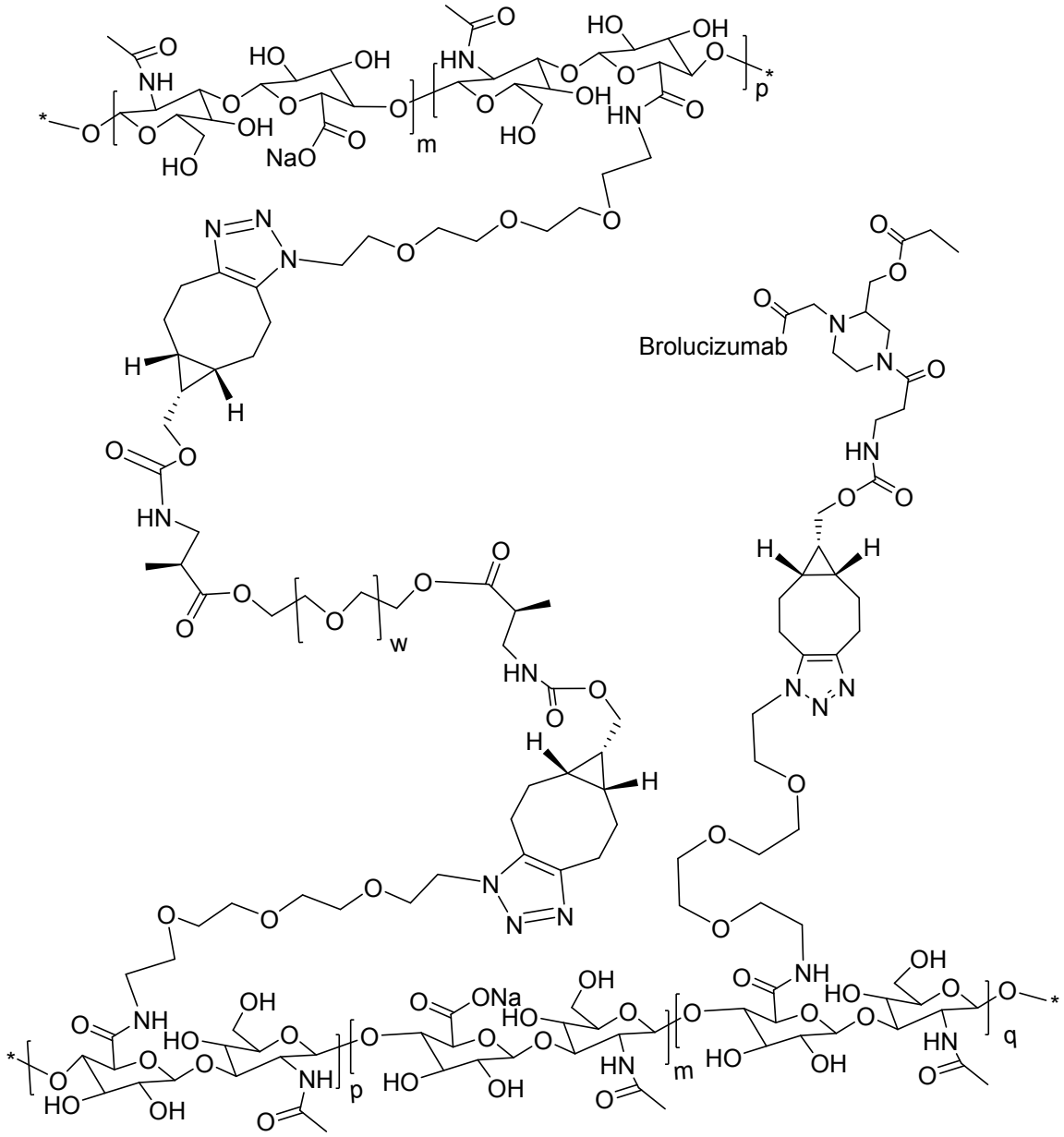
(XVIIIc).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIId) en tanto el fármaco es brolucizumab:



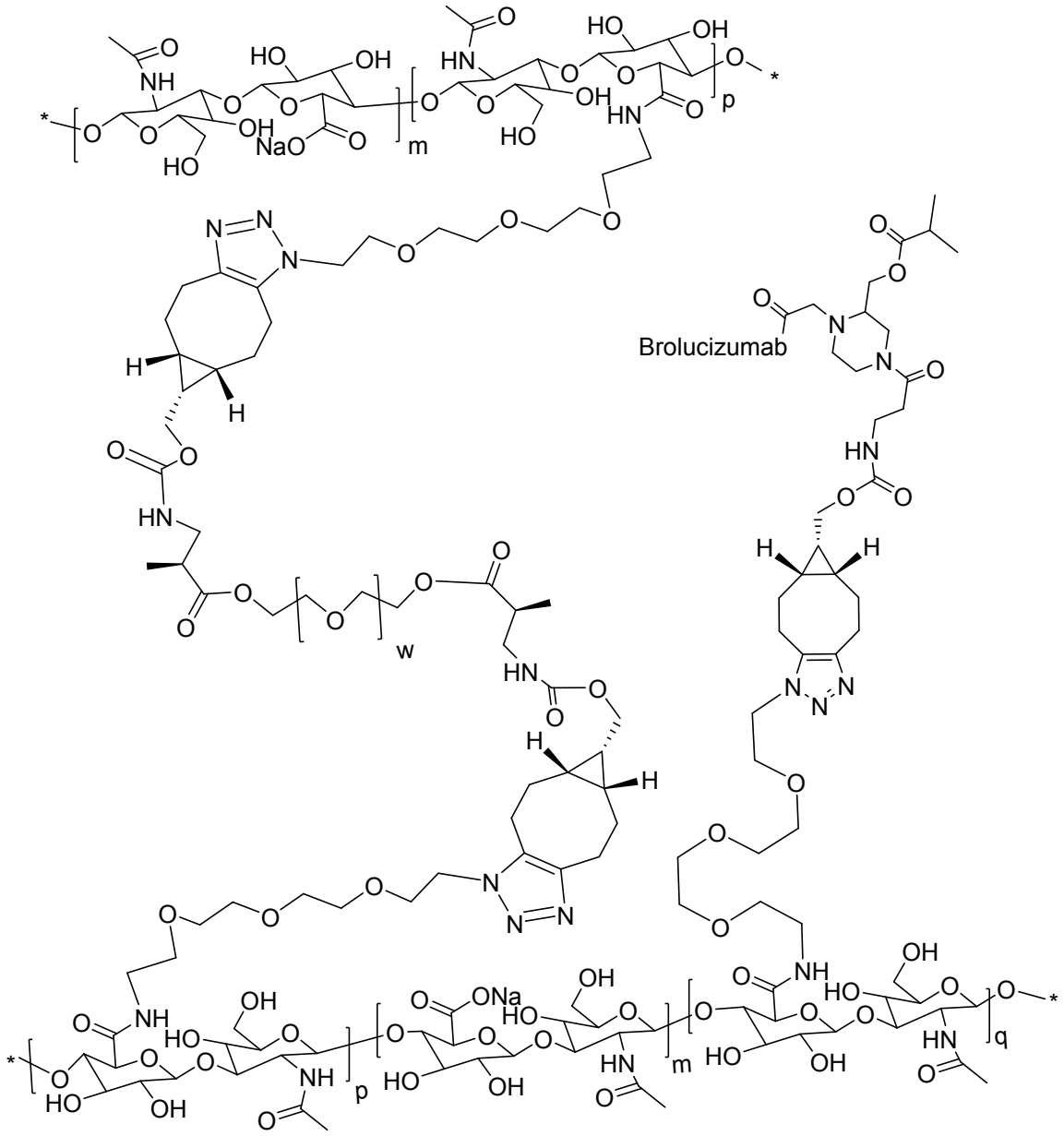
(XVIIId).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIIe) en tanto el fármaco es brolucizumab:



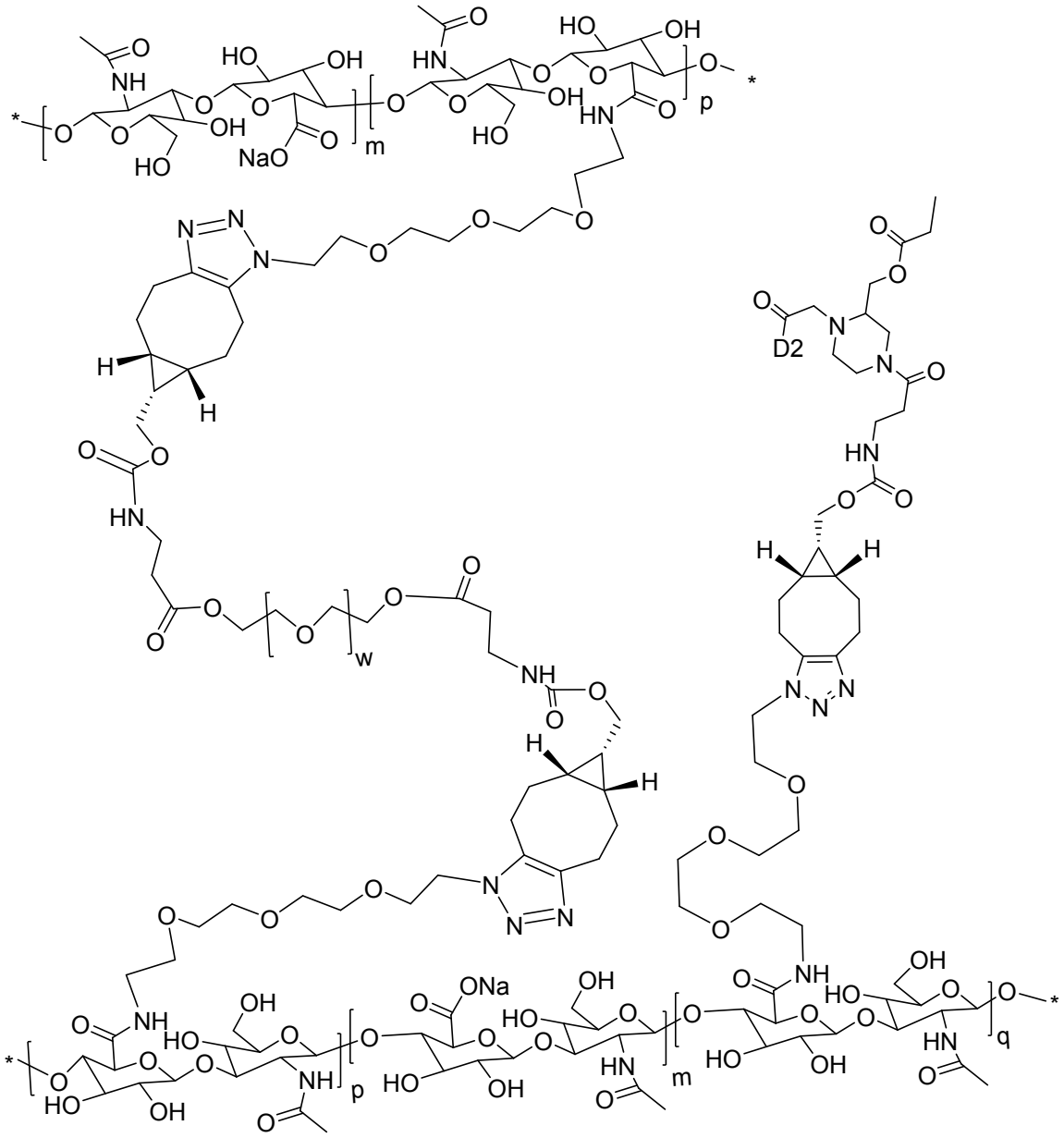
(XVIIIe).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XVIIIf) en tanto el fármaco es brolucizumab:



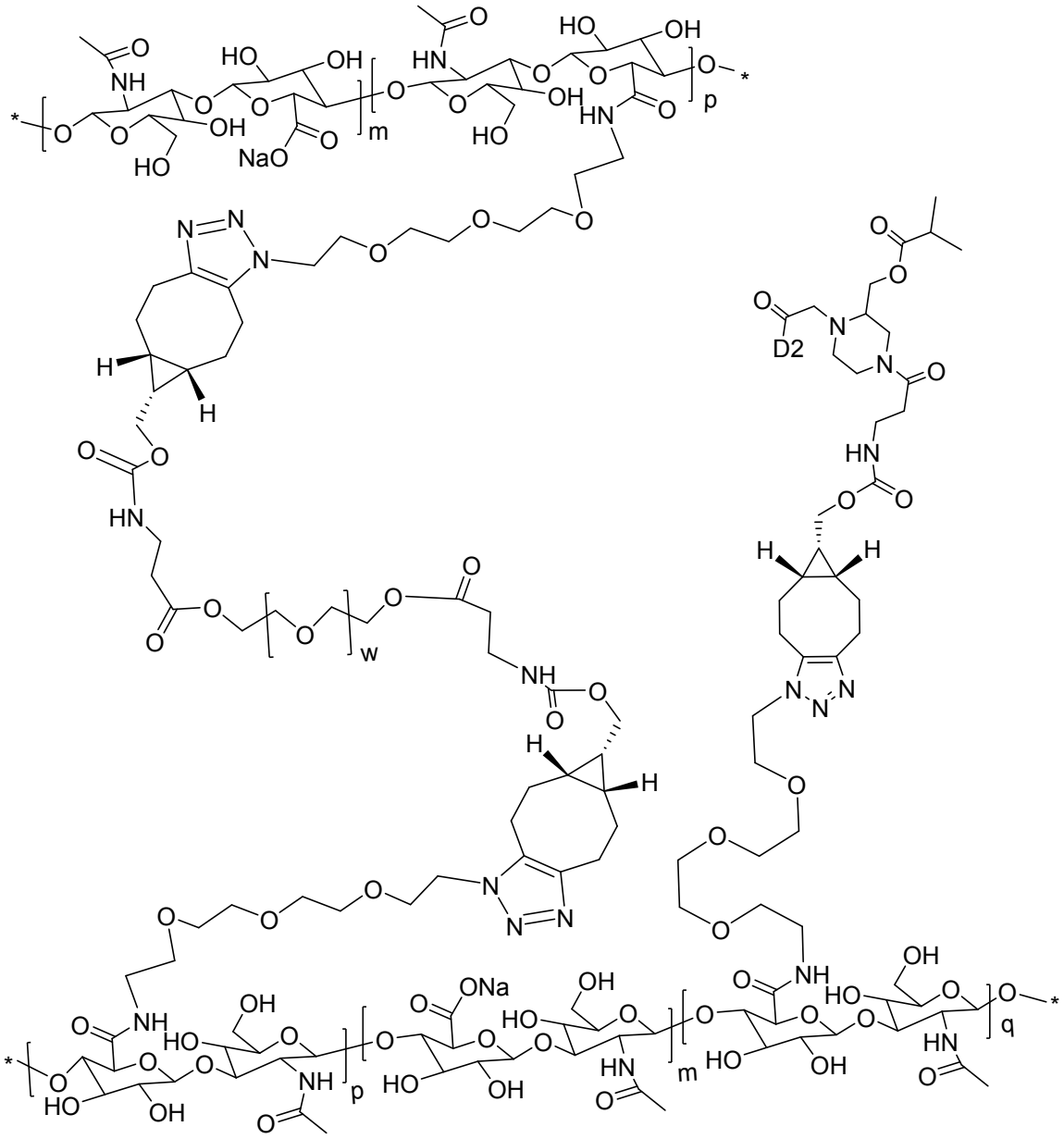
(XVIIIf).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XIX) en tanto el fármaco es D2:



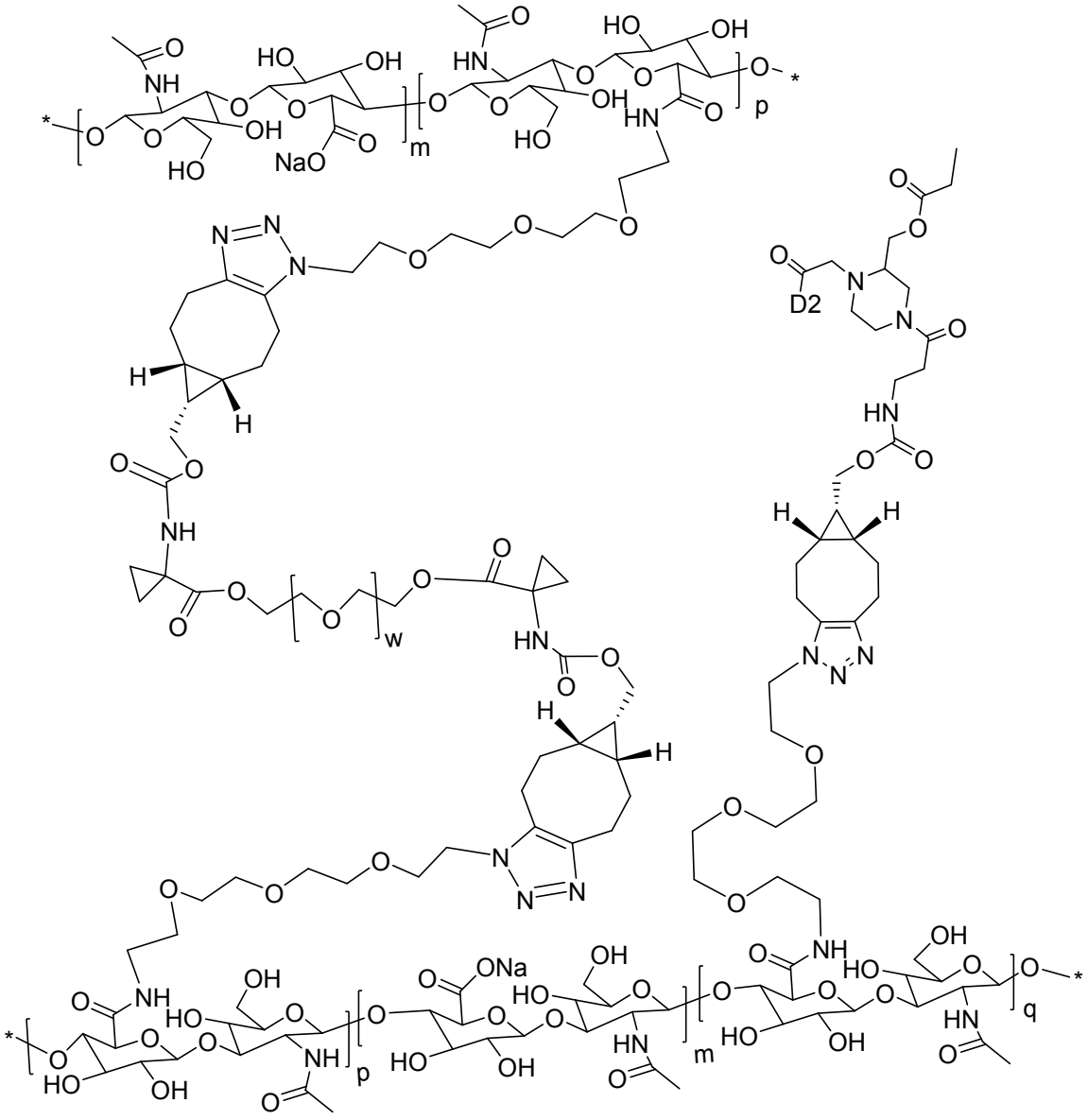
(XIX).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XX) en tanto el fármaco es D2:



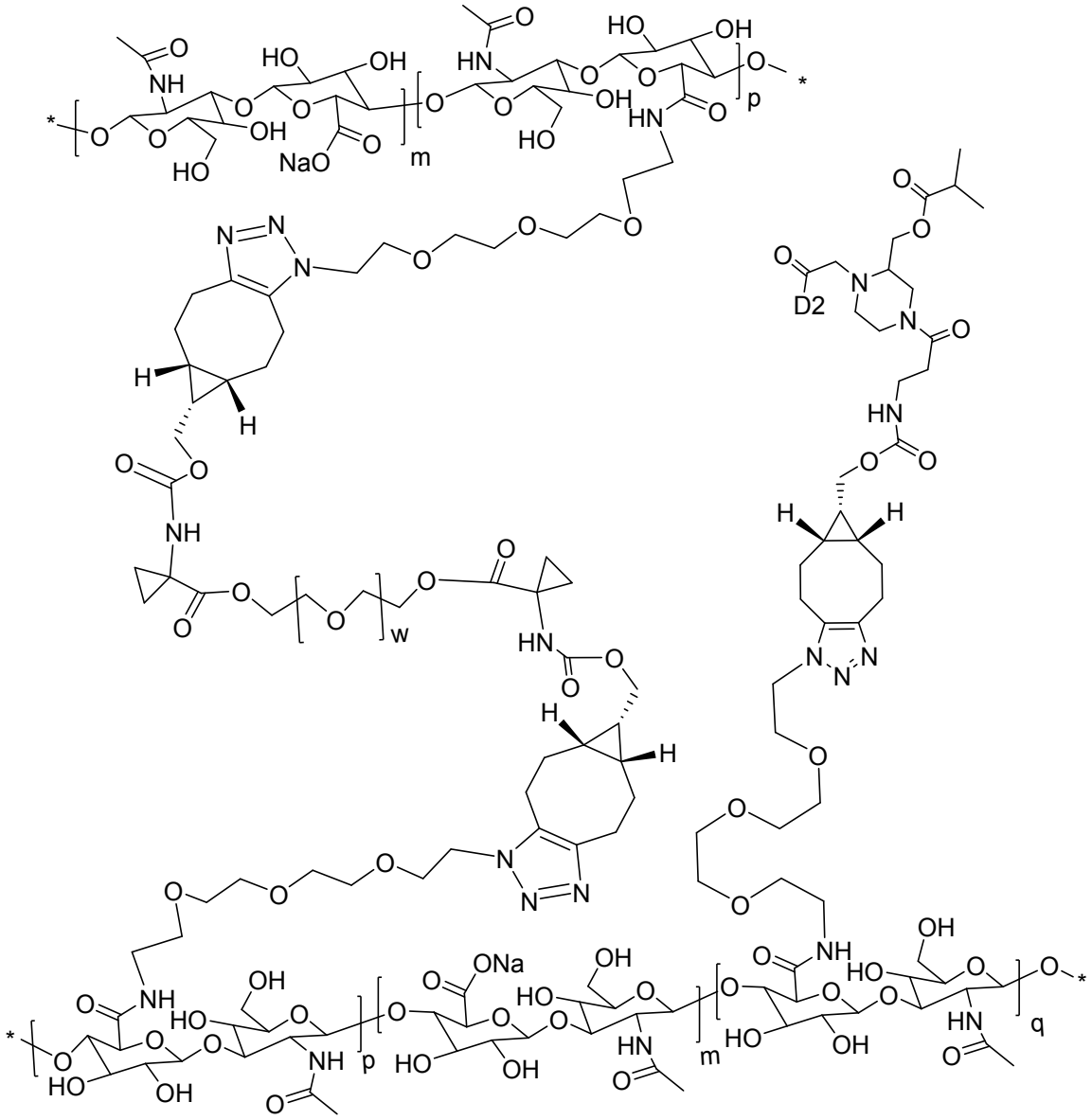
(XX).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XXI) en tanto el fármaco es D2:



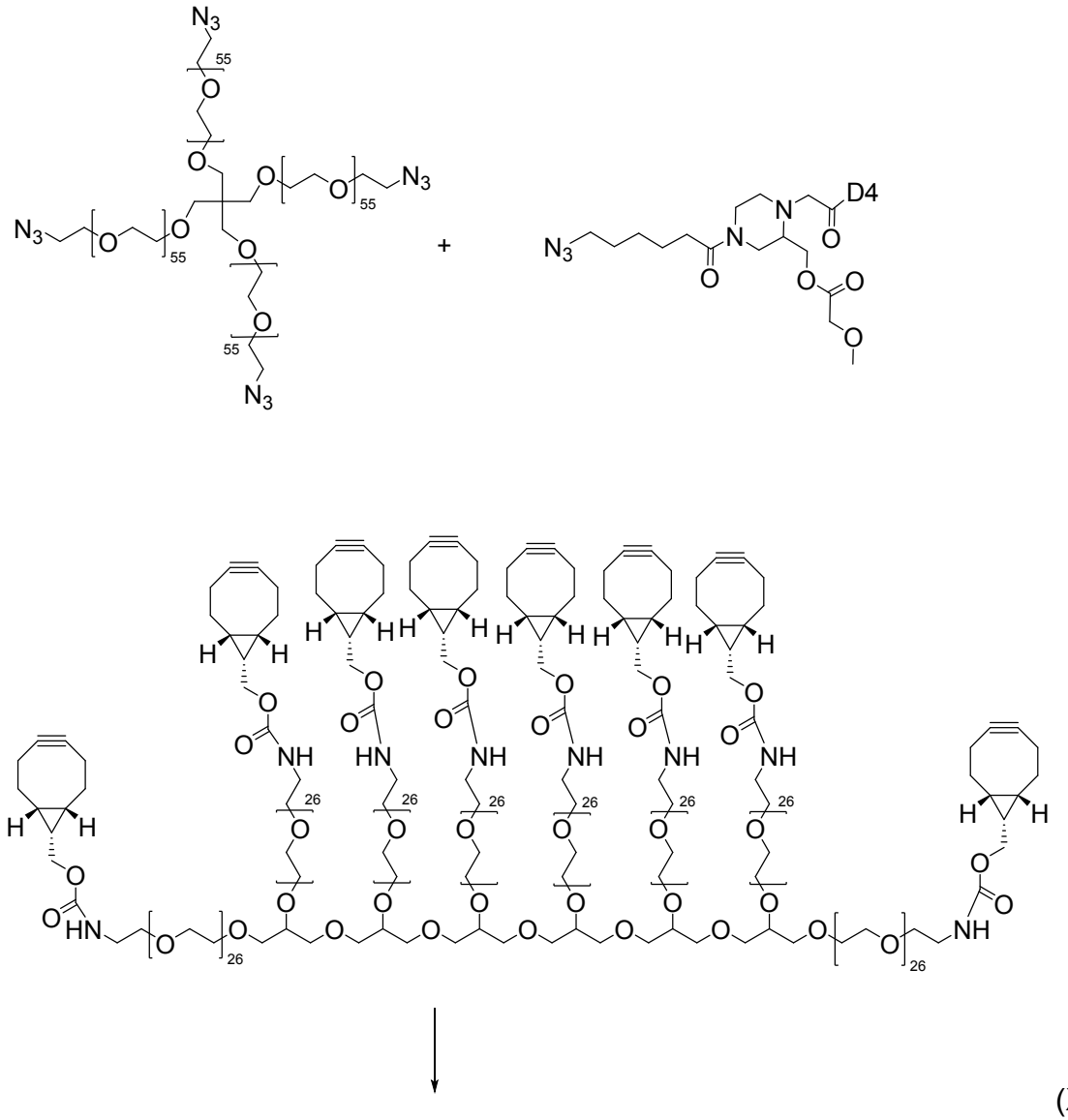
(XXI).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XXII) en tanto el fármaco es D2:



(XXII).

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos puede comprender la Fórmula (XXIII) en tanto el fármaco es D4:



(XXIII).

Conjugado de hidrogel-fármaco

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar enfermedades o trastornos usando los sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente. Otra forma de realización descripta en la presente se refiere al sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I) para uso como un medicamento. Otra forma de realización es el uso del sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardíaco, trastorno musculoesquelético, un trastorno ocular que incluye pero no se limita a degeneración macular húmeda relacionada con la edad, edema macular, oclusión de la rama venosa de la retina, oclusión de la vena central de la retina, glaucoma, Telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), retinopatía diabética proliferativa, uveítis, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), atrofia geográfica, degeneración macular seca relacionada con la edad, neovascularización, edema macular diabético o degeneración macular intermedia relacionada con la edad. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de los sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente pueden administrarse a un sujeto que lo necesite por vía inyectable. En un aspecto, la administración puede realizarse por inyección o implantación quirúrgica.

Una forma de realización descripta en la presente es un método para tratar trastornos oculares, que incluyen pero no se limitan a degeneración macular húmeda relacionada con la edad, edema macular, oclusión de la rama venosa de la retina, oclusión de la vena central de la retina, glaucoma, Telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), retinopatía diabética proliferativa, uveítis, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), atrofia geográfica, degeneración macular seca relacionada con la edad, neovascularización, edema macular diabético o degeneración macular intermedia relacionada con la edad, el método comprende administrar un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente, D–R, en donde D comprende ranibizumab, bevacizumab, brolucizumab (SEQ ID NO:4), ácido 5-(5,6,7,8-Tetrahidro-pirido[3,4-d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; ácido 5-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4 d] pirimidin-4-iloxi)-indol-1-carboxílico [5-(1-

metil-ciclopropil)-2*H*-pirazol-3-il]-amida; N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil) pirimidin-4-il)oxi)-1*H*-indol-1-carboxamida; (*S*)-5-(6-metil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-*d*] pirimidin-4-iloxi)-N-(5-(1-metilciclopropil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida, o combinaciones de los mismos. En un aspecto, la composición es una solución o suspensión que se inyecta en el ojo. En un aspecto, la inyección es una inyección intraocular (por ejemplo, una inyección intravítrea). En otro aspecto, la composición es un gel o una composición semisólida que se implanta en el ojo usando medios quirúrgicos o por inyección.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar trastornos musculoesqueléticos, que incluyen pero no se limitan regeneración de cartílagos, cicatrización de tendones, cicatrización de heridas, atrofia muscular bulboespinal, que comprende administrar un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente, D–R, en donde D comprende D2 (SEQ ID NO:5), una versión pegilada de D2, por ejemplo, D3 (SEQ ID NO:6), o una combinación de los mismos .

Otra forma de realización descripta en la presente se refiere al sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I), en donde D comprende D2 (SEQ ID NO:5), una versión pegilada de D2, por ejemplo, D3 (SEQ ID NO:6), o una combinación de los mismos para usar en el tratamiento de un trastorno cardíaco, trastorno musculoesquelético o un trastorno ocular que incluyen pero no se limitan a degeneración macular húmeda relacionada con la edad, edema macular, oclusión de la rama venosa de la retina, oclusión de la vena central de la retina, glaucoma, Telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), retinopatía diabética proliferativa, uveítis, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), atrofia geográfica, degeneración macular seca relacionada con la edad, neovascularización, edema macular diabético o degeneración macular intermedia relacionada con la edad. En un aspecto, la composición es una solución o suspensión que se inyecta en la articulación. En otro aspecto, la composición es un gel o composición semi-sólida que se implanta en la articulación utilizando medios quirúrgicos o mediante inyección de calibre grande. En otro aspecto, la composición está en forma de partículas que se inyectan en una articulación o en la proximidad de una

articulación. En otro aspecto, la composición se implanta en o alrededor de la articulación como una malla o gasa biodegradable que eventualmente se absorbe o procesa in situ. En otro aspecto, la composición se impregna en suturas, grapas, placas, mallas, o artículos similares que se utilizan durante la cirugía para volver a colocar o reparar tendones, ligamentos, cartílagos, huesos u otros componentes articulares después de un trauma o enfermedad.

Otra forma de realización descripta en la presente es un método para tratar un trastorno cardíaco, como insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) o preeclampsia, que comprende administrar un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente, D–R, en donde D comprende D4 (SEQ ID NO:7). En un aspecto, la composición es una solución o suspensión que se administra por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En otro aspecto, la composición es un gel o composición semi-sólida que se implanta utilizando medios quirúrgicos o inyección de calibre grande. En otro aspecto, la composición es un gel o composición semi-sólida que se aplica tópica o directamente a heridas cutáneas.

En una forma de realización, el sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente libera el agente biológicamente activo a una tasa de liberación particular. En un aspecto, la tasa de liberación puede ser ajustada o modulada por el componente "desencadenante" del ligante que no deja huellas, R. Sin limitarnos a ninguna teoría, se cree que la reacción del desencadenante en condiciones fisiológicas genera un grupo funcional nucleofílico, por ejemplo un grupo hidroxilo funcional que de forma intramolecular escinde el enlace amida que une el fármaco con el sistema de administración de fármacos. En una forma de realización, la reacción del desencadenante es una reacción de hidrólisis que resulta en la formación de un grupo

hidroxilo funcional. Sin limitarnos a ninguna teoría, se cree que el impedimento estérico del resto desencadenante se correlaciona con una reacción más lenta del desencadenante y la presencia y proximidad de grupos de extracción de electrones se correlaciona con una reacción más rápida del desencadenante.

En una forma de realización la vida media para la liberación del resto biológicamente activo es de aproximadamente 0.5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4, o más de 4 años. En un aspecto, la vida media de liberación del resto biológicamente activo es de aproximadamente 2.5 días, aproximadamente 4.5 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 31 días, aproximadamente 32 días, aproximadamente 40 días, aproximadamente 58 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 65 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 80 días, aproximadamente 125 días, aproximadamente 165 días, aproximadamente 380 días, aproximadamente 940 días, o aún más.

En una forma de realización la vida media para la hidrólisis del éster desencadenante del ligante que no deja huellas es de aproximadamente 0.5 horas,

aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4, o más de 4 años. En un aspecto, la vida media de la hidrólisis del éster del ligante que no deja huellas es de aproximadamente 1 día, aproximadamente 1.5 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 2.5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 32 días, aproximadamente 35 días, aproximadamente 40 días, aproximadamente 55 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 90 días, aproximadamente 120 días, aproximadamente 150 días, aproximadamente 180 días, aproximadamente 200 días, aproximadamente 300 días, aproximadamente 400 días, o aún más.

En otra forma de realización la vida media para el aclaramiento del sistema de administración de fármacos, $R–R^{11}$, luego de la liberación del fármaco, D (por ejemplo, $D–R–R^{11} \rightarrow R–R^{11} + D$), del tejido, órgano, o compartimento en el que el sistema de administración de fármacos fuera dosificado es de aproximadamente 0.5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas,

aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4, o más de 4 años.

Otras formas de realización descriptas en la presente son composiciones farmacéuticas que comprenden el sistema de administración de fármacos, D–R–R^{11}, de acuerdo con lo descripto en la presente. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para inyección o implantación en un sujeto que las necesita.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por inyección o implantación incluyen soluciones acuosas estériles, suspensiones, dispersiones y polvos o liofilatos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, solución de Ringer o agua para inyección. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el portador relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, tampones, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula

requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, aminoácidos, sorbitol, cloruro de sodio, o combinaciones de los mismos en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente 0.1-75%, o contienen aproximadamente 1-50%, del ingrediente activo.

Las soluciones o suspensiones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el sistema de administración de fármacos en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las soluciones o suspensiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril tal como PBS estéril y cualquier excipiente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

También son posibles los medios de administración transmucosal o transdérmica. Las composiciones adecuadas para la aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un agente biológicamente activo con un portador adecuado. Los portadores adecuados para el suministro transdérmico incluyen solventes absorbibles

farmacológicamente aceptables para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos tienen la forma de un vendaje que comprende un elemento de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con portadores, opcionalmente una barrera de control de velocidad para administrar el compuesto de la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un período prolongado período de tiempo y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

Las composiciones adecuadas para aplicación tópica, por ejemplo, en la piel, ojos, o articulaciones, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, pomadas, cremas, geles o formulaciones pulverizables, por ejemplo, para administración por aerosol o similares. Tales sistemas de administración tópica serán en particular apropiados para la aplicación dérmica. Por lo tanto, son particularmente adecuados para su uso en formulaciones tópicas, incluidas las cosméticas, bien conocidas en la técnica. Estos pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones o conservantes.

De acuerdo con la presente, la aplicación tópica también puede ser por inhalación o una aplicación intranasal. Se pueden administrar convenientemente en forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, una partícula de componentes mezclados, por ejemplo con fosfolípidos) desde un inhalador de polvo seco o un aerosol desde un envase presurizado, bomba, spray, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

Además se describen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la cual las composiciones descriptas como ingredientes activos se descompondrán. Dichos agentes, a los que se hace referencia en la presente como "estabilizadores", incluyen, entre otros, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones de sal, etc.

La cantidad efectiva de una composición farmacéutica a ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. El experto en la técnica advertirá que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo, en parte, del agente terapéutico incorporado en el sistema de administración de fármacos, la indicación para la cual se utiliza el sistema de administración de fármacos, la vía de administración, y el tamaño

(peso corporal, superficie corporal, tamaño del órgano) y el estado (edad y estado general de salud) del paciente. En consecuencia, el médico podrá valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente terapéutico incorporado en el sistema de administración de fármacos que se esté utilizando. Típicamente, el médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada es realizado rutinariamente por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. Las dosis apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

El sistema de administración de fármacos puede prepararse como soluciones o suspensiones de micropartículas. En un aspecto, el portador se forma en micropartículas que pueden administrarse mediante una jeringa estándar al tejido diana, por ejemplo, administración subcutánea, intravítrea, intraarticular, intra tendinosa o intramuscular. Dichas partículas pueden tener una distribución de tamaño de partícula medio de entre 1 μm y 5000 μm. Otros aspectos comprenden gasas, mallas o suturas biodegradables impregnadas con el sistema de administración de fármacos de acuerdo con el descripto en la presente.

En algunas formas de realización, las micropartículas de los sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente se pueden producir por polimerización en emulsión, litografía, centrifugación, moldeo, secado por pulverización, molienda, extrusión, trituración mecánica, o procedimientos similares conocidos en la técnica. En una forma de realización, los sistemas de administración de fármacos, los polímeros portadores, o los hidrogeles de acuerdo con el descripto en la presente se pueden dividir en micropartículas por extrusión a través de una o más mallas. En un aspecto, la extrusión se puede repetir varias veces y/o a través de mallas sucesivamente más pequeñas para lograr el tamaño de distribución de partículas deseado.

En una forma de realización, basándose en la difracción láser para medir el tamaño de partícula, el sistema de administración de fármacos tiene una distribución de tamaño de partícula medio de entre 1 μm y 5000 μm al suspenderse en un tampón de formulación acuoso isotónico. En algunos aspectos, el sistema de administración de fármacos tiene una distribución de tamaño de partícula medio de entre 10 μm y 1000 μm al suspenderse en tampón isotónico. En otro aspecto, el sistema de administración de fármacos tiene una distribución de tamaño de partícula medio de entre 50 μm y 500 μm al suspenderse en un tampón acuoso isotónico. En otro aspecto, el sistema de administración de fármacos tiene una distribución de tamaño de partícula medio de entre 100 μm y 300 μm al suspenderse en un tampón acuoso isotónico. En otro aspecto, el sistema de administración de fármacos tiene una distribución de tamaño de partícula medio de entre 200 μm y 300 μm al suspenderse en un tampón acuoso isotónico. En algunas formas de realización, la distribución de tamaño de partícula medio comprende aproximadamente 10 μm, aproximadamente 50 μm, aproximadamente 100 μm, aproximadamente 150 μm, aproximadamente 200 μm, aproximadamente 250 μm, aproximadamente 300 μm, aproximadamente 350 μm, aproximadamente 400 μm, aproximadamente 450 μm, aproximadamente 500 μm, aproximadamente 750 μm, aproximadamente 1000 μm, aproximadamente 1500 μm, aproximadamente 2000 μm, aproximadamente 2500 μm, o aproximadamente 5000 μm.

El tamaño de partículas puede determinarse usando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para medir las distribuciones de tamaño de partícula de las partículas del sistema de administración de fármacos pueden incluir análisis de difracción láser, dispersión de luz (por ejemplo, dispersión dinámica de luz), análisis de imagen de partículas microscópicas, elutriación, o espectrometría de masas en aerosol. La muestra de partículas del sistema de administración de fármacos puede medirse como una muestra seca o una muestra húmeda. Se puede utilizar cualquier instrumento comercial para medir el tamaño de partículas, incluidos los instrumentos de Cilas; Brookhaven Instruments Corporation; Malvern Instruments; Horiba Scientific; o Wyatt siguiendo los procedimientos operativos recomendados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El tamaño de partículas medido usando las técnicas descriptas en la presente puede expresarse como un diámetro derivado con una distribución normal o distribución no normal con una media, mediana (por ejemplo, diámetro medio de masa) y modo de tamaños de diámetro de partícula. La distribución de tamaño de partícula puede expresarse como una distribución de diámetro en número, una distribución de área de superficie, o una distribución de volumen de partículas. La distribución media del tamaño de partícula puede calcularse y expresarse de varias maneras, como el diámetro medio del volumen (D [4,3] o d43), el diámetro medio del área de superficie (D[3,2] o d_{32}) o el diámetro medio de partícula en número (D[1,0] o d_{10}). Debido a que los valores de distribución de tamaño de partícula varían según la metodología de medición y la forma en que se expresa la distribución, la comparación de diferentes distribuciones de tamaño de partícula medio debe calcularse con la misma metodología para obtener una comparación precisa. Por ejemplo, una muestra con un diámetro medio en volumen medido y calculado debe compararse con una segunda muestra que tiene un diámetro medio en volumen medido y calculado, idealmente medido usando el mismo instrumento de medición en las mismas condiciones. Por lo tanto, las distribuciones específicas de tamaño de partícula descriptas en la presente no se limitan a ningún tipo de método para medir o calcular una distribución de tamaño de partícula (por ejemplo, una distribución de diámetro en número, una distribución de área de superficie, o una distribución de volumen de partículas), sino que indican los valores de tamaño de partícula y las distribuciones de los mismos para cada método de medición de tamaño de partículas que se describe en la presente.

En una forma de realización los sistemas de administración de fármacos pueden inyectarse a través de una aguja con menos de 0.6 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 20), preferentemente a través de una aguja con menos de 0.3 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 25), con mayor preferencia a través de una aguja con menos de 0.25 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 27), aún con mayor preferencia a través de una aguja con menos de 0.2 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 28), y aún con mayor preferencia a través de una aguja con menos de 0.16 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 30). En una forma de realización, cuando los sistemas de administración de fármacos se administran por vía intraocular o intravítrea con una aguja

de menos de 0.16 mm de diámetro interno (por ejemplo, calibre 30–34) preferentemente. Por ejemplo cuando una distribución de tamaño de partícula de un sistema de administración de fármacos de 100 µm a 300 µm se inyecta una aguja calibre 20 puede ser óptima para la administración. Sin embargo, debido a que la morfología de las partículas es flexible, los tamaños de aguja más finos que el tamaño de partícula del sistema de administración de fármacos pueden usarse con éxito.

Las frases y los términos "pueden inyectarse", "inyectable" o "inyectabilidad" se refieren a una combinación de factores como cierta fuerza aplicada al émbolo de una jeringa conteniendo los sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente expandidos en un líquido a cierta concentración (w/v) y a cierta temperatura, una aguja de un diámetro interno dado conectada a la salida de dicha jeringa, y el tiempo requerido para extruir un cierto volumen del sistema de administración de fármacos desde la jeringa a través de la aguja.

En una forma de realización, se realiza una medición de inyectabilidad para el sistema de administración de fármacos suspendido en PBS o solución salina fisiológica a una concentración de aproximadamente 0.1% y aproximadamente 20% (p/v) incluyendo todos los enteros dentro del rango de porcentaje especificado.

En consecuencia, los sistemas de administración de fármacos tienen el efecto beneficioso de una tasa de liberación controlada con respecto al fármaco liberado D–H. Preferiblemente, se obtiene una tasa de liberación sostenida. La liberación sostenida significa que los intervalos de administración de los respectivos sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente se prolongan en comparación con la administración del medicamento en ausencia del sistema de administración de fármacos. Por ejemplo, los sistemas de administración de fármacos que se basan en medicamentos comúnmente administrados una o varias veces al día proporcionan niveles terapéuticamente efectivos durante al menos tres días, al menos una semana, durante al menos un mes, durante varios meses, o durante años.

Otra forma de realización descripta en la presente es una composición farmacéutica de los sistemas de administración de fármacos descriptos en la presente. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más excipientes, tales como:

(i) Agentes tamponantes: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un rango deseado, como fosfato de sodio, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También es posible usar antiácidos como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad de tamponado se puede ajustar para que coincida con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

(ii) Modificadores de la isotonicidad: para minimizar el dolor que puede resultar del daño celular debido a las diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección. La glicerina y el cloruro de sodio son ejemplos. Las concentraciones efectivas pueden determinarse mediante osmometría utilizando una osmolalidad supuesta de 285-315 mOsmol/kg para suero.

(iii) Conservantes y/o antimicrobianos: las preparaciones parenterales multidosis pueden requerir la adición de conservantes a una concentración suficiente para minimizar el riesgo de que los sujetos se infecten tras la inyección y se han establecido los requisitos reglamentarios correspondientes. Los conservantes típicos incluyen m-cresol, fenol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato de fenilmercurio, timerosol, ácido sórbico, sorbato de potasio, ácido benzoico, clorocresol y cloruro de benzalconio.

(iv) Estabilizadores: La estabilización se logra mediante el fortalecimiento de las fuerzas estabilizadoras de proteínas, mediante la desestabilización del estado desnaturalizado, o mediante la unión directa de los excipientes a la proteína. Los estabilizadores pueden ser aminoácidos como alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, azúcares como glucosa, sacarosa, trehalosa, polioles como glicerol, manitol, sorbitol, sales como fosfato de potasio, sulfato de sodio, quelantes agentes como EDTA, hexafosfato, ligandos como iones metálicos divalentes (zinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas como los derivados fenólicos. Además, pueden usarse oligómeros o polímeros tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, polietilen glicol, polivinilpirrolidona, protamina, o albúmina de suero humano.

(v) Agentes antiabsorción: se utilizan principalmente tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles para recubrir o adsorber competitivamente la superficie interna del envase de la composición, por ejemplo, poloxámero (Pluronic F-68), PEG dodecil éter (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilen glicol, PEG-polihistidina, BSA y HSA y gelatinas. La concentración elegida y el tipo de excipiente dependen del efecto a evitar, pero típicamente, se forma una monocapa de tensioactivo en la interfaz justo por encima del valor CMC.

(vi) Liofilización o crioprotectores: durante el secado por congelación o pulverización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizadores causados por la ruptura del enlace de hidrógeno y la eliminación de agua. Para este propósito, se pueden usar azúcares y polioles, pero también se han observado los efectos positivos correspondientes para surfactantes, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trehalosa es particularmente eficiente para reducir la agregación inducida por la humedad y también mejora la estabilidad térmica potencialmente causada por la exposición de los grupos hidrófobos de proteínas al agua. También se pueden usar manitol y sacarosa, ya sea como único lio/crioprotector o en combinación entre sí, sabiéndose que las proporciones más altas de manitol o sacarosa mejoran la estabilidad física de una torta liofilizada. El manitol también se puede combinar con trehalosa. La trehalosa también se puede combinar con sorbitol o se puede usar sorbitol como único protector. También se puede usar almidón o derivados de almidón.

(vii) Agentes de protección contra la oxidación: antioxidantes como ácido ascórbico, ectoina, metionina, glutationa, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), propil galato, vitamina E, agentes quelantes como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico.

(viii) Viscosificadores o potenciadores de la viscosidad: retardan la sedimentación de las partículas en el vial y la jeringa y se utilizan para facilitar el mezclado y la resuspensión de las partículas y hacer que la suspensión sea más fácil de inyectar (es decir, poca fuerza sobre el émbolo de la jeringa). Los viscosificadores o potenciadores de la viscosidad adecuados son, por ejemplo,

viscosificadores de carbómero como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o celulosa de dietilaminoetilo (DEAE o DEAE-C), silicato de magnesio coloidal (Veegum) o silicato de sodio, gel de hidroxiapatita, gel de fosfato tricálcico, xantanos, carragenanos como Satiagum UTC 30, poli (hidroxiácidos) alifáticos, tales como ácodo (D,L- o L-) poliláctico (PLA) y ácido (poli)glicólico (PGA) y sus copolímeros (PLGA), terpolímeros de D, L-lactida, glicólido y caprolactona, poloxámeros, bloques de poli (oxietileno) hidrófilos y bloques de poli (oxipropileno) hidrofóbicos para formar un tribloque de poli (oxietileno)-poli (oxipropileno)-poli (oxietileno) (por ejemplo, Pluronic.™), copolímero de poliéterester, tal como un copolímero de polietilen glicol tereftalato/polibutilen tereftalato, isobutirato de acetato de sacarosa (SAIB), dextrano o derivados de los mismos, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, quitosano, alcohol polivinílico (PVA) y derivados, polialquilimidas, poli (acrilamida-co-dialildimetil amonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glicosaminoglicanos (GAGs) tales como dermatán sulfato, condroitín sulfato, keratan sulfato, heparina, heparán sulfato, hialuronano, copolímeros en tribloque ABA o en bloque AB compuestos de bloques A hidrófobos, como polilactida (PLA) o poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), y bloques B hidrofílicos, como polietilen glicol (PEG) o polivinil pirrolidona. Tales copolímeros de bloque, así como los poloxámeros mencionados anteriormente, pueden exhibir un comportamiento de gelificación térmica inversa (estado fluido a temperatura ambiente para facilitar la administración y el estado del gel por sobre la temperatura de transición sol-gel a la temperatura corporal después de la inyección).

(ix) Agentes de difusión: modifican la permeabilidad del tejido conectivo a través de la hidrólisis de componentes de la matriz extracelular en el espacio intersticial como, entre otros, el ácido hialurónico, un polisacárido que se encuentra en el espacio intercelular del tejido conectivo. Un agente de propagación tal como, pero no limitado a, hialuronidasa disminuye temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular y promueve la difusión de los fármacos inyectados.

(x) Otros agentes auxiliares: como agentes humectantes, modificadores de viscosidad, antibióticos, hialuronidasa. Los ácidos y bases como el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio son agentes auxiliares necesarios para el ajuste del pH durante la preparación.

El sistema de administración de fármacos puede proporcionarse como un líquido, una suspensión, o como una composición seca.

En una forma de realización, el sistema de administración de fármacos es una composición seca. Los métodos adecuados de secado son, por ejemplo, secado por pulverización y liofilización (secado por congelamiento). En un aspecto, el sistema de administración de fármacos se seca por liofilización.

En una forma de realización, el sistema de administración de fármacos es suficientemente dosificado en la composición para proporcionar cantidades terapéuticamente efectivas de agente biológicamente activo durante por lo menos 12 horas en una aplicación. En un aspecto, una aplicación del sistema de administración de fármacos es suficiente durante aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, un año, 2 años, 3 años, 4 años, o aún más.

En una forma de realización, el sistema de administración de fármacos se proporciona como una dosis única, lo que significa que el envase en el que se suministra contiene una dosis farmacéutica.

En otra forma de realización, la composición se proporciona como una composición de dosis múltiple, lo que significa que contiene más de una dosis terapéutica. Preferiblemente, una composición de dosis múltiple contiene al menos 2 dosis. Tales dosis múltiples de los sistemas de administración de fármacos pueden usarse para diferentes sujetos que lo necesiten o están destinados a usarse en un sujeto, en donde las dosis restantes se almacenan después de la aplicación de la primera dosis hasta que se necesiten.

En otra forma de realización, el sistema de administración de fármacos está contenido en uno o más envases. Para composiciones líquidas o en suspensión, el

envase es preferentemente una jeringa de cámara única. Para composiciones secas, preferentemente el envase es una jeringa de doble cámara. La composición seca se proporciona en una primera cámara de la jeringa de doble cámara y la solución de reconstitución se proporciona en una segunda cámara de la jeringa de doble cámara.

Antes de aplicar el sistema de administración de fármacos seco a un sujeto que lo necesite, la composición seca se reconstituye. La reconstitución puede tener lugar en el envase en el que se proporciona el sistema de administración de fármacos seco, como un vial, una jeringa, una jeringa de doble cámara, una ampolla y un cartucho. La reconstitución se realiza agregando una cantidad predefinida de solución de reconstitución a la composición seca. Las soluciones de reconstitución son líquidos estériles, como solución salina tamponada con fosfato, solución salina isotónica, el agua para inyección u otros tampones, que pueden contener excipientes adicionales, como conservantes y/o antimicrobianos, como, por ejemplo, alcohol bencílico y cresol. Preferentemente, la solución de reconstitución es una solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica estéril. Alternativamente, la solución de reconstitución es agua estéril para inyección.

Otra forma de realización es un método de preparar una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un sistema de administración de fármacos, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, el método comprende la etapa de poner en contacto la composición con un volumen de vehículo de reconstitución. El sistema de administración de fármacos reconstituido se puede administrar por inyección u otras vías.

Otra forma de realización es una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un sistema de administración de fármacos, un vehículo de reconstitución, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otra forma de realización es una jeringa precargada que comprende una solución o una suspensión que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un sistema de administración de fármacos, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, la jeringa se llena con entre aproximadamente 0.01 mL y aproximadamente 5 mL de un sistema de administración de

fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. En un aspecto, la jeringa se llena con entre aproximadamente 0.05 mL y aproximadamente 5 mL, entre aproximadamente 1 mL y aproximadamente 2 mL, entre aproximadamente 0.1 mL y aproximadamente 0.15 mL, entre aproximadamente 0.1 mL y aproximadamente 0.5 mL, entre aproximadamente 0.15 mL y aproximadamente 0.175 mL, o entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 5 mL. En una forma de realización, la jeringa se llena con 0.165 mL de un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. En algunos aspectos, una jeringa se llena con aproximadamente 0.01 mL, aproximadamente 0.02 mL, aproximadamente 0.03 mL, aproximadamente 0.04 mL, aproximadamente 0.05 mL, aproximadamente 0.06 mL, aproximadamente 0.07 mL, aproximadamente 0.08 mL, aproximadamente 0.09 mL, aproximadamente 0.1 mL, aproximadamente 0.2 mL, aproximadamente 0.3 mL, aproximadamente 0.4 mL, aproximadamente 0.5 mL, aproximadamente 0.6 mL, aproximadamente 0.7 mL, aproximadamente 0.8 mL, aproximadamente 0.9 mL, aproximadamente 1 mL, aproximadamente 1.2 mL, aproximadamente 1.5 mL, aproximadamente 1.75 mL, aproximadamente 2 mL, aproximadamente 2.5 mL, aproximadamente 3 mL, aproximadamente 4 mL, o aproximadamente 5 mL de un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. Una jeringa a menudo se llena con más de la dosis deseada que se administrará al paciente, para tener en cuenta el desperdicio debido al "espacio muerto" dentro de la jeringa y la aguja. También puede haber una cantidad predeterminada de desperdicio cuando el médico prepara la jeringa, de modo que esté lista para inyectar al paciente.

En una forma de realización, una jeringa se llena con un volumen de dosificación (es decir, el volumen de medicamento destinado a la administración al paciente) de entre aproximadamente 0.01 mL y aproximadamente 5 mL de acuerdo con la vía de inyección (por ejemplo, entre aproximadamente 0.01 mL y aproximadamente 0.1 mL, entre aproximadamente 0.1 mL y aproximadamente 0.5 mL, entre aproximadamente 0.2 mL y aproximadamente 2 mL, entre aproximadamente 0.5 mL y aproximadamente 5 mL, o entre aproximadamente 1 mL y aproximadamente 5 mL) de un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. En una forma de realización destinada a inyección intravítrea, una jeringa se llena con un volumen de dosificación de

entre aproximadamente 0.01 mL y aproximadamente 0.1 mL de un sistema de administración de fármacos en solución o suspensión con una concentración de fármaco de 1 mg/mL a 40 mg/mL de acuerdo con lo descripto en la presente. En una forma de realización destinada a inyección intraarticular, una jeringa se llena con un volumen de dosificación de entre aproximadamente 0.05 mL y aproximadamente 5.0 mL de un sistema de administración de fármacos en solución o suspensión con una concentración de fármaco de 1 mg/mL a 40 mg/mL de acuerdo con lo descripto en la presente. En una forma de realización destinada a inyección subcutánea, una jeringa se llena con un volumen de dosificación de entre aproximadamente 0.1 mL y aproximadamente 5.0 mL de un sistema de administración de fármacos en solución o suspensión con una concentración de fármaco de 0.1 mg/mL a 40 mg/mL de acuerdo con lo descripto en la presente. En otras formas de realización destinadas a inyección por otras vías, una jeringa se llena con un volumen de dosificación de entre aproximadamente 0.01 mL y aproximadamente 5.0 mL de un sistema de administración de fármacos en solución o suspensión con una concentración de fármaco de 0.1 mg/mL a 40 mg/mL de acuerdo con lo descripto en la presente. En algunos aspectos, una jeringa se llena con aproximadamente 0.01 mL, aproximadamente 0.02 mL, aproximadamente 0.03 mL, aproximadamente 0.04 mL, aproximadamente 0.05 mL, aproximadamente 0.06 mL, aproximadamente 0.07 mL, aproximadamente 0.08 mL, aproximadamente 0.09 mL, aproximadamente 0.1 mL, aproximadamente 0.2 mL, aproximadamente 0.3 mL, aproximadamente 0.4 mL, aproximadamente 0.5 mL, aproximadamente 0.6 mL, aproximadamente 0.7 mL, aproximadamente 0.8 mL, aproximadamente 0.9 mL, aproximadamente 1 mL, aproximadamente 1.2 mL, aproximadamente 1.5 mL, aproximadamente 1.75 mL, aproximadamente 2 mL, aproximadamente 2.5 mL, aproximadamente 3 mL, aproximadamente 4 mL, o aproximadamente 5 mL de un sistema de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente para administrarlos a un paciente que lo necesite.

Dado que la jeringa contiene una solución de medicamento, la salida puede sellarse reversiblemente para mantener la esterilidad del medicamento. Este sellado puede lograrse mediante un dispositivo de sellado conocido en la técnica, tal como un cierre Luer o un sello resistente a la manipulación.

Otra forma de realización es un kit que comprende una o más jeringas precargadas que comprenden una solución o suspensión de uno o más los sistemas de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. En una forma de realización, este kit comprende una jeringa precargada que comprende los sistemas de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente en un blíster o una funda sellada. El blíster o la funda pueden ser estériles por dentro. En un aspecto, las jeringas precargadas de acuerdo con lo descripto en la presente pueden colocarse dentro de dichos blíster o fundas antes de someterse a la esterilización, por ejemplo, esterilización terminal.

Este kit puede comprender además una o más agujas para la administración de los sistemas de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto en la presente. Cuando el sistema de administración de fármacos ha de ser administrado por vía intravítrea, es común usar una aguja de calibre 30 × ½ pulgada, aunque se pueden usar agujas de calibre 31 o 32. Para la administración intravítrea, se pueden utilizar alternativamente agujas de calibre 33 o de calibre 34. Dichos kits pueden comprender además instrucciones de uso, una etiqueta de medicamento, contraindicaciones, advertencias u otra información relevante. Una forma de realización descripta en la presente es una caja de cartón o paquete que comprende una o más jeringas precargadas con uno o más sistemas de administración de fármacos de acuerdo con lo descripto contenidas dentro de un blíster, una aguja y opcionalmente instrucciones para la administración, una etiqueta de medicamento, contraindicaciones, advertencias u otra información relevante.

Se puede usar un proceso de esterilización terminal para esterilizar la jeringa y dicho proceso puede usar un proceso conocido como un proceso de esterilización con óxido de etileno o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las agujas que se utilizarán con la jeringa se pueden esterilizar por el mismo método que los kits aquí descriptos. En un aspecto, un envase se expone al gas esterilizante hasta que el exterior de la jeringa esté estéril. Después de tal proceso, la superficie externa de la jeringa puede permanecer estéril (mientras está en su blíster) por hasta 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses o más. Así, en una forma de realización, una jeringa precargada de acuerdo con lo descripto en la presente (en su blíster) puede tener una vida útil de hasta

6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, o aún más. En una forma de realización, menos de una jeringa en un millón tiene presencia microbiana detectable en el exterior de la jeringa después de 18 meses de almacenamiento. En un aspecto, la jeringa precargada se ha esterilizado con óxido de etileno con un nivel de garantía de esterilidad de al menos 10^{-6}. En otro aspecto, la jeringa precargada se ha esterilizado con peróxido de hidrógeno con un nivel de garantía de esterilidad de al menos 10^{-6}. No deben ingresar cantidades significativas de gas esterilizante en la cámara de volumen variable de la jeringa. El término “cantidades significativas” de acuerdo con el presente, se refiere a una cantidad de gas que causaría una modificación inaceptable de la solución o suspensión del sistema de administración de fármacos dentro de la cámara de volumen variable. En una forma de realización, el proceso de esterilización provoca la alquilación de ≤10% (específicamente ≤5%, ≤3%, ≤1%) del sistema de administración de fármacos. En una forma de realización, la jeringa precargada se ha esterilizado con óxido de etileno, pero la superficie exterior de la jeringa tiene ≤1 ppm, preferentemente ≤0,2 ppm de residuo de óxido de etileno. En una forma de realización, la jeringa precargada se ha esterilizado con peróxido de hidrógeno, pero la superficie exterior de la jeringa tiene ≤1 ppm, y ≤0,2 ppm de residuo de peróxido de hidrógeno. En otra forma de realización, la jeringa precargada se ha esterilizado con óxido de etileno, y el residuo total de óxido de etileno que se encuentra en el exterior de la jeringa y en el interior del blíster es ≤0,1 mg. En otra forma de realización, la jeringa precargada se ha esterilizado con peróxido de hidrógeno y el residuo de peróxido de hidrógeno total que se encuentra en el exterior de la jeringa y en el interior del blíster es ≤0,1 mg.

Otro aspecto es un kit de piezas. Para composiciones líquidas y en suspensión, y cuando el dispositivo de administración es simplemente una jeringa hipodérmica, el kit puede comprender la jeringa, una aguja y un recipiente que comprende la composición del sistema de administración de fármacos para usar con la jeringa. En el caso de una composición seca, el recipiente puede tener una cámara que contenga la composición seca del sistema de administración de fármacos, y una segunda cámara que comprenda una solución de reconstitución. En una forma de realización, el dispositivo de inyección es una jeringa hipodérmica adaptada para que el recipiente separado con la composición del sistema de administración de fármacos pueda acoplarse al dispositivo de inyección

de modo que, en uso, el líquido o la suspensión o la composición seca reconstituida en el recipiente esté en conexión fluida con la salida del dispositivo de inyección. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen entre otros jeringas hipodérmicas y dispositivos inyectores de pluma. Los dispositivos de inyección particularmente preferidos son los inyectores de pluma, en cuyo caso el recipiente es un cartucho, específicamente un cartucho descartable.

Otra forma de realización comprende un kit que comprende una aguja y un recipiente conteniendo la composición de sistema de administración de fármacos y opcionalmente además una solución de reconstitución, el recipiente está adaptado para usarse con la aguja. En un aspecto, el recipiente es una jeringa precargada. En otro aspecto, el recipiente es una jeringa de doble cámara.

Otra forma de realización es un cartucho conteniendo una composición del sistema de administración de fármacos antes descripto para usar con un dispositivo inyector de pluma. El cartucho puede contener una dosis única o una pluralidad de dosis del sistema de administración de fármacos.

En otra forma de realización la solución o suspensión del sistema de administración de fármacos comprende un sistema de administración de fármacos y uno o más excipientes, y también otros agentes biológicamente activos, ya sea en su forma libre o como fármacos o en combinación con otros sistemas de administración de fármacos como fármacos pegilados o fármacos unidos a hidrogel. En un aspecto, estos uno o más agentes biológicamente activos adicionales están en forma libre o forman parte de un segundo sistema de administración de fármacos.

En otra forma de realización, uno o más de los sistemas de administración de fármacos se administran simultáneamente, con cada sistema de administración de fármacos que tiene actividades biológicas separadas o relacionadas.

En una forma de realización alternativa, el sistema de administración de fármacos se combina con un segundo compuesto biológicamente activo de tal manera que el sistema de administración de fármacos sea administrado a un sujeto que lo necesite primero, seguido por la administración del segundo compuesto. Alternativamente, la composición del sistema de administración de fármacos se administra a un sujeto que lo necesita después de que se haya administrado otro compuesto al mismo sujeto.

Otra forma de realización es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I) para uso como un medicamento.

Otra forma de realización es un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I) para usar en el tratamiento de un trastorno musculoesquelético.

Otra forma de realización es el uso del sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende D-R representado por la Fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una trastornos musculoesqueléticos.

Otra forma de realización es un sistema de administración de fármacos o una composición farmacéutica para usar en un método de tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos que pueden ser tratados por el resto biológicamente activo liberado del sistema de administración de fármacos.

Otra forma de realización es un método de preparación de una solución o suspensión del sistema de administración de fármacos. En una forma de realización, está composición se prepara de la siguiente forma:

(i) se mezcla el sistema de administración de fármacos con uno o más excipientes;

(ii) se transfieren cantidades de la composición líquida o en suspensión equivalente a dosis únicas o múltiples en envases adecuados; y

(iii) se sellan los envases.

Otra forma de realización es el método de preparación de una composición seca de un sistema de administración de fármacos. En una forma de realización, está composición se prepara de la siguiente forma:

(i) se mezcla el sistema de administración de fármacos con uno o más excipientes;

(ii) se transfieren cantidades equivalentes a dosis únicas o múltiples en envases adecuados;

(iii) se seca la composición en dichos envases; y

(iv) se sellan los envases.

Los envases adecuados son viales, jeringas, jeringas de doble cámara, ampollas y cartuchos.

Otra forma de realización es un método para la síntesis de un sistema de administración de fármacos o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se ha definido. Los sistemas de administración de fármacos o precursores de los sistemas de administración de fármacos pueden prepararse por métodos conocidos o de acuerdo con las secuencias de reacción descriptas a continuación. Los materiales de partida utilizados en la preparación (síntesis) de los sistemas de administración de fármacos o precursores de los mismos son conocidos o están disponibles comercialmente, o pueden prepararse por métodos conocidos o según lo descripto seguidamente.

Los expertos en la técnica advertirán la posibilidad de introducir diversas modificaciones y adaptaciones a las composiciones, métodos, y aplicaciones descriptas en la presente sin apartarse del alcance de las formas de realización o aspectos de la misma. Las composiciones y métodos provistos son ejemplos y no pretenden limitar el alcance de ninguna de las formas de realización especificadas. Todas las formas de realización, aspectos y opciones divulgadas pueden combinarse con cualquiera y todas las variantes o iteraciones. El alcance de las composiciones, formulaciones, métodos y procesos descriptos en la presente incluye todas las combinaciones reales o potenciales de las formas de realización, aspectos, opciones, ejemplos y preferencias aquí descriptas.

EJEMPLOS

Abreviaturas

Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ac_2O	Anhídrido acético
aq.	Acuoso
Atm	Atmósfera
Boc, BOC	carboxi butilo *terciario*
Boc-anhídrido	di-*terc*-butil dicarbonato
$(Boc)_2O$, $(BOC)_2O$	di-*terc*-butil dicarbonato
br.	Ancho
BSA	albúmina de suero bovino
BuOH	Butanol
CAD	detector de aerosol cargado
calcd.	Calculado
Cat, cat	Catalítico
CBZ, Cbz	Carbobenciloxi
$Cu(OTf)_2$	trifluorometanosulfonato de cobre (II)
d	Doblete
dd	doblete de dobletes
DCM	Diclorometano
DIAD	diisopropil azodicarboxilato
DIPEA, DIEA	*N*,*N*-diisopropiletilamina
DMAP	4,4-dimetilaminopiridina
DMF	*N*,*N*-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSY-NMR	RMN Ordenada por Difusión Unidimensional
ECL	Electroquimioluminiscencia
Análisis Elemental.	Análisis elemental
ELSD	detector evaporativo de dispersión de luz
EDC·HCl	*N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida clorhidrato
ESI	ionización por electropulverización
EtOAc, AcOEt	etil acetato
Et	Etilo
EtOH	Etanol
FCC	cromatografía en columna instantánea
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	Gramos
G	Calibre

h	Hora/s
HATU	2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)--1,1,3,3-tetrametil uronium hexafluorofosfato metanaminio
HC	Condición de HPLC
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IPA	2-propanol
IR	espectroscopia infrarroja
i o iso	Iso
IVT, ivt	Intravítreo
K_2CO_3	Carbonato de potasio
kD, kDa	Kilodalton
L	Litro/s
LCMS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
M	Molar
MHz	mega Hertz
m	Multiplete
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg	Miligramo/s
µg	Microgramo
mM	Milimolar
mm	Milímetro/s
min	Minutos
mL	Mililitro/s
mmol	Milimoles
µL	Microlitro
µmol	Micromoles
MOPS	Ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico
MS	espectrometría de masas
MsCl	cloruro de metanesulfonilo
MsOH	ácido metanosulfónico
MWCO	corte de peso molecular
m/z	relación masa a carga
N	Normal
NA	No disponible
$NaBH_4$	borohidruro de sodio
$NaBH_3CN$	cianoborohidruro de sodio
$Na(AcO)_3BH$	triacetoxiborohidruro de sodio

ng	Nanogramo
NH_4Cl	Cloruro de amonio
NHS	N-hidroxisuccinimida
nM	Nanomolar
NMR	resonancia magnética nuclear
OMe	Metoxi
PBS	solución salina tamponada con fosfato
1× PBS	solución salina tamponada con fosfato, típicamente aproximadamente 10 mM PO_4^{3-}
Pd/C	paladio sobre carbono
$Pd(dppf)Cl_2$	1,1′-bis(difenilfosfino)ferroceno- dicloruro de paladio (II)
$Pd(dppf)Cl_2•CH_2Cl_2$	1,1′-bis(difenilfosfino)ferroceno-dicloruro de paladio (II) aducto complejo de diclorometano
$Pd(PPh_3)_4$	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
Ph	Fenilo
ppm	partes por millón
psi	libras por pulgada cuadrada
rac	racémico
rcf	fuerza centrífuga relativa
RP	fase inversa
rt, RT	temperatura ambiente
s	Singlete
sat.	Saturado
SDS-page	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
t	Triplete
t-Bu, tBu	butilo terciario
$t_{½}$	Vida media
t_r o ret. time	Tiempo de retención
TBAF	fluoruro de tetra-n-butilamonio
TBSCl, TBDMSCl	cloruro de terc-butildimetilsililo
TEA, Et_3N, NEt3	Trietilamina
terc-	Terciario
TFA	Ácido trifluoroacético
Tf_2O	Anhídrido trifluorometanesulfónico
THF	tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina
TMS	Trimetilsililo

TMSOTf	trifluorometanosulfonato de trimetilsililo
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
Triton X-100	t-octilfenoxipolietoxietanol (CAS 9002-93-1)
Ts	*p*-toluensulfonilo
TsOH	Ácido *p*-toluensulfónico
Tween 20	polisorbato 20, Polioxietileno (20) sorbitan monolaurato
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
UV	Ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
v/v	volumen por volumen
w/v	peso por volumen
w/w	peso por peso

Los siguientes fármacos descriptos en estos ejemplos se abrevian como:

D1: brolucizumab (SEQ ID NO:4);

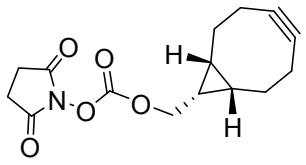
D2: (SEQ ID NO:5);

D3: (SEQ ID NO:6); y

D4: (SEQ ID NO:7).

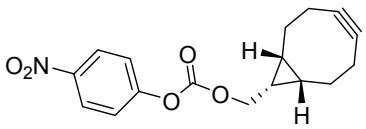
Métodos

Síntesis de



((1*R*,8*S*,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato utilizado en algunos ejemplos siguientes ha sido descripto por A. M. Jawalekar, et al; *Molecules*, **2013**, *18*, 7346-7363.

Síntesis de



((1*R*,8*S*,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (4-nitrofenil) carbonato utilizado en algunos ejemplos siguientes ha sido descripto por J. Dommerholt, et al; *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 9422-9425.

Todos los demás intermedios y reactivos no descriptos específicamente como sintetizados en el presente documento son comercializados en el mercado y se usaron tal como se entregaron.

Métodos de LCMS

Método 1

Columna SunFire C18 3.5µm 3.0 × 30 mm; Temperatura de Columna 40 °C; Flujo 2.0 mL/min; Tiempo de Detención 2.20 min; pH 2.2; Eluyente A1 0.05% TFA en Agua; Eluyente B1 Acetonitrilo; Tiempo de Gradiente (min)/ % A (Eluyente A1): % B (Eluyente B1); 0.00/ 95: 5; 1.70/ 5: 95; 2.00 /5 :95; 2.10 /95: 5.

Método 2

Columna AcQuity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 × 30 mm; Temperatura de Columna 50 °C; Flujo 1.0 mL/min; Tiempo de Detención 2.00 min; pH 2.6; Eluyente A1 0.1% Ácido Fórmico en Agua; Eluyente B1 0.1% Ácido Fórmico en Acetonitrilo; Tiempo de Gradiente (min) /% A (Eluyente A1): % B (Eluyente B1)
0.00/ 98: 2; 0.10/ 98:2; 1.50/ 2: 98; 1.80/ 2: 98; 1.90/ 98: 2; 2.00 /98:2.

Método 3

Columna: Kinetex 2.6 µm C18 100A (100 × 4.6 mm); fase móvil A (0.1% ácido fórmico en agua), B (acetonitrilo); gradiente (tiempo (min)/% B): 0/5, 1/30, 3/95, 4/95, 4.1/5, 6/5.

Método 4

Columna: AcQuity UPLC BEH C18 1.7µm 2.1 × 30 mm; temperatura de columna 50 °C; Flujo 1.0 mL/min; Tiempo de Detención: 2.00 min; pH 2.6; Eluyente A1 0.1% ácido fórmico en Agua; Eluyente B1 0.1% ácido fórmico en Acetonitrilo; Tiempo de Gradiente (min)/ % A (Eluyente A1): % B (Eluyente B1); 0.00/ 98: 2; 0.10/ 98:2; 1.50/ 2: 98; 1.80/ 2: 98; 1.90/ 98: 2; 2.00 /98 :2.

Método 5

Columna: SunFire C18 3.5 µm 3.0 × 30 mm; Temperatura de Columna 40 °C; Flujo 2.0 mL/min; Tiempo de Detención 2.20 min; pH 2.2; Eluyente A1 5 mM Hidróxido de Amonio en Agua; Eluyente B1 Acetonitrilo; Tiempo de Gradiente (min)/ % A (Eluyente A1) : % B (Eluyente B1); 0.00/ 95 :5; 1.70 /5: 95; 2.00/ 5: 95; 2.10/ 95: 5.

Método 6

Columna: Kinetex 2.6 µm C18 100A, (100 × 4.60 mm); Gradiente/(Tiempo (min)/% B) 0/5, 1/30, 3/95, 4/95, 4.1/5, 6/5; fase móvil: 0.1% Ácido Fórmico en Agua (A)/ acetonitrilo (B); Flujo: 1.4 mL/min; Temperatura de Columna: 40 °C.

Método 7

Columna: Synergi 2.5 µm MAX-RP 100A Mercury (100 × 4.6 mm); fase móvil A (0.1% ácido fórmico en agua), B (acetonitrilo); gradiente (tiempo (min)/% B): 0/30, 0.5/30, 1.5/95, 2.4/95, 2.5/30, 3.0/30.

Método 8

Columna: Kinetex 2.6 µm C18 100A (100 × 4.6 mm); fase móvil A (0.1% ácido fórmico en agua), B (acetonitrilo); gradiente (tiempo (min)/% B): 0/50, 1/70, 2/100, 4/100, 4.1/50, 6/50. Los datos de ESI-MS fueron registrados en un Acquity G2 Xevo-QTOF-MS. El espectro de masa de iones positivo se desconvolucionó utilizando el programa MaxEnt 1 en el paquete de software MassLynx.

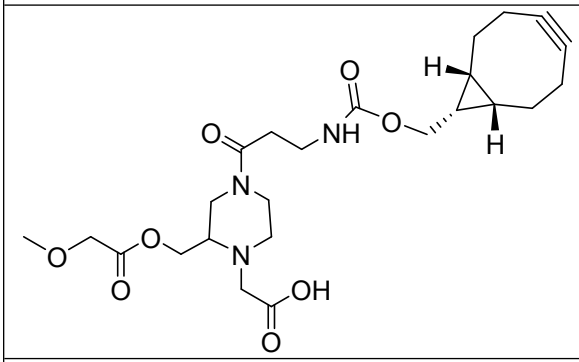
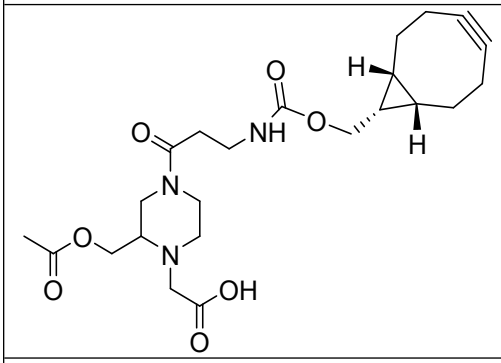
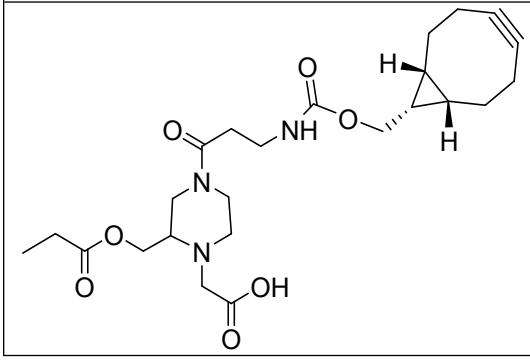
Método 9

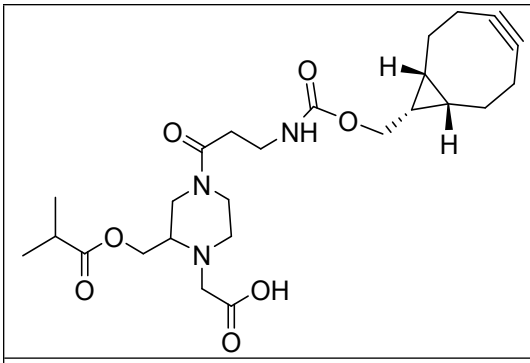
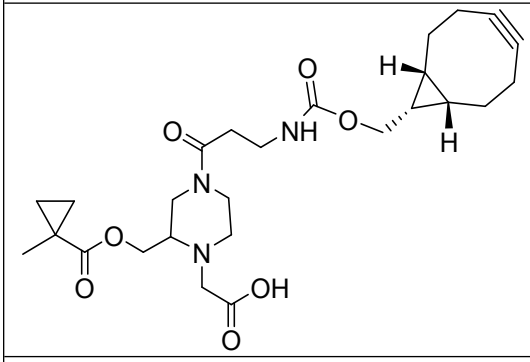
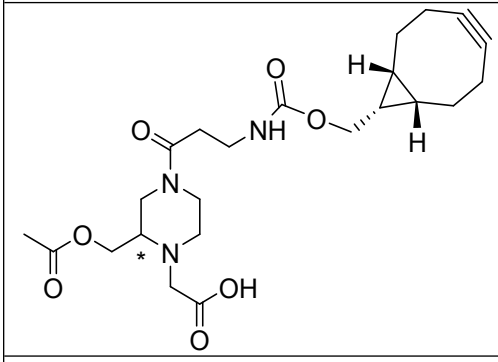
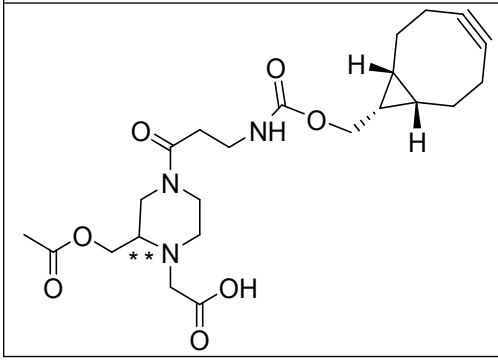
Columna: Proswift Monolith (4.6x50mm); fase móvil A (0.1% ácido fórmico en agua), B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo); gradiente (tiempo (min)/% B): 0/2, 0.7/2, 2/98, 2.1/98, 2.3/2, 3.3/2. Los datos de ESI-MS fueron registrados en un Acquity G2 Xevo-QTOF-MS. El espectro de masa de iones positivo se desconvolucionó utilizando el programa MaxEnt 1 en el paquete de software MassLynx. Se reportó la *m/z* desconvolucionado para $(M+H)^+$.

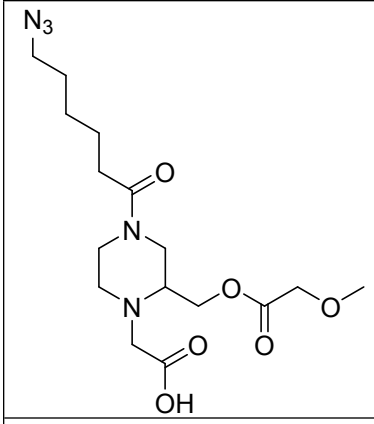
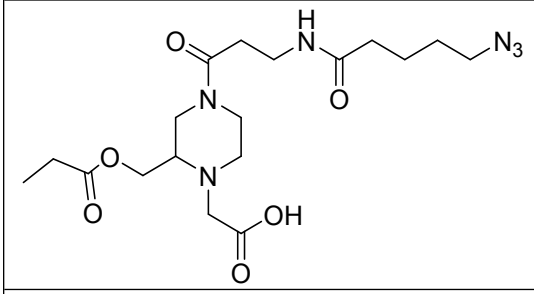
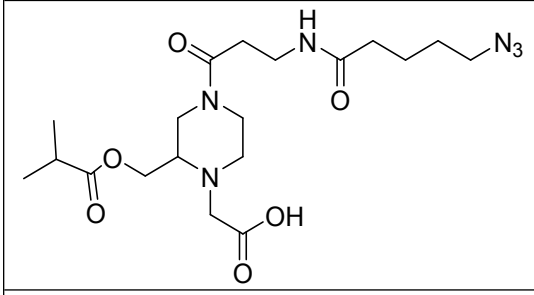
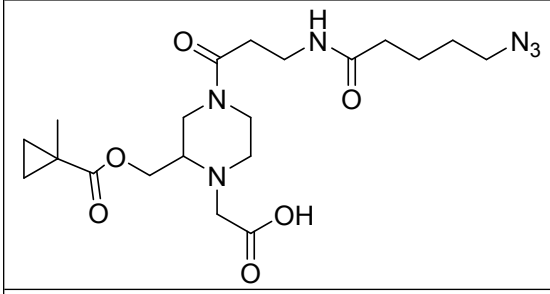
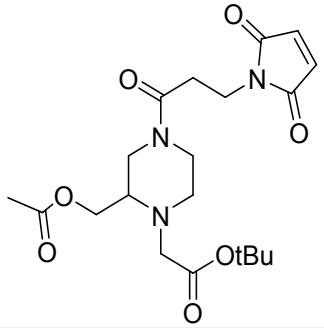
Ejemplo 1

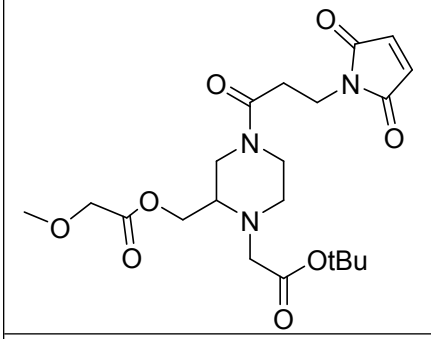
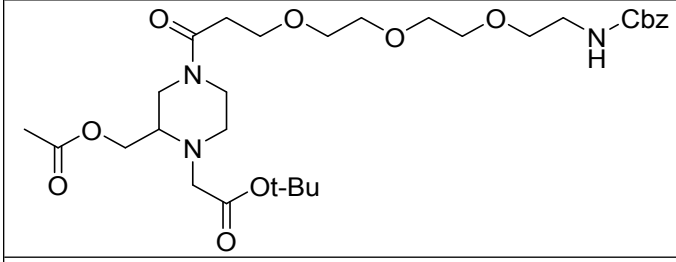
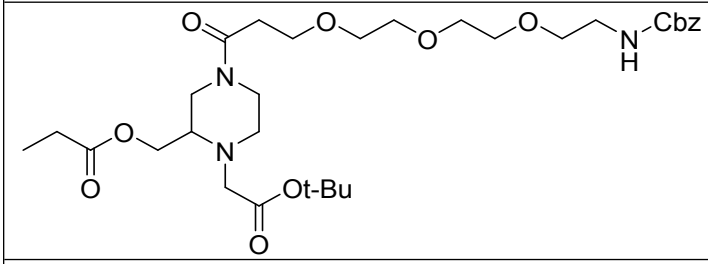
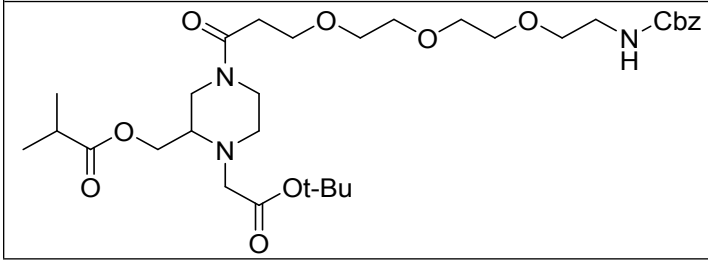
Ligantes que no dejan huellas

El presente ejemplo describe la síntesis de un número de ligantes que no dejan huellas, capaces de conjugarse a un fármaco que contiene aminas y un portador.

Tabla 6. Ligantes que no dejan huellas L1–L11 e Intermedios de Ligantes que no dejan huellas L12–L16	
Estructura	**Número**
	**L1**
	**L2**
	**L3**

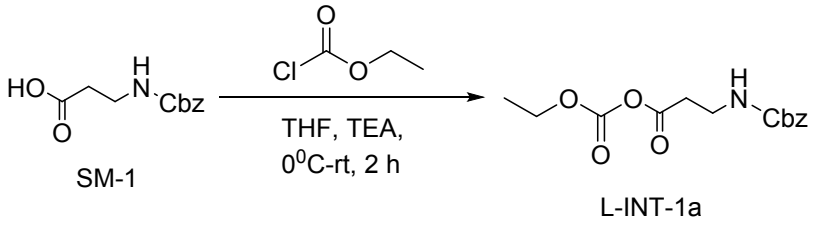
	**L4**
	**L5**
	**L6**
	**L7**

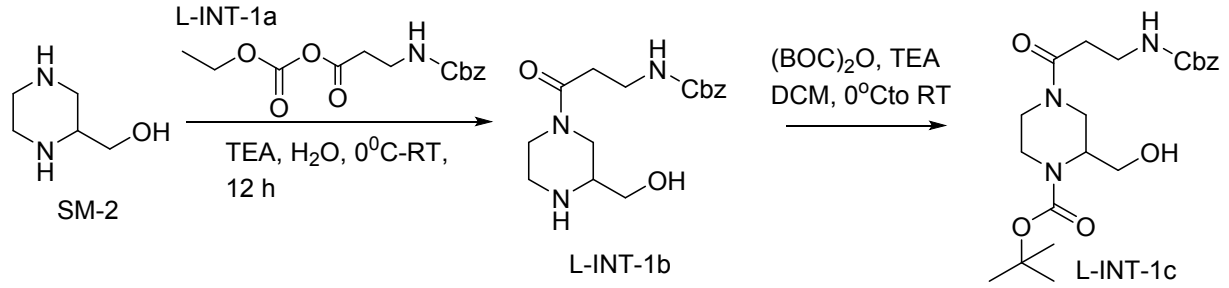
	**L8**
	**L9**
	**L10**
	**L11**
	**L12**

	**L13**
	**L14**
	**L15**
	**L16**

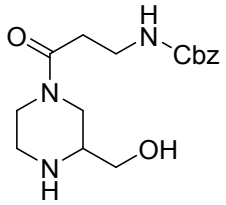
Síntesis de Ligantes que no dejan huellas

Intermedio Común: L-INT-1c



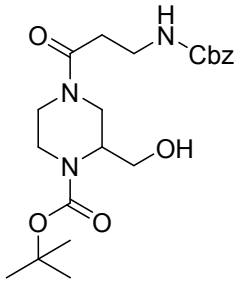


L-INT-1b. 1-(N-Cbz-beta-alanil)-3-(hidroximetil) piperazina



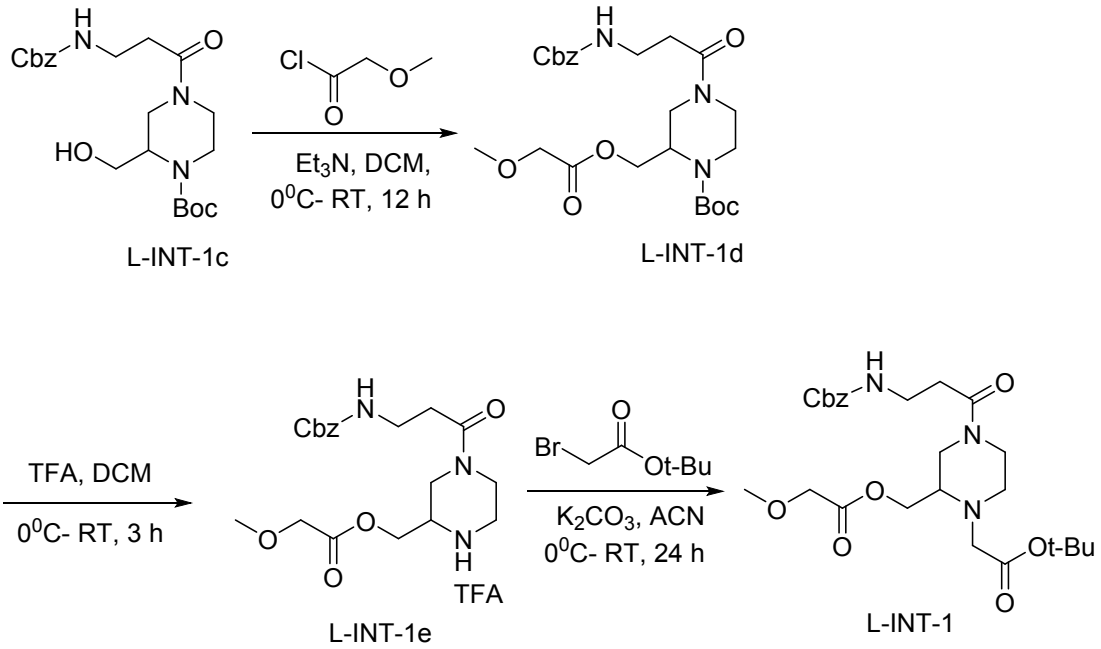
A una solución a 0°C de N-Cbz-beta-alanina comercializado en el mercado (SM-1, 2.5 g, 11.2 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL) se agregó trietilamina (1.13 g, 11.2 mmol) y etilcloroformato (1.21 g, 11.2 mmol). La solución fue agitada durante 2 h a 0 °C para proveer la formación in situ de N-Cbz-beta-alanina etil anhídrido carbónico (**L-INT-1a**). Esta mezcla de reacción fue agregada a una solución de 2-(hidroximetil) piperazina (SM-2, 1.95 g, 16.8 mmol) y trietilamina (1.13 g, 11.2 mmol) en agua (30 mL) y la mezcla resultante fue agitada 12 h a temperatura ambiente. La solución se basificó con solución de carbonato de sodio (2 M, 1 mL). Se agregó solución salina (2 mL) y la fase acuosa fue concentrada para obtener un sólido crudo. La purificación por cromatografía en columna (alúmina básica, levigado con 3–15% metanol : diclorometano) dio como resultado **L-INT-1b**. MS (ESI+) *m/z* 322.2 (M+H).

L-INT-1c. 1-(Boc)-2-(hidroximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil) piperazina

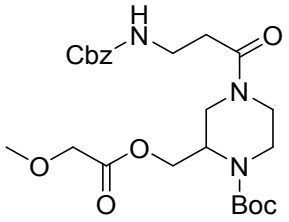


A una solución a 0°C de **L-INT-1b** (1 g, 3.1 mmol) en diclorometano (20 mL) se agregó trietilamina (0.504 g, 4.98 mmol) y di-terc-butil dicarbonato (611 mg, 2.8 mmol). La solución fue agitada durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue tratada con agua y extraída con diclorometano. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio) y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, levigado con 2:98 metanol : diclorometano) dio como resultado **L-INT-1c**. MS (ESI+) *m/z* 422.2 (M+H).

Intermedio de ligante L-INT-1.

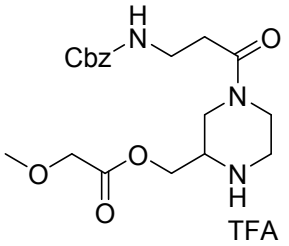


L-INT-1d. 1-(Boc)-2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil) piperazina



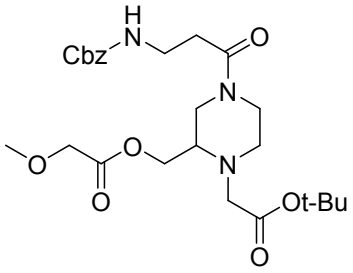
A una solución a 0°C de **L-INT-1c** (1 g, 2.37 mmol) en diclorometano (15 mL) se agregó trietilamina (0.60 g, 5.93 mmol). Luego se agregó gota a gota cloruro de metoxiacetilo (307 mg, 2.85 mmol) y la solución fue agitada durante 12 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue tratada con agua y extraída con diclorometano. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio) y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, levigado con 1–2% metanol : diclorometano) dio como resultado **L-INT-1d**. MS (ESI+) *m/z* 494.2(M+H).

L-INT-1e. 1-(N-Cbz-beta-alanil)-3-(2'-metoxiacetoximetil)piperazina, sal de ácido trifluoroacético



A una solución a 0°C de **L-INT-1d** (1 g, 2.02 mmol) en diclorometano (26 mL) se agregó ácido trifluoroacético (7 mL). La solución fue agitada durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue concentrada, lavada con pentano y secada bajo alto vacío para proveer la sal de ácido trifluoroacético **L-INT-1e**. MS (ESI+) *m/z* 394 (M+H).

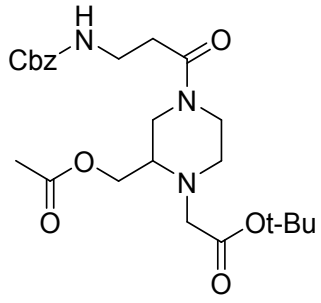
L-INT-1. Ester t-butílico de ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1-piperazinaacético

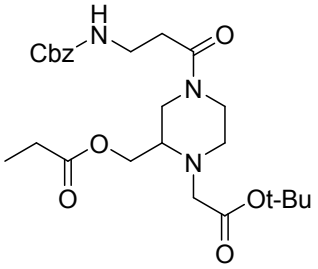
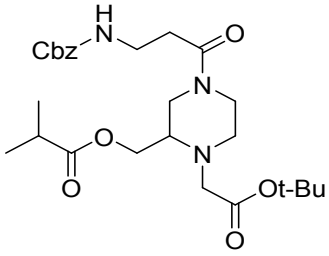


A una mezcla a 0°C de **L-INT-1e** (1.0 g, 2.54 mmol) y carbonato de potasio (1.05 g, 7.63 mmol) en acetonitrilo (25 mL) se agregó gota a gota terc-butil bromoacetato (0.744 g, 3.82 mmol). La solución fue agitada durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue tratada con agua y extraída con etil acetato. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio) y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, levigado con 1–2% metanol : diclorometano) dio como resultado **L-INT-1** como un sólido pegajoso incoloro. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 3.43 min; MS (ESI+) *m/z* 508.3 (M+H). ^{1}H NMR (400 MHz, CDCl3) 7.35-7.28 (m, 5H), 5.58-5.52 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.38-4.22 (m, 1H), 4.20-4.08 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 3H), 4.00-3.90(m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.50-3.49 (d, J=4, 4H), 3.45 (s, 3H), 3.42-3.38 (m, 1H), 3.33 (s,1H), 3.32-3.29 (m,1H), 3.28-3.20 (m, 1H), 3.18-3.10 (m, 1H), 3.10-3.00 (m, 1H), 2.86-2.72 (m, 2H), 2.53-2.51 (t, J=4, 2H) ,1.46(s, 9H).

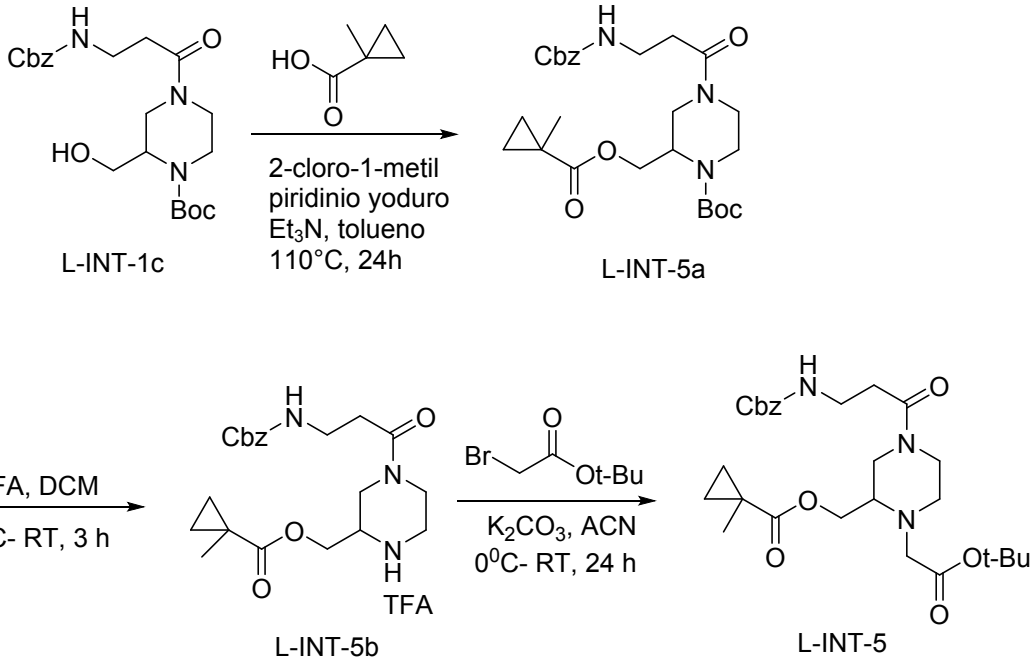
Las especies que se listan en la Tabla 7 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **L-INT-1**.

Tabla 7. Ejemplos de especies de ligantes que no dejan huellas

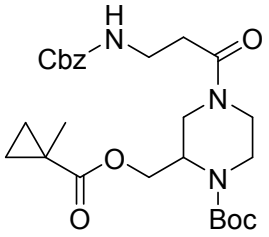
Estructura, nombre	**Número**	**LCMS: [M+H]; Tiempo de retención; Método**	**^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)**
	**L-INT-2**	478.3; 3.46 min; 8	7.35-7.31 (m, 5H), 5.56-5.55 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.28-4.10(m, 2H), 4.10-3.92(m, 2H), 3.68-3.55(m, 1H), 3.48(s, 3H), 3.46-3.42(m, 1H), 3.41-3.40(d, J=4, 1H),3.33-3.28 (m, 2H), 3.28-3.15(m, 1H), 3.10-2.98(m, 2H), 2.88-2.76(m, 2H), 2.53-2.51(t, J=4, 2H), 2.09-2.07(d, J=8, 3H), 1.45(s, 9H)

Ester t-butílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético			
 Ester t-butílico de ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1-piperazinaacético	**L-INT-3**	492.3; 3.61 min; 8	7.35-7.26 (m, 5H), 5.56-5.55 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.28-3.94 (m, 4H), 3.52-3.39 (m, 4H), 3.34-3.20 (m, 3H), 3.12-2.94 (m, 2H), 2.81-2.76 (m, 2H), 2.53-2.50 (m, 2H), 2.38-2.33(m, 2H), 1.45(s, 9H) ,1.17-1.12 (m, 3H).
 Ester t-butílico de ácido 2-(isobutanoiloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L-INT-4**	506.3; 3.80 min; 8	7.35-7.30 (m, 5H), 5.57-5.54 (t, J=4, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.26-3.93 (m, 3H), 3.64-3.48 (m, 3H), 3.43-3.19 (m, 4H), 3.09-2.99 (m, 2H), 2.80-2.76 (m, 2H), 2.75-2.51 (m, 3H), 1.45(s, 9H) ,1.18-1.16 (d, J=4, 6H)

L-INT-5. Ester t-butílco de ácido 2-(1'-metilciclopropilcarboniloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético

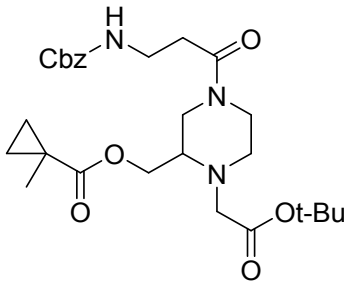


L-INT-5a. 1-(Boc)-2-(1'-metilciclopropilcarboniloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil) piperazina



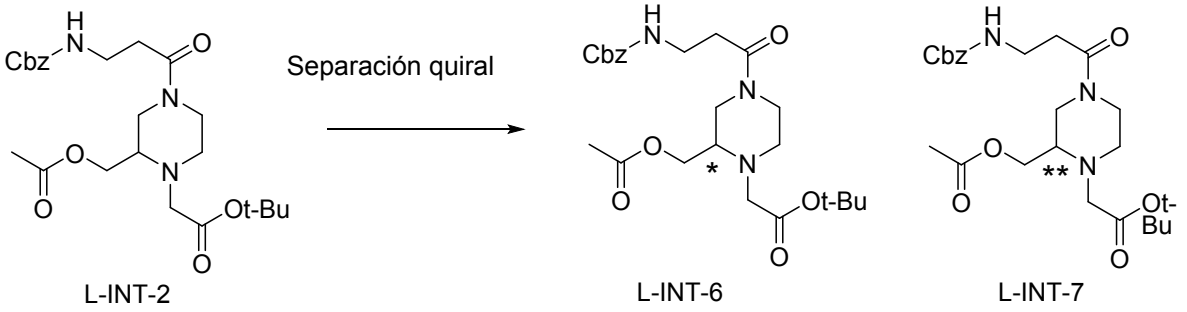
A una solución de **L-INT-1c** (1.0 g, 2.37 mmol), ácido 1-metilciclopropano carboxílico (0.475 g, 4.75 mmol) y 2-cloro-1-metil-piridinio yoduro (1.21 g, 4.75 mmol) en tolueno (20 mL) se agregó trietilamina (5.0 mL) y la reacción resultante fue agitada 24 h a 110 °C. La mezcla de reacción fue tratada con agua y extraída con etil acetato. La fase orgánica fue lavada con solución salina, secada (sulfato de sodio) y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, levigado con 1–2% metanol : diclorometano) dio como resultado **L-INT-5a**. MS (ESI+) *m/z* 504.2 (M+H).

L-INT-5. Ester t-butílico de ácido 2-(1'-metilciclopropilcarboniloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético



Se preparó L-INT-5 en dos etapas a partir de L-INT-5a siguiendo los métodos generales para la síntesis de L-INT-1e y L-INT-1. **L-INT-5**: LCMS (Método 8): tiempo de retención = 3.84 min; MS (ESI+) *m/z* 518.3 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.35-7.30 (m, 5H), 5.5 (s 1H), 5.08 (s, 2H), 4.28-4.12 (m, 2H), 4.06-3.88(m, 2H), 3.67-3.49(m, 3H), 3.41-3.28 (m, 3H), 3.26-3.17 (m, 1H), 3.12-3.05 (m,1H), 3.03-2.90 (m, 1H), 2.78-2.74(m, 2H), 2.53-2.50(t, J=8, 2H), 1.45(s, 9H), 1.29(s, 3H), 1.25-1.20(m, 2H), 0.73-0.68(m, 2H).

L-INT-6 y L-INT-7. Separación quiral de éster t-butílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético



L-INT-2 L-INT-6 L-INT-7

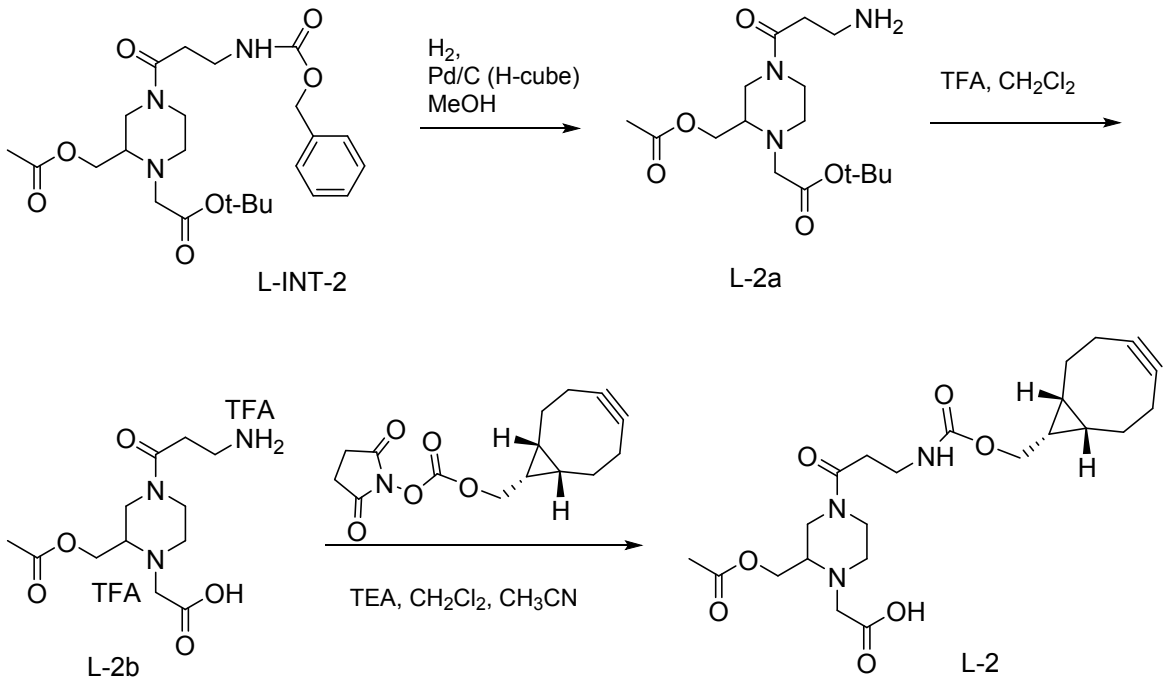
Los enantiómeros individuales de **L-INT-2** se aislaron por purificación por HPLC quiral preparativa de **L-INT-2** (columna Phenomenex Lux Amylose-2, 5 µm, 250 mm × 21.2mm), levigando con 20 mL/min de fase móvil con la siguiente composición (isocrática): 55% n-hexano, 45% 70:30 etanol : isopropanol con 0.1% dietilamina. Las fracciones conteniendo producto fueron evaporadas, disueltas en cloroformo, lavadas con agua, secadas (sulfato de sodio), y evaporadas para proporcionar los estereoisómeros **L-INT-6** y **L-INT-7**.

L-INT-6: LCMS (Método 8): tiempo de retención = 1.93 min; MS (ESI+) *m/z* 478.3(M+H). HPLC Quiral (Método a continuación): tiempo de retención = 8.018 min; 98.3% de pureza).

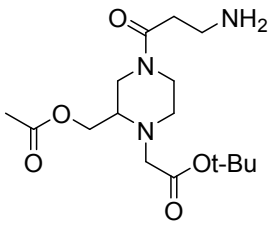
L-INT-7: LCMS (Método 8): tiempo de retención = 1.92 min; MS (ESI+) *m/z* 478.3(M+H). HPLC Quiral (Método a continuación): tiempo de retención = 9.694 min; 94.4% de pureza).

Método de HPLC Quiral: Columna: Phenomenex Lux Amylose-2, 5 µm, 250 mm × 4.60 mm; temperatura de columna 25 °C; Flujo 1.0 mL/min; fase móvil: A = hexano, B = etanol : metanol 1:1; levigado:isocrático 30:70 A:B.

Ligantes que no dejan huellas; L1–L7

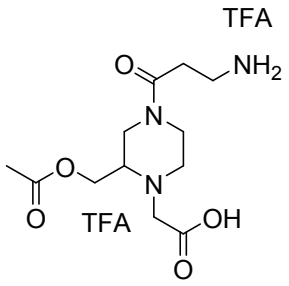


L-2a. Ester t-butílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(beta-alanil)-1- piperazinaacético



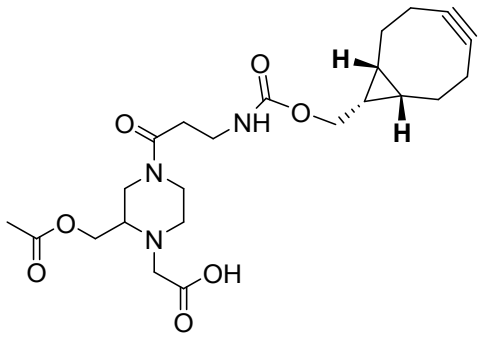
Se disolvió **L-INT-2** (185.5 mg, 0.39 mmol) en metanol (12 mL) y se sometió a hidrogenolisis de flujo (cartucho de paladio sobre carbono, 5 atm H_2, 35 °C, 1 h a 1 mL/min velocidad de flujo). La solución fue evaporada para proveer el compuesto del título **L-2a**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 0.72 min; MS (ESI+) *m/z* 344.1 (M+H).

L-2b: ácido de 2-(acetoximetil)-4-(beta-alanil)-1- piperazinaacético, sal de ácido bis trifluoroacético



Se disolvió **L-2a** (123.2 mg, 0.36 mmol) en diclorometano (5 mL) y ácido trifluoroacético (1 mL). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante la noche, luego se evaporó para proveer el material del título crudo (**L-2b)**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 0.10 min; MS (ESI+) *m/z* 288.0 (M+H).

L2. Ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético

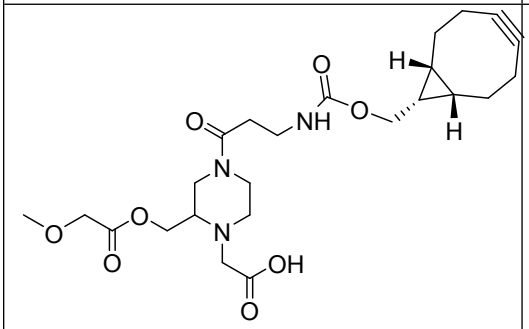


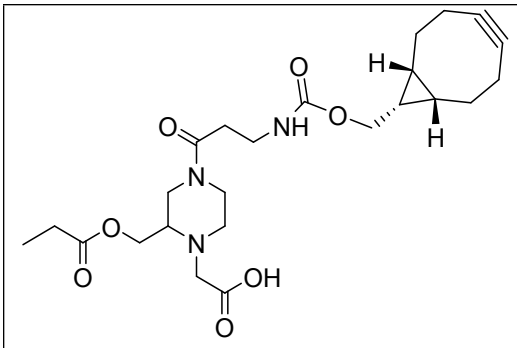
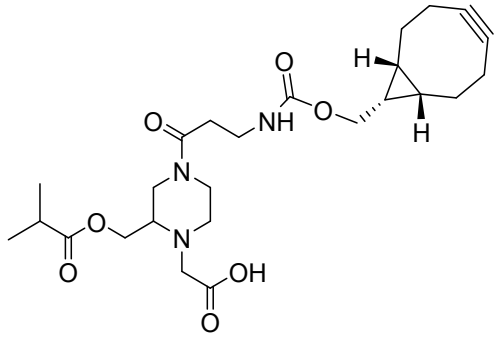
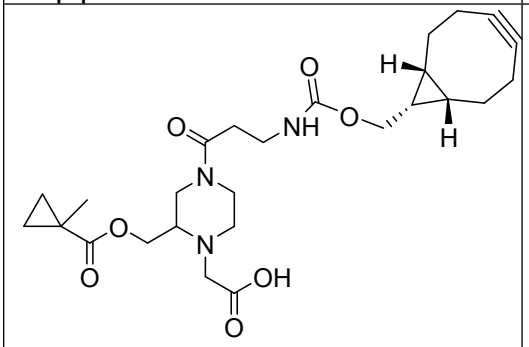
Se recogió **L-2b** crudo (163 mg, 0.57 mmol) en diclorometano y acetonitrilo para proveer una mezcla ligeramente turbia. La adición de trietilamina (0.40 mL, 2.84 mmol) y ((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (182 mg, 0.63 mmol) dio como resultado una solución, que fue evaporada luego de 0.5 h. El

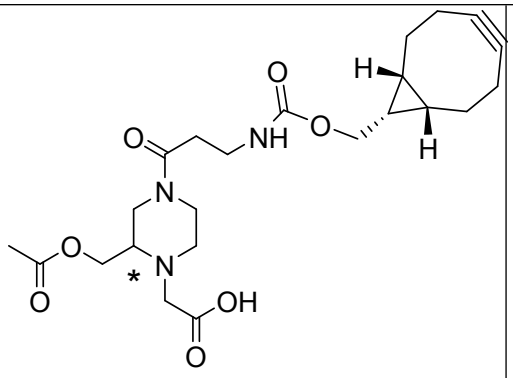
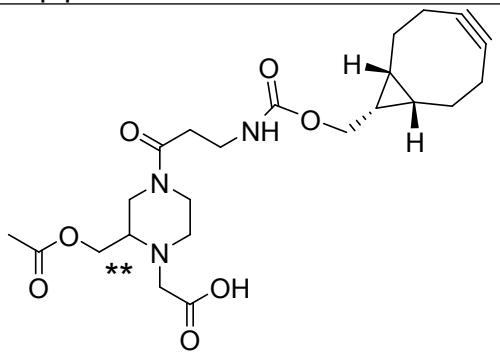
material crudo fue disuelto en 6 mL 3:1 acetonitrilo : agua y purificado por HPLC (Columna: Waters XBridge BEH 5 µm 19 × 150 mm; método: 15–30% acetonitrilo 10 minutos gradiente (10 mM hidróxido de amonio) en agua 30 mL/min). Las fracciones fueron evaporadas, congeladas rápidamente y liofilizadas para proveer **L2**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 0.97 min; MS (ESI+) *m/z* 464.1 (M+H). ^{1}H-NMR (CD_3OD, ppm) (la muestra contiene rastros de trietilamina): 4.17 (m, 4H); 4.00 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.5-3.32 (m, 5H), 3.06 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.60 (t, 2H), 2.19 (m, 6H), 2.05 (m, 3H), 1.59 (m, 2H), 1.38 (m, 1H), 0.96 (m, 2H).

Las especies que se listan en la Tabla 8 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de L2.

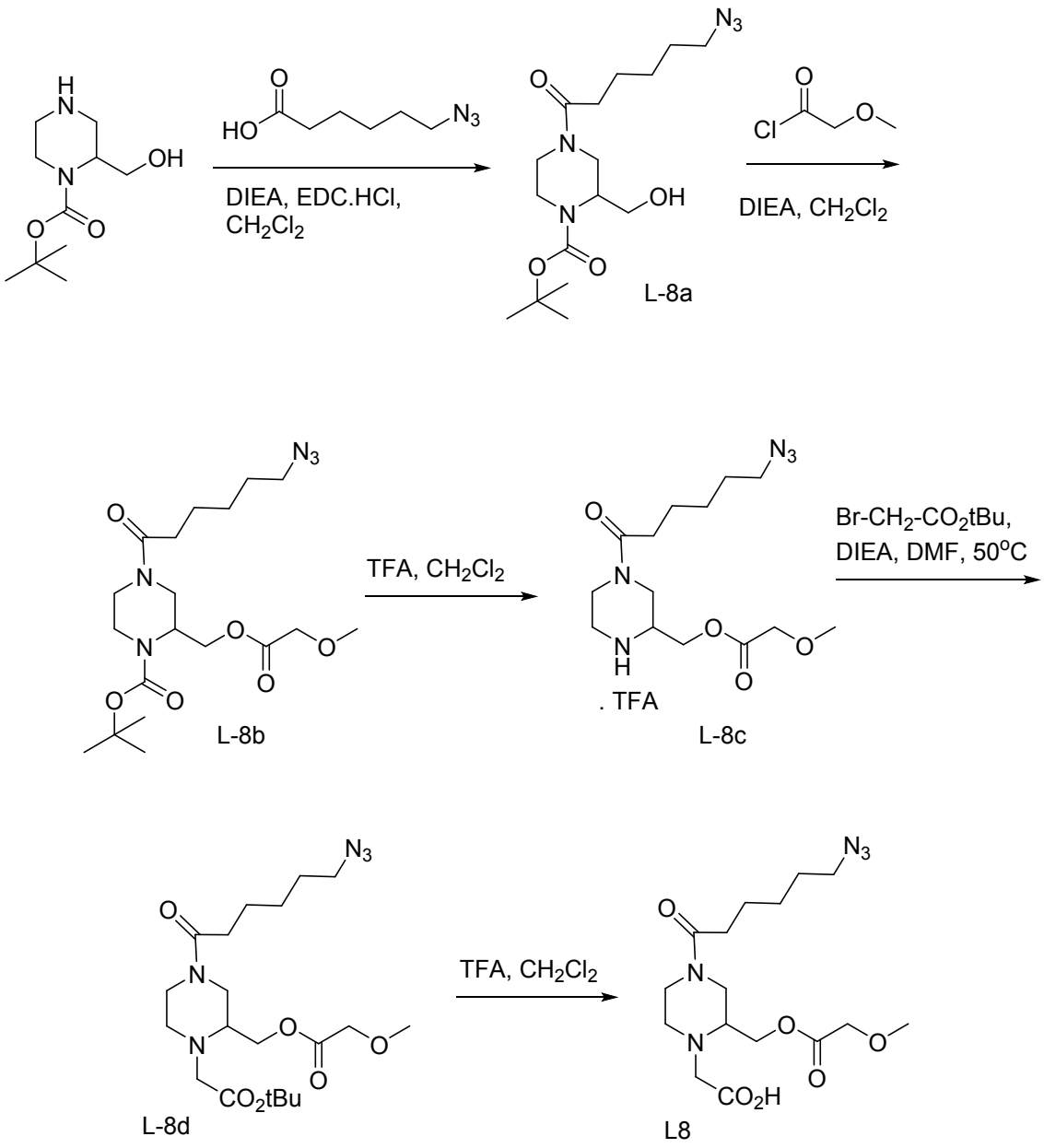
Tabla 8. Ejemplos de Especies de Ligantes que no dejan huellas

Estructura	**Número (intermedio inicial)**	**LCMS: [M+H]; Tiempo de retención; método**	**^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD)**
 Ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L1 (L-INT-1)**	494.1; 0.98 min; 1	4.25 (m, 2H); 4.14 (m, 4H); 4.0-3.44 (m, 5H), 3.42 (s, 3H), 3.3-3.1 (m, 2H), 2.96 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.62 (m, 2H), 2.21 (m, 6H), 1.61 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 0.93 (m, 2H)

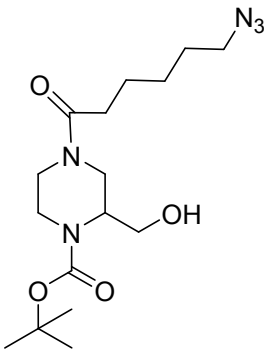
 Ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L3 (L-INT-3)**	478.2; 1.03 min; 1	4.17 (m, 3H); 3.99 (dd, 1H), 3.76 (dd, 1H), 3.47 (m, 2H), 3.37 (M, 2H), 3.06 (dd, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.60 (t, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.19 (m, 6H), 1.59 (m, 2H), 1.38 (m, 1H), 1.12 (t, 3H), 0.96 (m, 2H)
 Ácido 2-(isobutanoiloximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L4 (L-INT-4)**	492.7; 0.82 min; 2	4.17 (m, 3H); 3.99 (dd, 1H), 3.76 (dd, 1H), 3.41 (m, 4H), 3.06 (dd, 1H), 2.90 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 2.58 (m, 3H), 2.19 (m, 6H), 1.60 (m, 2H), 1.37 (m, 1H), 1.16 (d, 6H), 0.96 (t, 2H)
 Ácido 2-(1'-metilciclopropilcarboniloximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L5 (L-INT-5)**	504.2; 1.09 min; 1	4.16 (m, 4H); 3.99 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.5-3.35 (m, 5H), 3.06 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.88 (dt, 1H), 2.77 (m, 1H), 2.61 (m, 2H), 2.19 (m, 6H), 1.60 (m, 2H), 1.38 (m, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.22 (d, 2H), 0.93 (t, 2H), 0.73 (dq, 2H)

 Isómero 1. Ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L6 (L-INT-6)**	464.2; 0.95 min; 1	Usado como crudo, sin NMR
 Isómero 2. Ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-(((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1- piperazinaacético	**L7 (L-INT-7)**	464.2; 0.96 min; 1	Usado como crudo, sin NMR

Ligante que no deja huellas L8. Ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(6'-azidohexanoil)-1- piperazinaacético

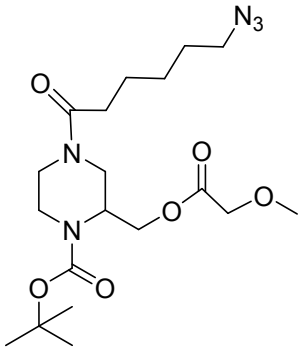


L-8a. **1-(Boc)-2-(hidroximetil)-4-(6'-azidohexanoil) piperazina**



Se pesó ácido 6-azidohexanoico (743 mg, 4.73 mmol) y N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (1.0 g, 5.22 mmol) en un matraz de fondo redondo y se disolvió en diclorometano (20 mL). Transcurridos 5 minutos, se agregaron terc-butil 2-(hidroximetil) piperazina-1-carboxilato sólido (0.98 g, 4.53 mmol) y diisopropiletilamina (1.0 mL, 5.73 mmol) y la solución fue almacenada a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción fue diluida con 100 mL diclorometano y lavada con 1 M HCl (2 × 50 mL), 1 M NaOH (1 × 50 mL), y solución salina (1 × 50 mL). La fase orgánica fue concentrada para proveer **L-8a**. MS (ESI+) *m/z* 356.3 (M+H).

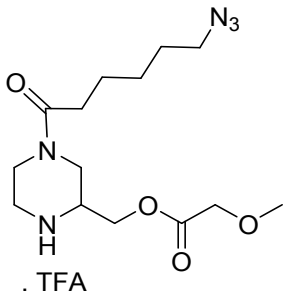
L-8b. 1-(Boc)-2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(6''-azidohexanoil) piperazina



Se disolvió **L-8a** (959 mg, 2.70 mmol) en diclorometano (12 mL) en un matraz de fondo redondo. Se agregaron una barra de agitación y diisopropiletilamina (1 mL, 5.73 mmol), seguida por cloruro de 2-metoxiacetilo (0.32 mL, 3.51 mmol), y el matraz fue tapado. La reacción fue agitada a temperatura ambiente. Luego de 6 h, 100 µL se agregó más cloruro de 2-metoxiacetilo. Luego de 30 min, la mezcla de reacción se diluyó con 90 mL etil acetato y fue lavada con 1 M HCl (2 × 25 mL) y solución salina (1 × 20 mL). La fase orgánica fue concentrada usando un evaporador rotativo. El producto fue purificado

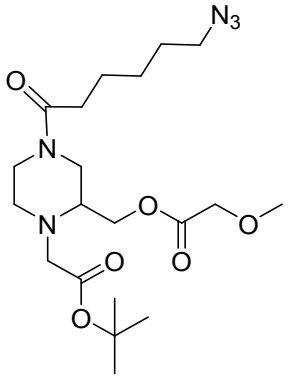
por cromatografía en columna instantánea sobre sílice con un gradiente de acetato de etilo: heptanos. Las fracciones conteniendo el producto se combinaron y concentraron para proveer **L-8b**. MS (ESI+) *m/z* = 428.3 (M+H).

L-8c. 1-(6'-azidohexanoil)-3-(2''-metoxiacetoximetil)piperazina, sal de ácido trifluoroacético



L-8b (846 mg, 1.979 mmol) fue disuelto en ácido trifluoroacético (10 mL, 130 mmol) y diclorometano (10 mL). La solución fue agitada a temperatura ambiente. Luego de 1 h, los disolventes fueron eliminados usando un evaporador rotativo y el producto secado bajo vacío para proveer **L-8c**. MS (ESI+) *m/z* 328.2 (M+H).

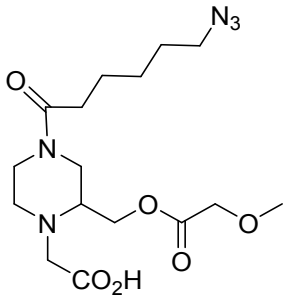
L-8d. Ester t-butílico de ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(6''-azidohexanoil)-1-piperazinaacético



L-8c (439 mg, 0.994 mmol) fue disuelto en dimetilformamida (5 mL) en un vial de vidrio con una barra de agitación. Se agregaron t-butil bromoacetato (0.220 mL, 1.491 mmol) y diisopropiletilamina (0.868 mL, 4.97 mmol), y el vial fue tapado. La reacción fue

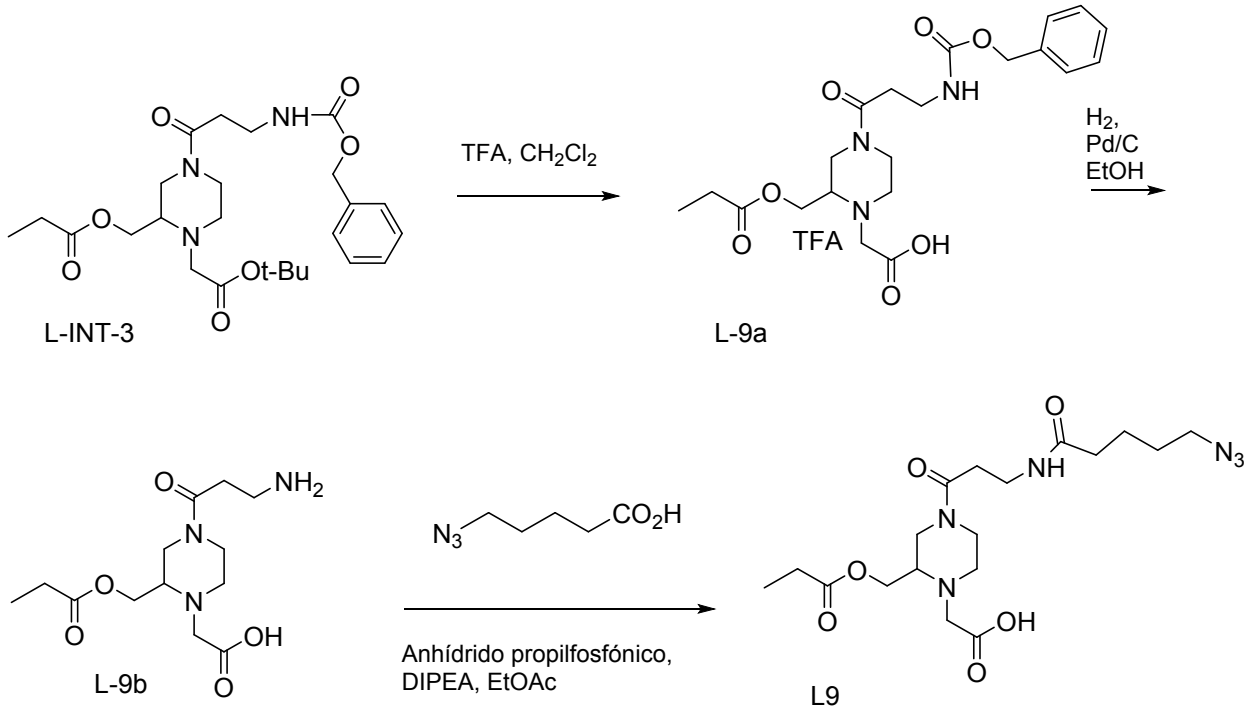
agitada a 50 °C durante la noche. Al día siguiente, la mezcla de reacción fue retirada de la fuente de calor y almacenada a −20 °C hasta la purificación al día siguiente. La mezcla de reacción fue purificada sin tratamiento extractivo por cromatografía instantánea en columna sobre sílice con un gradiente heptano: acetato de etilo. Las fracciones conteniendo el producto fueron combinadas, y concentradas para proveer **L-8d**. MS (ESI-) *m/z* = 486.5 (M+formato).

L8. Ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(6''-azidohexanoil)-1- piperazinaacético

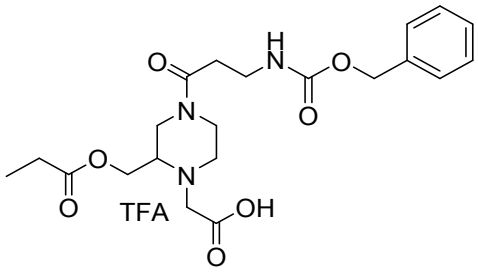


Se disolvió **L-8d** (150 mg, 0.317 mmol) en diclorometano (5 mL) y ácido trifluoroacético (5 mL) y la reacción fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, la solución fue concentrada usando un evaporador rotativo y el residuo fue re-disuelto en 4 mL acetonitrilo. La solución fue filtrada y purificada por HPLC preparativa de fase inversa con recolección de fracciones dirigida a la masa (Método a continuación). Las fracciones conteniendo el producto fueron agrupadas, congeladas y liofilizadas para proveer **L8**. MS (ESI+) *m/z* = 386.5 (M+H). Condiciones de HPLC Preparativa: Waters Sunfire C18; tamaño de partícula: 5 µm; tamaño de columna: 30 × 50 mm; eluyente/gradiente: 10% CH_3CN/H_2O/0.7 min, 10–30% CH_3CN/H_2O/3.5 min, 30-95% CH_3CN/H_2O 0.5 minutos (CH_3CN y H_2O conteniendo 0.1% TFA); velocidad de flujo: 75 mL/min; temperatura de columna: temperatura ambiente; *m/z* de recolección: +385.

Ligantes que no dejan huellas: L9-L11

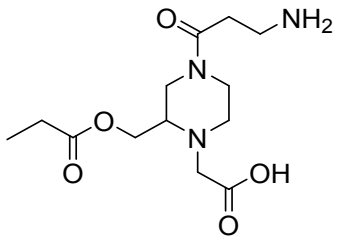


L-9a. Ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(N-Cbz-beta-alanil)-1- piperazinaacético, sal de ácido trifluoroacético



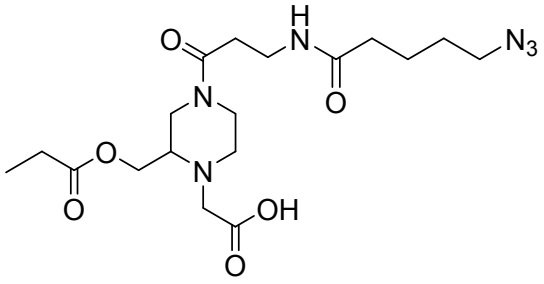
L-INT-3 (250 mg, 0.51 mmol) fue disuelto en diclorometano (5 mL) a 0 °C, luego tratado con ácido trifluoroacético (2.5 mL) y agitado a temperatura ambiente 6 h bajo argón. La reacción fue evaporada, lavada con pentano y secada para proveer **L-9a** crudo como una sal de ácido trifluoroacético. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 0.262 min; MS (ESI+) *m/z* 436.2 (M+H).

L-9b. Ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(beta-alanil)-1- piperazinaacético



L-9a (250 mg, 0.57 mmol) fue disuelto en etanol (5 mL), a lo cual se agregó 10% paladio sobre carbono (25 mg). La solución fue agitada bajo un globo de gas hidrógeno durante 6 h y luego se filtró por Celite®, lavando con etanol. Los filtrados combinados fueron evaporados para proveer el compuesto **L-9b**. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 0.774 min; MS (ESI+) *m/z* 302.2 (M+H).

L9.



L-9b (100 mg, 0.33 mmol) y ácido 5-azidopentanoico (57 mg, 0.40 mmol) en etil acetato (5 mL) a 0 °C se trataron con diisopropiletilamina (107 mg, 0.83 mmol) y anhídrido propilfosfónico (50% solución en etil acetato, 158 mg, 0.50 mmol). La reacción fue agitada a temperatura ambiente 16 h bajo argón, luego apagada con agua y evaporada. La cromatografía instantánea inicial (SiO_2, 10% metanol : diclorometano) fue seguida por HPLC preparativa (columna: zorbax C-18 4.6 × 150 mm; Fase móvil A = : metanol (1:1) 0.01% TFA en agua, fase móvil B=acetonitrilo : metanol (1:1); tiempo = 0 min: 30% B; 1 min: 70% B; 6 min: 100% B; 1 mL/min) para proveer **L9**. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 0.18 min; MS (ESI+) *m/z* 427.1 (M+H). ^{1}H-NMR (CD_3OD, ppm) (todas las asignaciones son provisorias) 4.23-4.17 (m, 2H), 4.16-3.98 (m, 1H), 3.78-3.62 (m, 1H), 3.54 (s, 2H), 3.46-3.43 (t, J=4, 3H), 3.26-3.20 (m, 1H), 3.18-3.05 (m, 1H), 3.03-2.76 (m,

2H), 2.64-2.61 (t, J=8,2H), 2.43-2.36 (m, 2H), 2.24-2.21 (t, J=8, 2H), 1.75-1.58 (m, 4H), 1.15-1.12 (t, J=8, 3H).

Las especies que se listan en la Tabla 9 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de L-9**:**

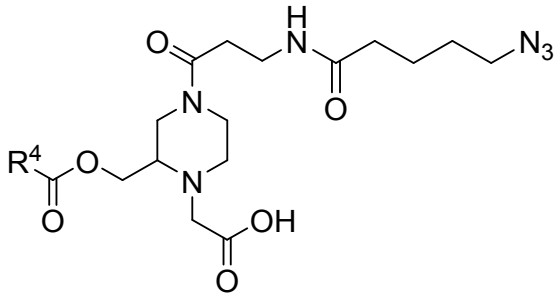
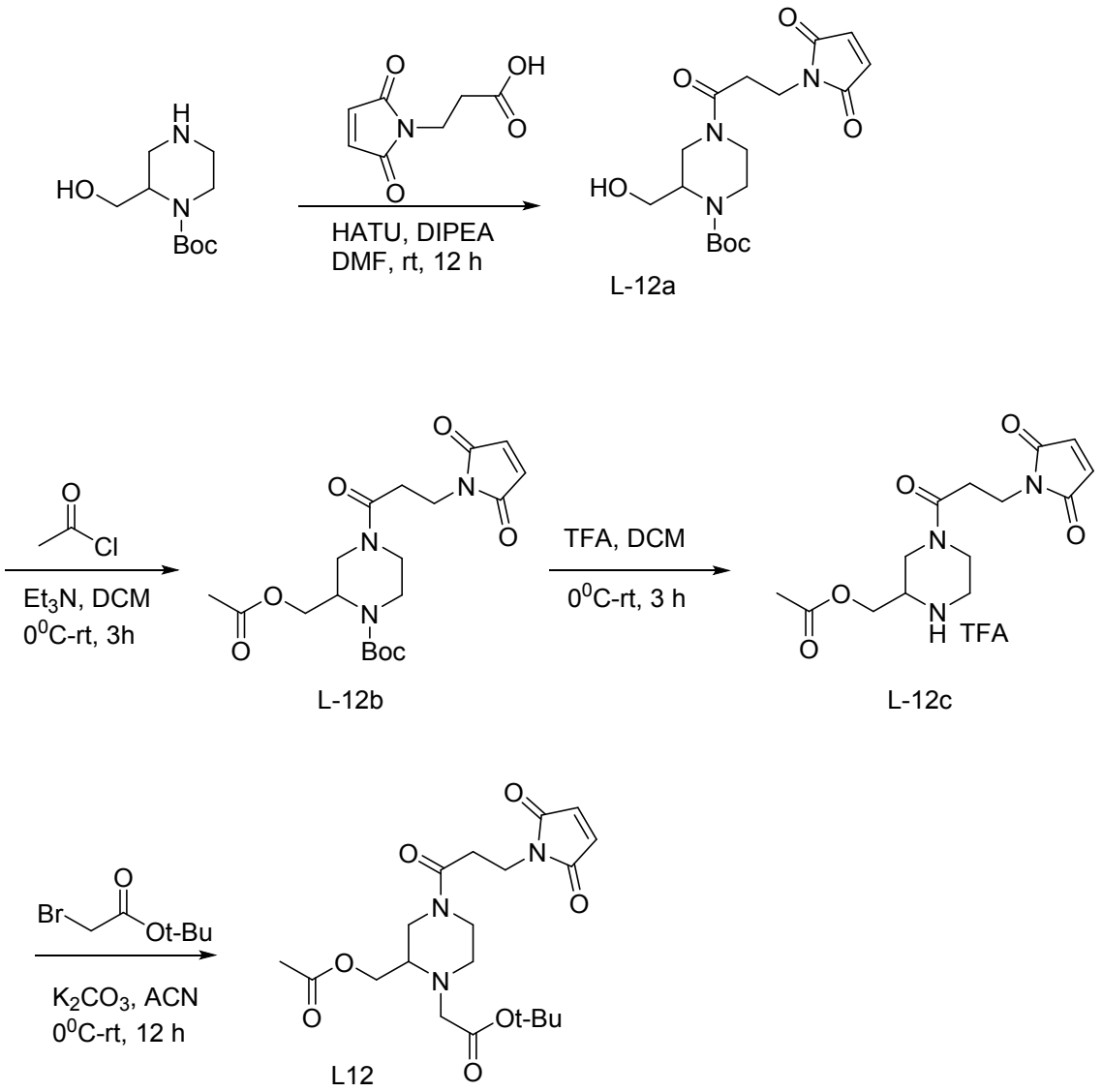
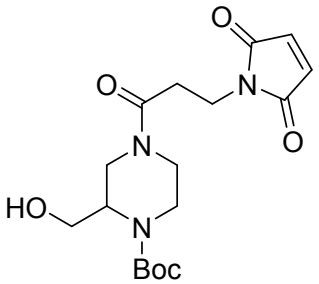


Tabla 9. Ejemplos de Especies de Ligantes que no dejan huellas			
R^4, Nombre	**Número (Intermedio inicial)**	**LCMS: [M+H]; Tiempo de retención; Método**	**^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD)**
R^4 = $(CH_3)_2CH$- Ácido 2-(isobutanoiloximetil)-4-(N-(5'-azidopentanoil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	**L10 (L-INT-4)**	441.1 0.16 min 5	4.21-4.15(m, 2H), 4.04-3.84(t, J=16, 1H), 3.81-3.73(m, 1H), 3.55(s, 2H), 3.49-3.45(t, J=8, 3H), 3.34(s, 1H), 3.27-3.22(m, 1H), 3.14-3.10(m, 2H), 2.99-2.80(m, 2H), 2.70-2.57(m, 3H), 1.72-1.58 (m,4H), 1.19-1.17(d, J=8, 6H).
R^4 =  Ácido 2-(1'-metilciclopropilcarboniloximetil)-4-(N-(5''-azidopentanoil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	**L11 (L-INT-5)**	453.2 0.21 min 5	4.21-4.16 (dd, J=16,4, 2H), 4.05-3.99(t, J=12, 1H),3.83-3.72(m,1H), 3.56(s, 2H), 3.49-3.45(t, J=8, 3H), 3.28-3.20(m, 1H), 3.18-3.04(m,1H),3.02-2.76(m,2H),2.72-2.54(m, 2H), 2.24-2.21(t, J=8, 2H),1.72-1.56(m, 5H), 1.13(s,3H), 1.26-1.21(m, 2H),1.07-0.90(m, 1H), 0.76-0.74(t, J=4, 2H)

Ligantes que no dejan huellas: L12 y L13



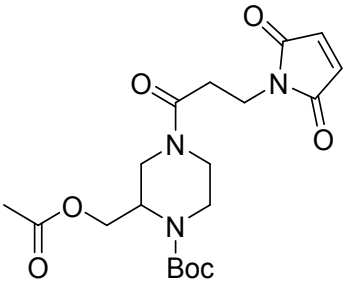
L-12a. 1-(Boc)-2-(hidroximetil)-4-(N-maleoil-beta-alanil) piperazina



Terc-butil 2-(hidroximetil) piperazina-1-carboxilato (200 mg, 0.93 mmol) fue disuelto en diclorometano (10 mL) a 0 °C. Se agregaron diisopropiletilamina (359 mg, 2.78 mmol) y HATU (422 mg, 1.11 mmol) y la solución fue agitada 15 minutos a 0 °C. Se agregó ácido

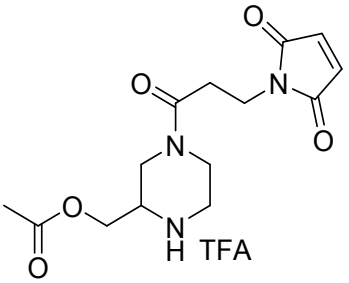
3-maleimidopropionico (187 mg, 1.11 mmol), y la mezcla de reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente bajo argón. La reacción se diluyó con agua y fue extraída con diclorometano. La capa orgánica fue lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y concentrada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina neutra, 2% metanol : etil acetato) produjo el material del título **L-12a**. LCMS (Método 6): tiempo de retención = 2.87 min.

L-12b. 1-(Boc)-2-(acetoximetil)-4-(N-maleoil-beta-alanil) piperazina



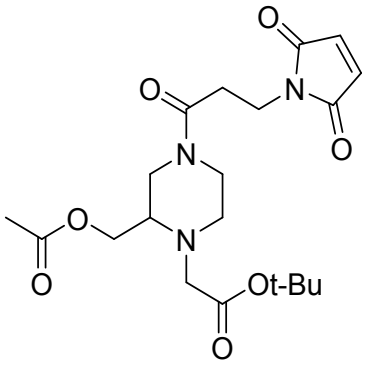
A **L-12a** (300 mg, 0.82 mmol) y trietilamina (330 mg, 3.27 mmol) en diclorometano (4 mL) a 0 °C bajo argón se agregó gota a gota cloruro de acetilo (125 mg, 1.64 mmol). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 h, luego tratada con agua y extraída con diclorometano. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio), concentrada y purificada por cromatografía instantánea (alúmina neutra, 2% metanol : etil acetato) para proveer el material del título **L-12b**. LCMS (Método 6): tiempo de retención = 3.2 min.

L-12c. 1-(N-maleoil-beta-alanil)-3-(acetoximetil)piperazina, sal de ácido trifluoroacético



L-12b (200 mg, 0.49 mmol) fue disuelto en diclorometano (5 mL) a 0 °C, luego se trató por goteo con ácido trifluoroacético (0.4 mL) y agitado a temperatura ambiente 3 h bajo argón. La reacción fue evaporada, lavada con pentano y secada para proveer el material del título crudo **L-12c.** LCMS (Método 6): tiempo de retención = 1.709 min; MS (ESI+) *m/z* 310 (M+H).

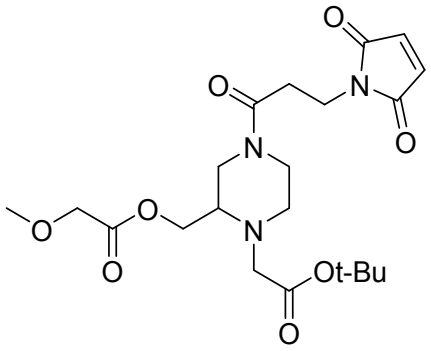
L12. Éster t-butílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-maleoil-beta-alanil)-1-piperazinaacético



A **L-12c** (140 mg, 0.45 mmol) y carbonato de potasio (156 mg, 1.13 mmol) en acetonitrilo (5 mL) a 0 °C se agregó gota a gota terc-butil bromoacetato (100 mg, 0.54 mmol). La reacción fue entibiada a 10–15 °C, luego se agitó durante 12 h a temperatura ambiente bajo argón. La reacción se diluyó con agua y fue extraída con etil acetato. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio), concentrada y purificada por HPLC preparativa (columna: zorbax eclipse XDB C18, 21.2 × 150 mm, 5 µm; Fase móvil A = agua, fase móvil B=acetonitrilo; tiempo = 0 min: 30% B; 2 min: 40% B; 10 min: 60% B) para proveer **L12**. LCMS (Método 6): tiempo de retención = 3.08 min; MS (ESI+) *m/z* 424 (M+H). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, ppm) 6.69 (s, 2H), 4.25-4.14 (m, 2H), 4.09-3.96 (m, 2H), 3.88-3.83 (t, J=9, 2H), 3.65-3.54 (m, 1H), 3.46-3.33 (m, 2H), 3.31-3.17 (m, 2H), 3.05-2.98 (m ,2H), 2.84-2.75 (m, 2H), 2.68-2.63 (t, J=9,2H), 2.09-2.07 (d, J=6, 3H), 1.45 (s, 9H).

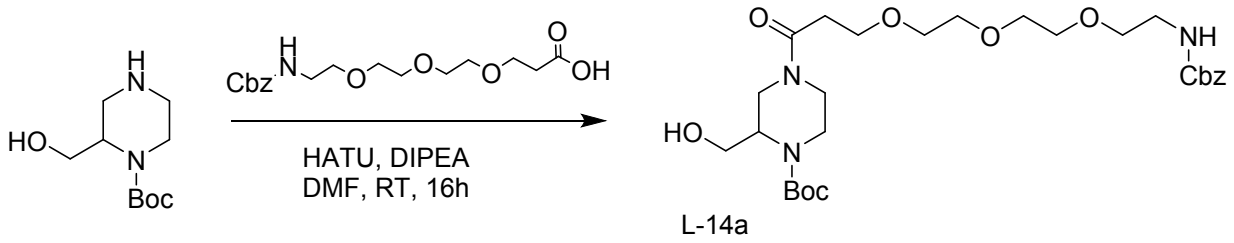
L13 se preparó utilizando métodos análogos a los usados en la síntesis de **L12:**

L13. Ester t-butílico de ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(N-maleoil-beta-alanil)-1-piperazinaacético (1-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-4-(3-(maleimidil)propanoil) piperazin-2-il)metil 2-metoxiacetato

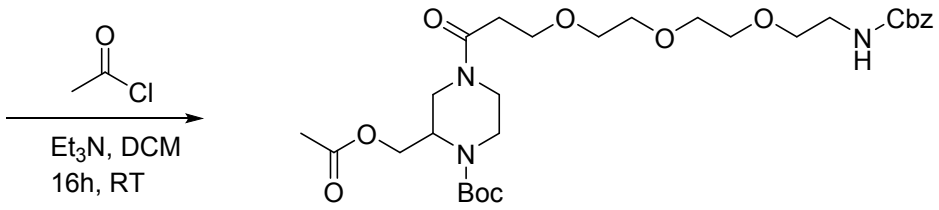


L13. LCMS (Método 6): tiempo de retención = 3.04 min; MS (ESI+) *m/z* 454.5 (M+H). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, ppm) 6.70 (s, 2H), 4.40-4.24 (m, 1H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.07-4.60 (d, J=4, 2H), 4.02-3.94 (m, 1H), 3.87-3.83 (t, J=8, 2H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.68-3.60 (m, 1H),3.58-3.51 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.41-3.39 (d, J=8, 1H), 3.36-3.32 (s, 1H), 3.32-3.28 (s, 1H), 3.18-3.10 (m, 1H), 3.04-2.97 (m,1H), 2.83-2.81 (t, J= 4, 1H), 2.79-2.75 (m, 1H), 2.67-2.64 (t, J= 8, 2H), 1.46 (s,9H).

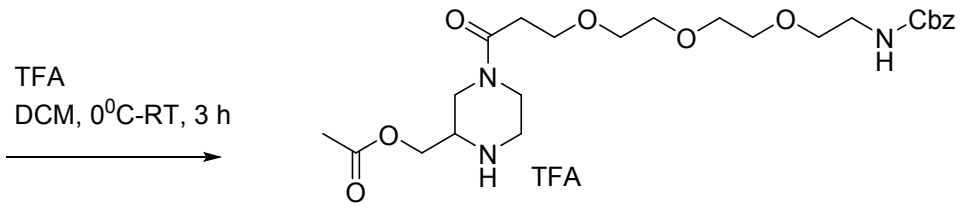
Ligantes que no dejan huellas; L14–L16



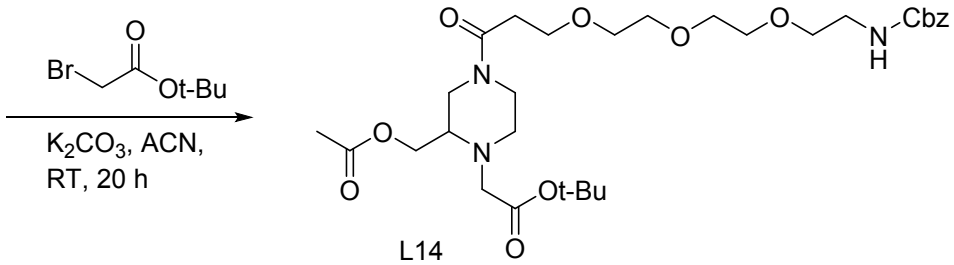
L-14a



L-14b

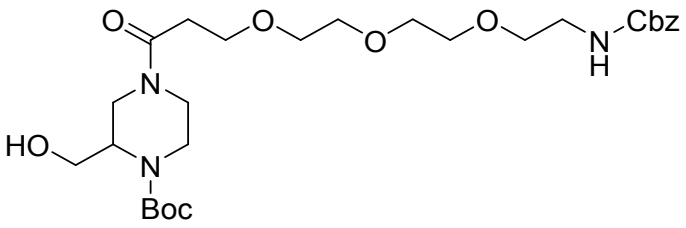


L-14c



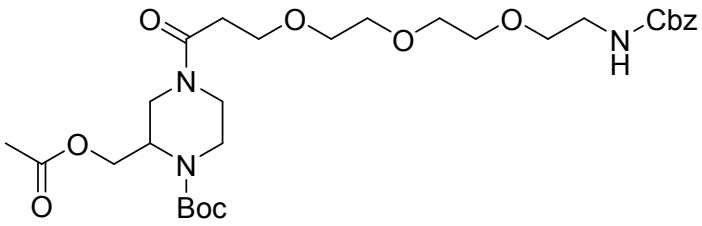
L14

L14a. 1-(Boc)-2-(hidroximetil)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi) etoxi)propanoil) piperazina



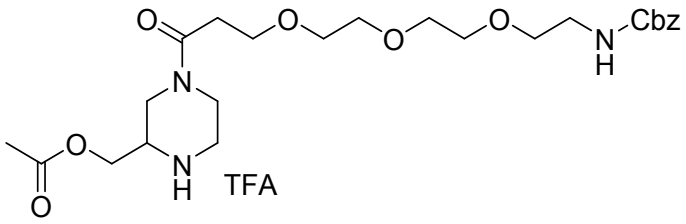
A terc-butil 2-(hidroximetil) piperazina-1-carboxilato (1.0 g, 4.63 mmol) disuelto en diclorometano (20 mL) a 0 °C se agregó diisopropiletilamina (1.79 g, 13.9 mmol) y HATU (2.10 g, 5.55 mmol). La solución fue agitada 15 minutos a 0 °C. Se agregó ácido 3-(2'-(2''-(2'''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico (1.64 g, 4.63 mmol) y la reacción fue agitada 16 h a temperatura ambiente bajo argón. La reacción se diluyó con agua y fue extraída con etil acetato. La capa orgánica fue lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y concentrada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 1–4% metanol : diclorometano) dio como resultado el material del título **L-14a**. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 1.27 min; MS (ESI+) *m/z* 554.3 (M+H).

L-14b. 1-(Boc)-2-(acetoximetil)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil) piperazina



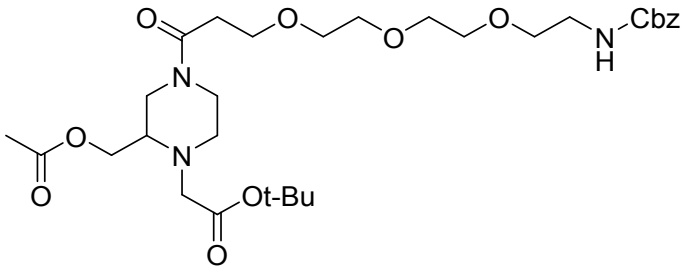
A **L-14a** (500 mg, 0.90 mmol) y trietilamina (228 mg, 2.26 mmol) disuelto en diclorometano (20 mL) a 0 °C se agregó gota a gota cloruro de acetilo (83 mg, 1.08 mmol). La reacción fue agitada a temperatura ambiente bajo argón durante 16 h. La reacción se diluyó con agua y fue extraída con diclorometano. La capa orgánica combinada fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada, luego purificada por cromatografía instantánea (SiO_2, 1–4% metanol : diclorometano) para proveer el material del título **L-14b**. LCMS (Método 7): tiempo de retención = 1.54 min; MS (ESI+) *m/z* 595.8 (M+H).

L-14c. 1-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil)-3-(acetoximetil)piperazina, sal de ácido trifluoroacético



L-14b (500 mg, 0.84 mmol) fue disuelto en diclorometano (10 mL) a 0 °C, luego se trató por goteo con ácido trifluoroacético (3 mL) y fue agitado a temperatura ambiente 3 h bajo argón. La reacción fue evaporada, lavada con pentano y secada para proveer el material del título crudo **L-14c**, que fue llevado a la siguiente reacción sin purificación o análisis adicional.

L14. Ester t-butílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil)-1- piperazinaacético



A **L-14c** (500 mg, 1.0 mmol) y carbonato de potasio (418 mg, 3.03 mmol) en acetonitrilo (10 mL) a 0 °C se agregó gota a gota terc-butil bromoacetato (295 mg, 1.51 mmol). La reacción fue agitada durante 20 h a temperatura ambiente bajo argón. La reacción se diluyó con agua y fue extraída con etil acetato. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio), concentrada y purificada mediante una cromatografía instantánea inicial (SiO_2, 1–5% metanol : diclorometano), seguida por HPLC preparativa (columna: zorbax eclipse XDB C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm; Fase móvil A = 0.01% TFA en agua, fase móvil B=acetonitrilo: metanol (1:1), 1 mL/min; tiempo = 0 min: 30% B; 1 min: 70% B; 6

min: 100% B) para proveer **L14**. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 3.43 min; MS (ESI+) *m/z* 610.35 (M+H). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, ppm) 7.36-7.31 (m, 5H), 5.49 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.26-4.16 (m, 1H), 4.07-3.98(m, 1H), 3.78-3.74(t, J=6, 2H), 3.60-3.53(m, 11H), 3.39-3.32(m, 4H), 2.84-2.72(m, 2H), 2.61-2.57(t, J=3, 2H), 2.08-2.06(d, J=6, 2H), 1.45(s, 9H).

Las especies que se listan en la Tabla 10 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **L14:**

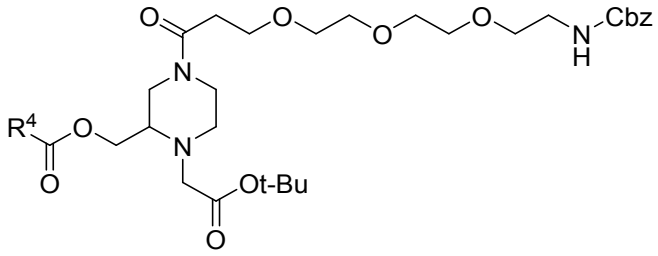
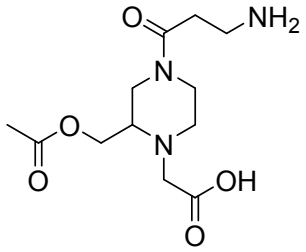
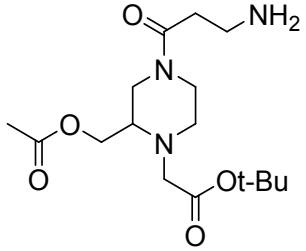
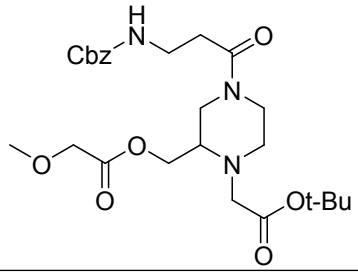
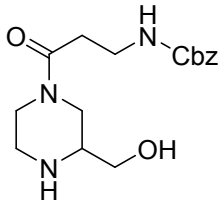
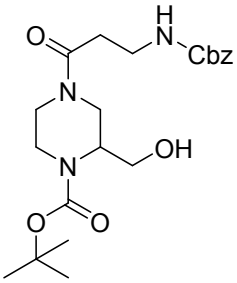
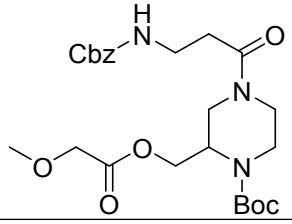
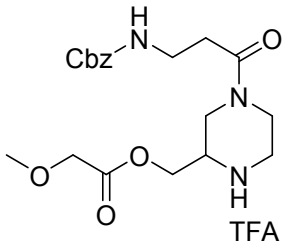
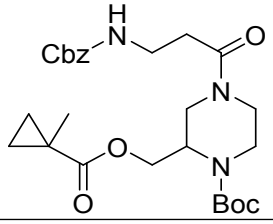
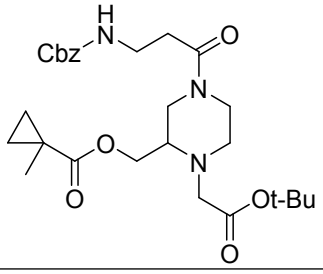
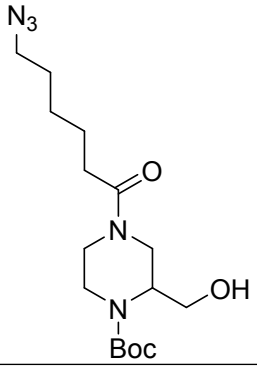
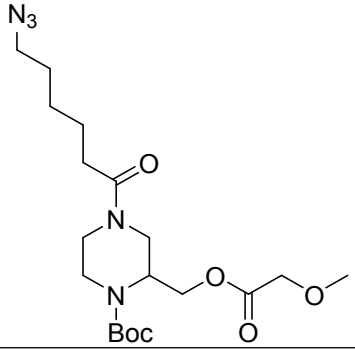
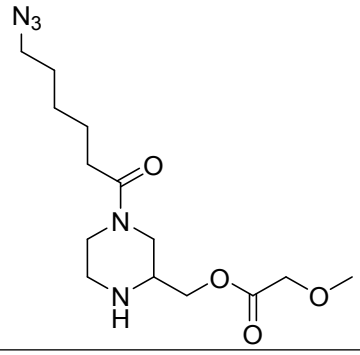
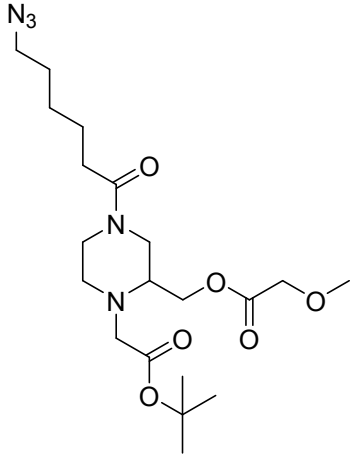
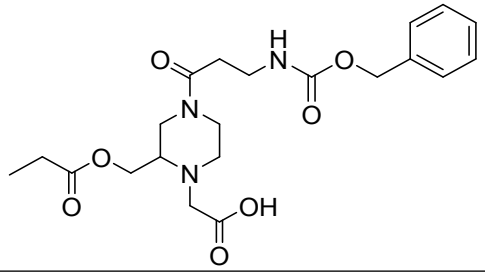
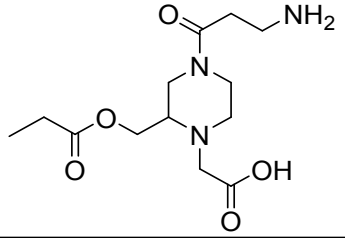
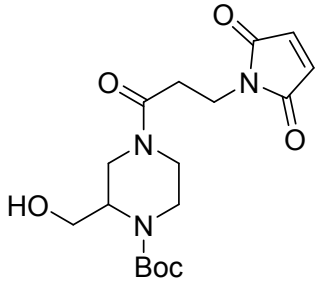
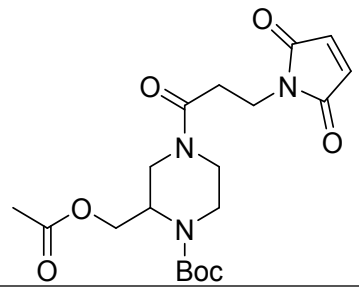
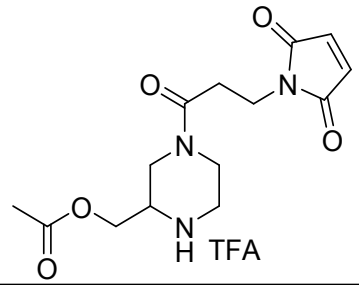
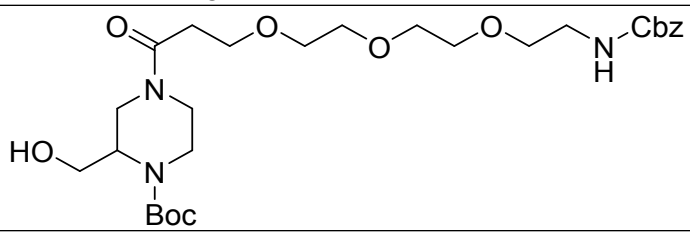
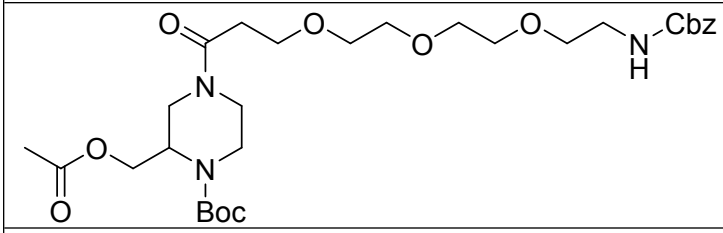
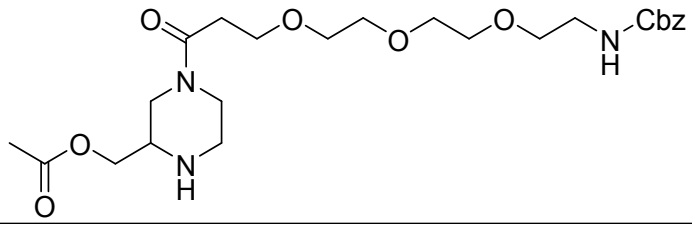


Tabla 10. Ejemplos de Especies de Ligantes que no dejan huellas			
R^4, Nombre	**Número**	**LCMS: [M+H]; Tiempo de Retención; Método**	**^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$)**
R^4 = CH_3CH_2- Ester t-butílico de ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil)-1-piperazinaacético	**L15**	624.35; 3.60 min; 5	7.36-7.30 (m, 5H), 5.41 (s 1H), 5.09 (s, 2H), 4.28-3.96 (m, 3H), 3.78-3.74 (t, J=6, 3H), 3.60-3.53 (m, 12H), 3.43-3.22(m, 6H), 3.10-2.92 (m, 2H),2.81-2.74(m, 2H), 2.61-2.56(t, J=9, 2H), 2.39-20 (m, 2H), 1.63(s, 3H), 1.45(s, 9H), 1.16-1.10(t, J=6, 3H).
R^4 = $(CH_3)_2CH$- Ester t-butílico de ácido 2-(isobutanoiloximetil)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-amino)etoxi)etoxi)etoxi)propanoil)-1-piperazinaacético	**L16**	638.35; 3.60 min; 5	7.36-7.30 (m, 5H), 4.95 (s, 1H), 5.10(s, 2H), 4.26-4.12 (m, 2H), 4.08-3.96(m, 2H), 3.81-3.76(m, 3H), 3.61(s, 8H), 3.57-3.54 (t, J=4, 3H), 3.41-3.19(m, 6H),3.11-3.04(m, 1H), 3.02-2.88 (m, 1H), 2.84-2.72 (m, 2H), 2.60-2.57 (m, 3H), 1.45(s, 9H), 1.18-1.16(d, J=8, 6H).

Tabla 11. Ejemplos de Intermedios Sintéticos de Ligantes que no dejan huellas		
Estructura	**Número**	**Compuestos Análogos**
	**L-2b**	**L-1b, L-3b, L-4b, L-5b, L-6b, L-7b**
	**L-2a**	**L-1a, L-3a, L-4a, L-5a, L-6a, L-7a**
	**L-INT-1**	**L-INT-2, L-INT-3, L-INT-4**
	**L-INT-1b**	**L-INT-2b, L-INT-3b, L-INT-4b**
	**L-INT-1c**	**L-INT-2c, L-INT-3c, L-INT-4c**
	**L-INT-1d**	**L-INT-2c, L-INT-3c, L-INT-4c**

	**L-INT-1e**	**L-INT-2c, L-INT-3c, L-INT-4c**
	**L-INT-5a**	
	**L-INT-5b**	
	**L-8a**	
	**L-8b**	

	**L-8c**	
	**L-8d**	
	**L-9a**	**L-10a, L-11a**
	**L-9b**	**L-10b, L-11b**
	**L-12a**	**L-13[a]**

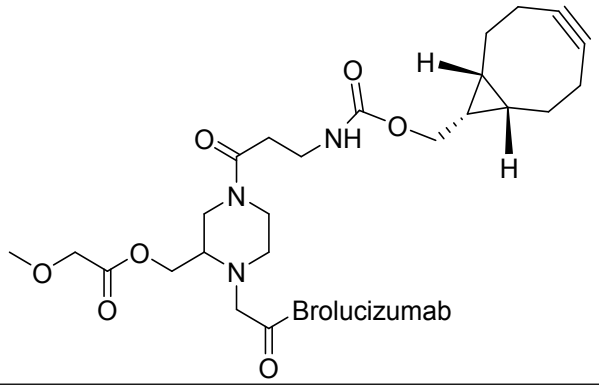
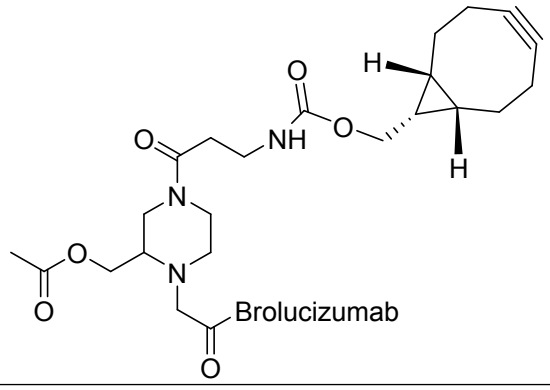
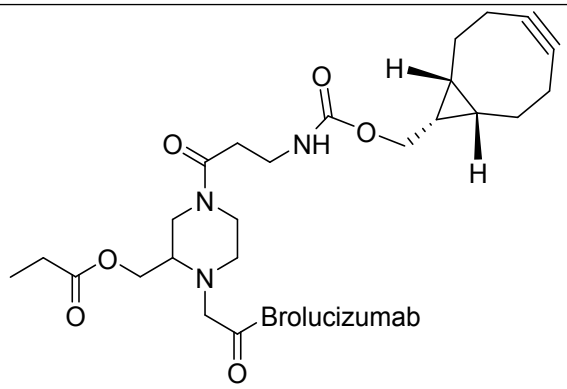
	**L-12b**	**L-13b**
	**L-12c**	**L-13c**
	**L-14a**	**L-15a, L-16a**
	**L-14b**	**L-15b, L-16b**
	**L-15c**	**L-15c, L-16c**

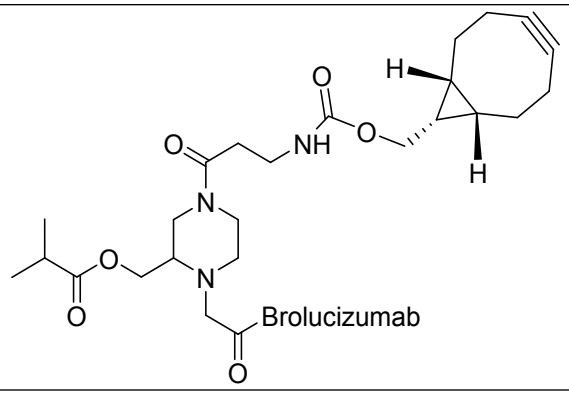
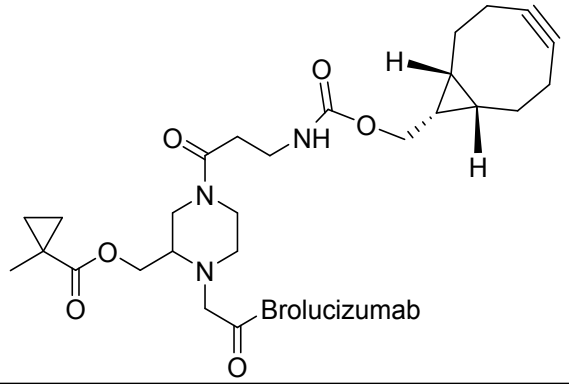
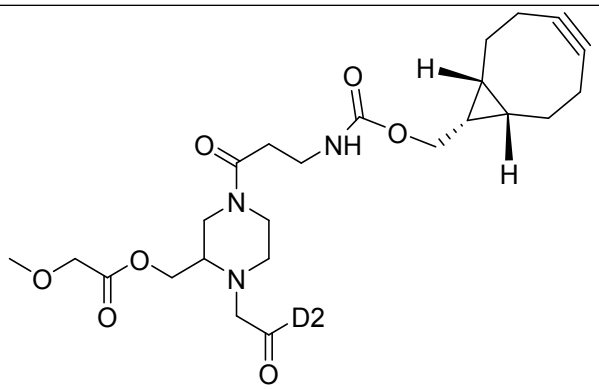
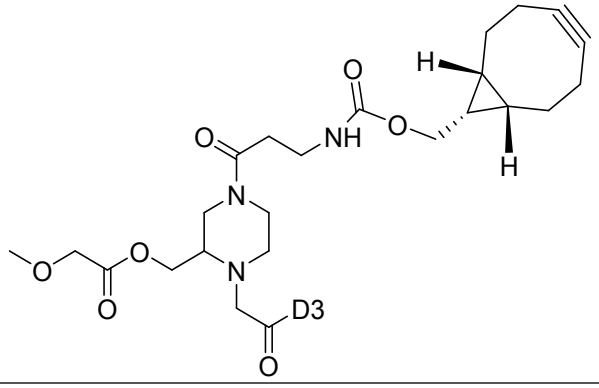
Ejemplo 2

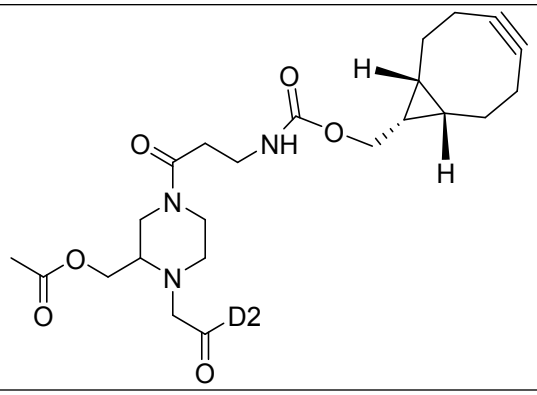
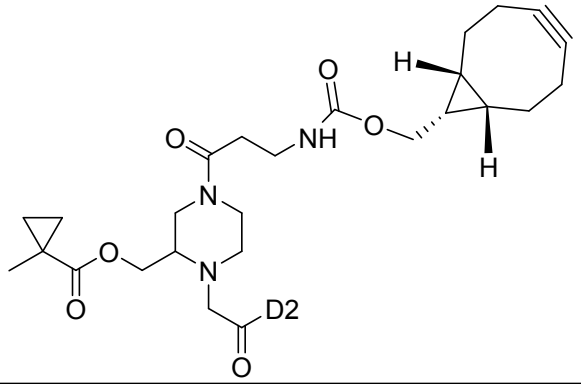
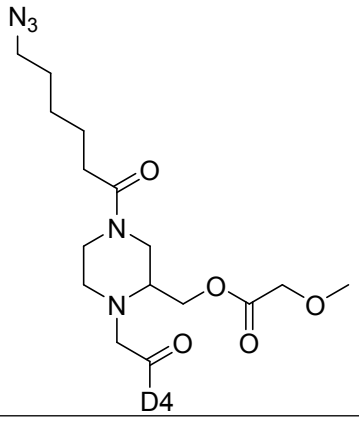
Aductos de Ligantes que no dejan huellas con Restos Biológicamente Activos

El presente ejemplo describe la síntesis de cierto número de aductos de ligantes que no dejan huellas y fármacos que también son capaces de conjugarse a un portador.

Tabla 12. Ejemplos de Aductos de Ligante que no deja huellas–Fármaco

Número	Estructura	Ligante que no deja huellas	Fármaco
L1D1		**L1**	Brolucizumab = D1
L2D1		**L2**	Brolucizumab = D1
L3D1		**L3**	Brolucizumab = D1

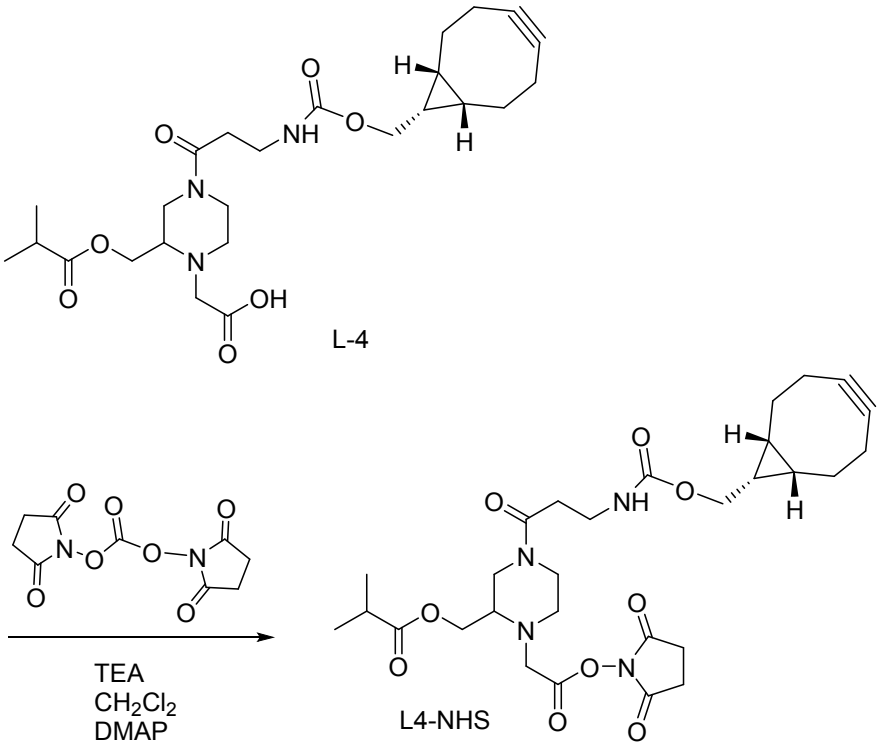
L4D1		**L4**	Brolucizumab = D1
L5D1		**L5**	Brolucizumab = D1
L1D2		**L1**	D2
L1D3		**L1**	D3

L2D2		**L2**	D2
L5D2		**L5**	D2
L8D4		**L8**	D4

Síntesis de Aductos

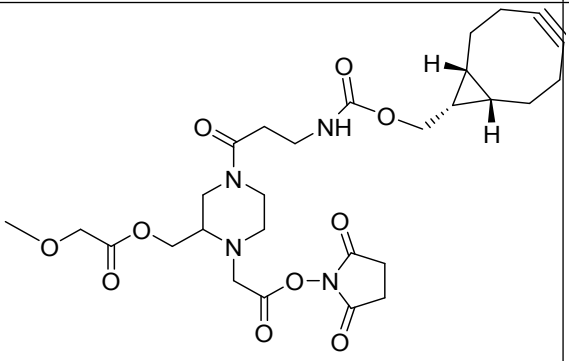
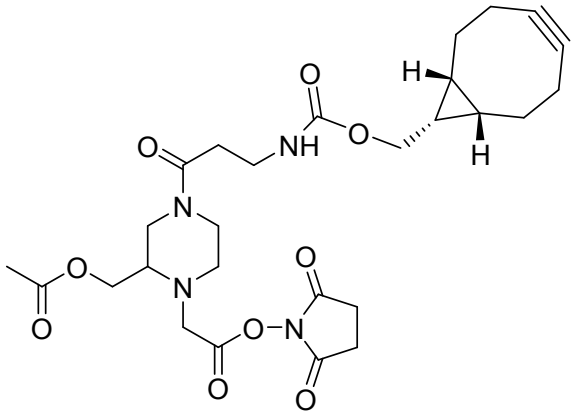
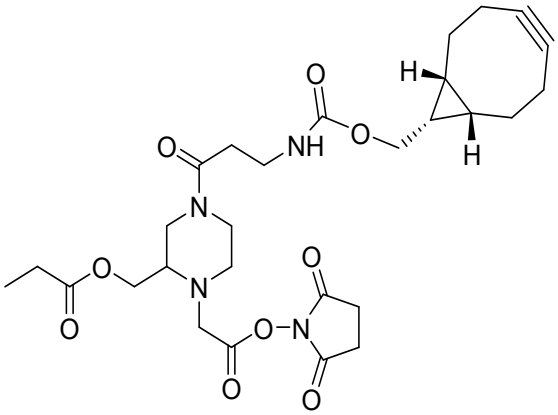
Acilación de restos biológicamente activos con un ligante que no deja huellas:

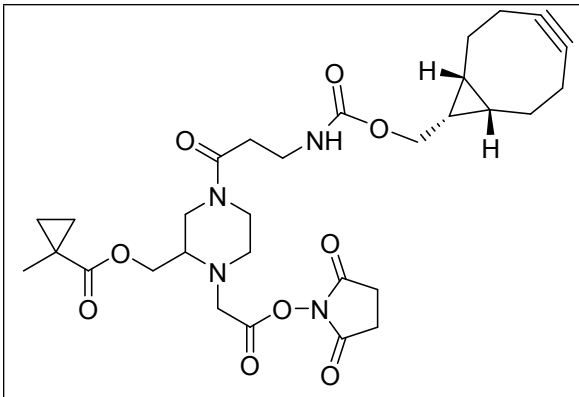
L4-NHS. Ester N-hidroxisuccinimidílico de ácido 2-(isobutanoiloximetil)-4-(N-(((1R',8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético



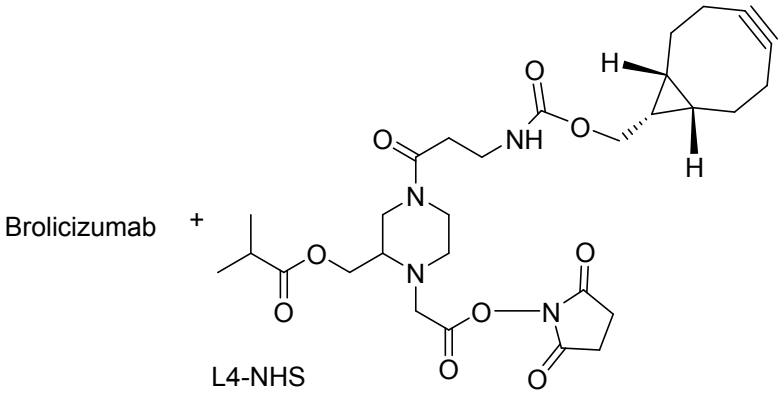
Una suspensión de **L4** (22 mg, 0.045 mmol) en diclorometano (5 mL) fue tratada con trietilamina (0.0062 mL, 0.045 mmol), dimetilaminopiridina (0.55 mg, 0.0045 mmol) y N, N'-disuccinimidil carbonato (10.9 mg, 0.043 mmol) y fue agitada durante 2 h a temperatura ambiente, luego evaporada y usada en forma inmediata como tal sin purificación adicional. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.33 min; MS (ESI+) *m/z* 589.6 (M+H).

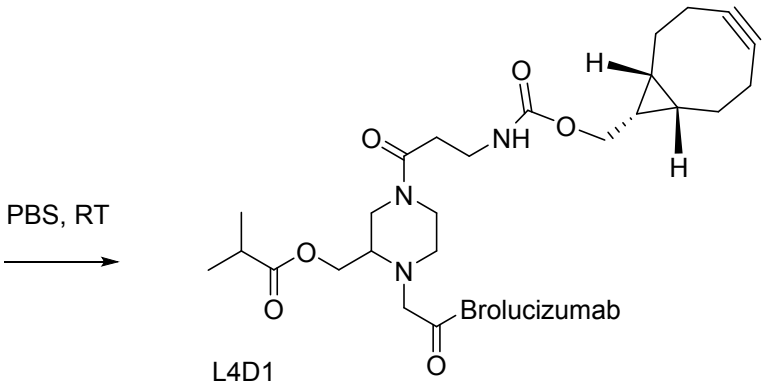
Las especies de la Tabla 13 se prepararon utilizando métodos análogos a los usados en la síntesis de **L4-NHS**.

Tabla 13. Ejemplos de Especies de Ligantes que no dejan huellas activados			
Estructura	**Número (Intermedio inicial)**	**Nombre**	**MS (ESI+) *m/z* (M+H)** tiempo de retención; método
	**L1-NHS (L1)**	Ester N-hidroxisuccinimidílico de ácido 2-(2'-metoxiacetoximetil)-4-(N-(((1''R,8''S,9''s)-biciclo[6.1.0]non-4''-in-9''-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	591.4; 0.87 min; 2
	**L2-NHS (L2)**	Ester N-hidroxisuccinimidílico de ácido 2-(acetoximetil)-4-(N-(((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	561.4; 0.87 min; 2
	**L3-NHS (L3)**	Ester N-hidroxisuccinimidílico de ácido 2-(propanoiloximetil)-4-(N-(((1'R,8'S,9's)-biciclo[6.1.0]non-4'-in-9'-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	575.5; 0.91 min; 4

	**L5-NHS (L5)**	Ester N-hidroxisuccinimidílico de ácido 2-(1'-metilciclopropilcarbonil oximetil)-4-(N-(((1''R,8''S,9''s)-biciclo[6.1.0]non-4''-in-9''-il)metoxicarbonil)-beta-alanil)-1-piperazinaacético	601.4; 0.99 min; 4

L4-Brolucizumab (L4D1b)





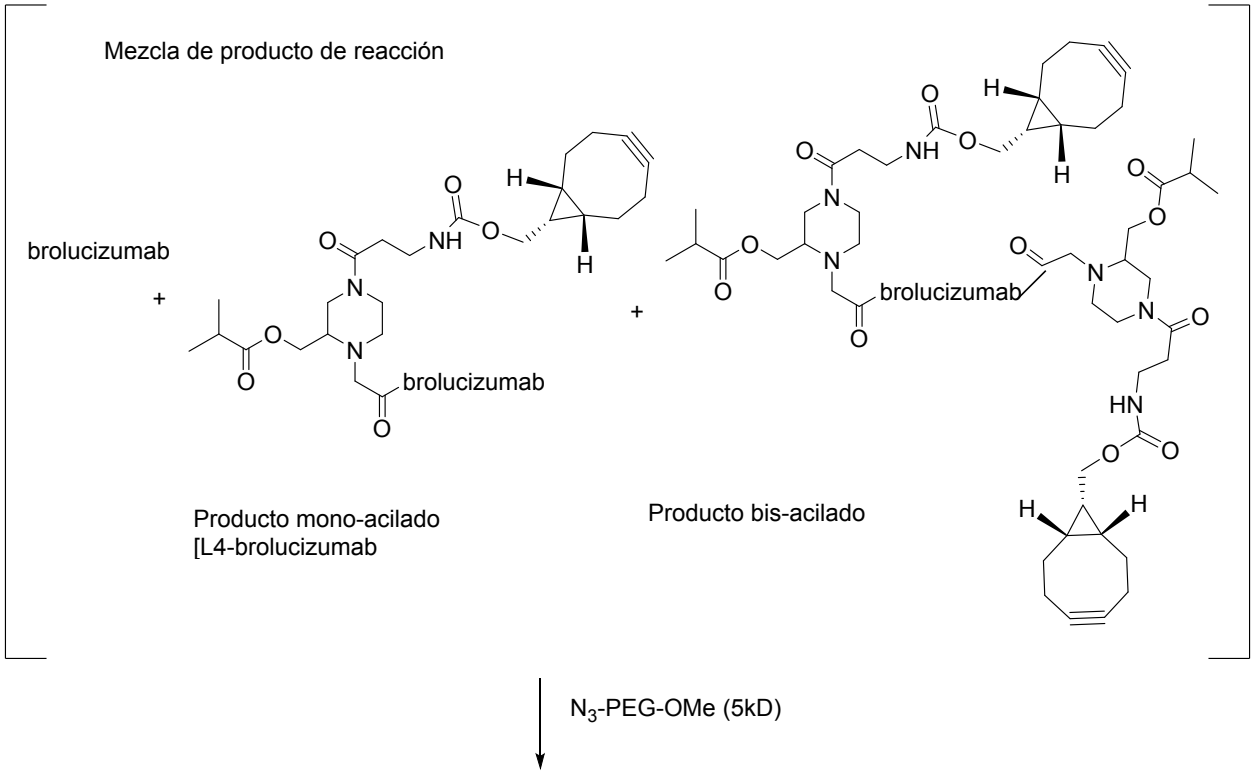
Una 60 mg/mL solución de brolucizumab (10 mL, 0.023 mmol) en un tampón compuesto por 20 mM de citrato trisódico dihidrato, 125 mM cloruro de sodio, 0.01 mg/mL Tween 20, a pH 6.25, se diluyó con 1× PBS (10 mL, pH 7.4) para proveer una solución de 30 mg/mL, que luego fue tratada lentamente con una solución de 38 mM de L4-NHS

en DMSO (0.65 mL, 0.023 mmol), sometida a vórtice, y mantenida a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación por ultracentrifugación (Concentradores Vivaspin, 10 kDa MWCO), lavando con 1× PBS (4 times) eliminó las impurezas residuales de moléculas pequeñas, lo que dio como resultado una mezcla de **L4D1 y** brolucizumab sin modificar (**D1**). MS (Método 9) *m/z* desconvolucionada 26312 (brolucizumab, M+H); *m/z* desconvolucionada 26786 (**L4D1**, M+H, MW esperado = MW (brolucizumab) + 473).

Un parámetro analítico importante es la determinación de la proporción de (brolucizumab sin modificar, n = 0): (brolucizumab mono-acilado, n = 1) : (brolucizumab poli-acilado, n> 1). La comparación de las alturas de pico relativas para las diversas especies en un espectro de masas permite hacer una estimación de la relación del producto, pero esta relación podría no ser precisa, ya que los diversos productos pueden no tener factores de respuesta molar similares en el análisis de MS. En este ejemplo: el análisis de MS indicó una relación de producto de [(n=0) : (n=1) : (n=2)] ~ 5 : 1 : 0 (Método 9).

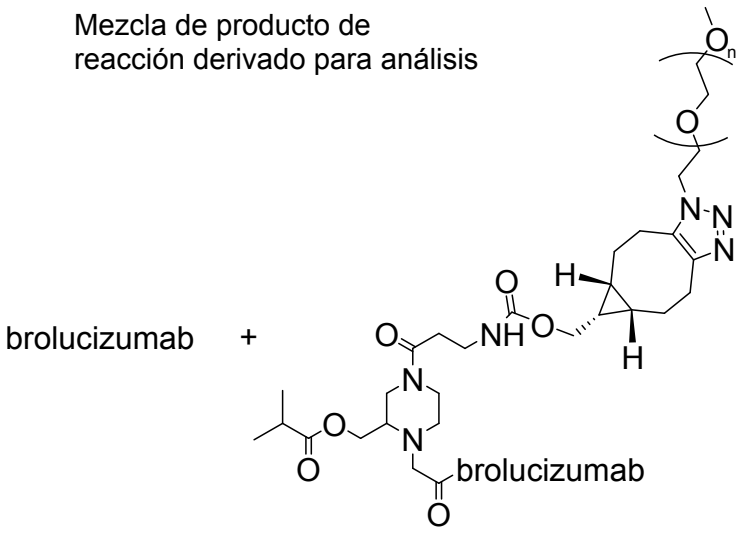
Un método adicional para estimar la relación de productos de reacción utiliza el análisis SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) o SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) de productos de reacción derivatizados; se requiere la derivatización para lograr la separación de los productos de reacción.

Reacción de Derivatización de L4D1b

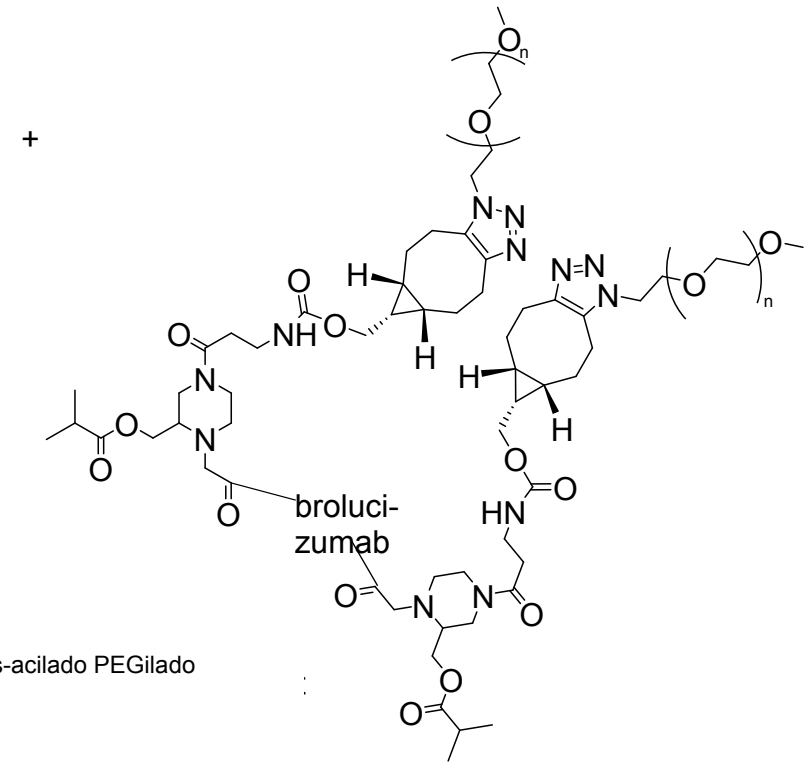


N_3-PEG-OMe (5kD)

Mezcla de producto de
reacción derivado para análisis



Producto mono-acilado PEGilado



Producto bis-acilado PEGilado

Una alícuota de la solución de reacción de 30 mg/mL de la mezcla de reacción de **L4D1b** (0.005 mL, 0.0057 µmol) fue tratada con a M_n ~ 5 kDa metoxi-PEG-azida (Sigma-

Aldrich, 689475, 10 µL de una solución de 100 mg/mL en 1× PBS, 0.20 µmol), sometida a vórtice, luego agitada a 37 °C durante 45 min.

Análisis del derivado de L4D1b

SEC: (Columna: Agilent AdvanceBioSEC 300A 2.7 µm 4.6 × 150 mm; Fase móvil: 150 mM fosfato de potasio en agua con 5% isopropanol (isocrático); método rápido: 0.2 mL/min durante 13 min; método lento: 0.1 mL/min durante 25 min; Detección: 210 nm). La determinación del derivado de **L4D1b** de la relación de (brolucizumab sin modificar, n=0, tiempo de retención = 12.74 minutos (método lento)) : (brolucizumab mono-acilado, n=1, tiempo de retención = 11.26 minutos (método lento)) : (brolucizumab bis-acilado, n=2, tiempo de retención = 10.36 minutos (método lento)) = [(n=0) : (n=1) : (n=2)] = 81 : 18 : 1.

SDS-Page: (Tampón de corrida MOPS; NuPage® Novex® 4–12% Geles Bis-Tris; marcado con Azul de Coomassie; generador de imágenes Bio-Rad ChemiDoc; sofware de análisis Image Lab 5.2.1): Determinación del derivado de **L4D1b** de la relación de (brolucizumab sin modificar, n=0): (brolucizumab mono-acilado, n=1) : (brolucizumab poli-acilado, n=2) = [(n=0) : (n=1) : (n=2)] ~ 67 : 33 : traza.

Los aductos que se listan en la Tabla 14 y la Tabla 15 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **L4D1b**. Las condiciones de reacción usadas para preparar los aductos se detallan en la Tabla 14; las características de los aductos están descriptas en la Tabla 15.

Tabla 14. Ejemplos de Aductos D–R. Condiciones de reacción

Número	Estudio	Usado para preparar el conjugado	Conc. de proteína en la reacción (mg/mL)	Tampón	Equivalentes de ligante activado agregado a la reacción; ligante-NHS usado	Temperatura y tiempo de reacción
L1D1	Liberación in vitro 8.1	C1	30	D	2.0; L1-NHS	RT, 30h
L2D1a	Liberación in vitro 8.1	C2a	30	D	2.0; L2-NHS	RT 2h
L2D1b	Liberación in vivo 9.1	C2b	30	D	2.1; L2-NHS	RT, 2h
L3D1a	Liberación in vitro 8.1	C3a	30	D	2.0; L3-NHS	RT, 2h
L3D1b		C3b	30	D	1.0; L3-NHS	RT, 2h
L3D1c		C6	30	D	1.1; L3-NHS	RT, 1h
L4D1a	Liberación in vitro 8.1	C4a	30	D	2.0; L4-NHS	RT, 1h
L4D1b		C4b	30	D	1.0; L4-NHS	RT, 1h
L4D1c		C7	30	D	1.1; L4-NHS	RT, 16h
L4D1d		C14, C15	60	E	0.8; L4-NHS	RT, 1.5h
L5D1		C5	30	D	1.6; L5-NHS	RT, 16h
L1D2a		C8	5.1	A	2.1; L1-NHS	RT, 2h
L1D2b	Liberación in vitro 8.2	C10	9.1	C	2.1; L1-NHS	RT, 3h
L2D2	Liberación in vitro 8.2	C11	9.1	C	2.1; L2-NHS	RT, 1h
L5D2	Liberación in vitro 8.2	C12	9.1	C	2.1; L5-NHS	RT, 2h
L1D3		C9	5.1	B	2.1; L1-NHS	RT, 3h

Tampón de reacción A:
(1 : 2.2) = (20 mM fosfato de sodio, 40 mM cloruro de sodio, pH6.5) : (1× PBS, pH 7.4)
Tampón de reacción B:
(1 : 2) = (7 mM succinato, pH5) : (1X PBS, pH 7.4)
Tampón de reacción C:
(1.25 : 1) = (20 mM fosfato de sodio, 40 mM cloruro de sodio, pH6.5) : (1× PBS, pH 7.4)
Tampón de reacción D:
(1 : 1) = (20 mM citrato trisódico dihidrato, 125 mM cloruro de sodio, 0.01 mg/mL Tween20, pH6.25) : (1× PBS, pH 7.4)

Tampón de reacción E: 20 mM citrato trisódico dihidrato, 125 mM cloruro de sodio, 0.01 mg/mL Tween20, pH6.25

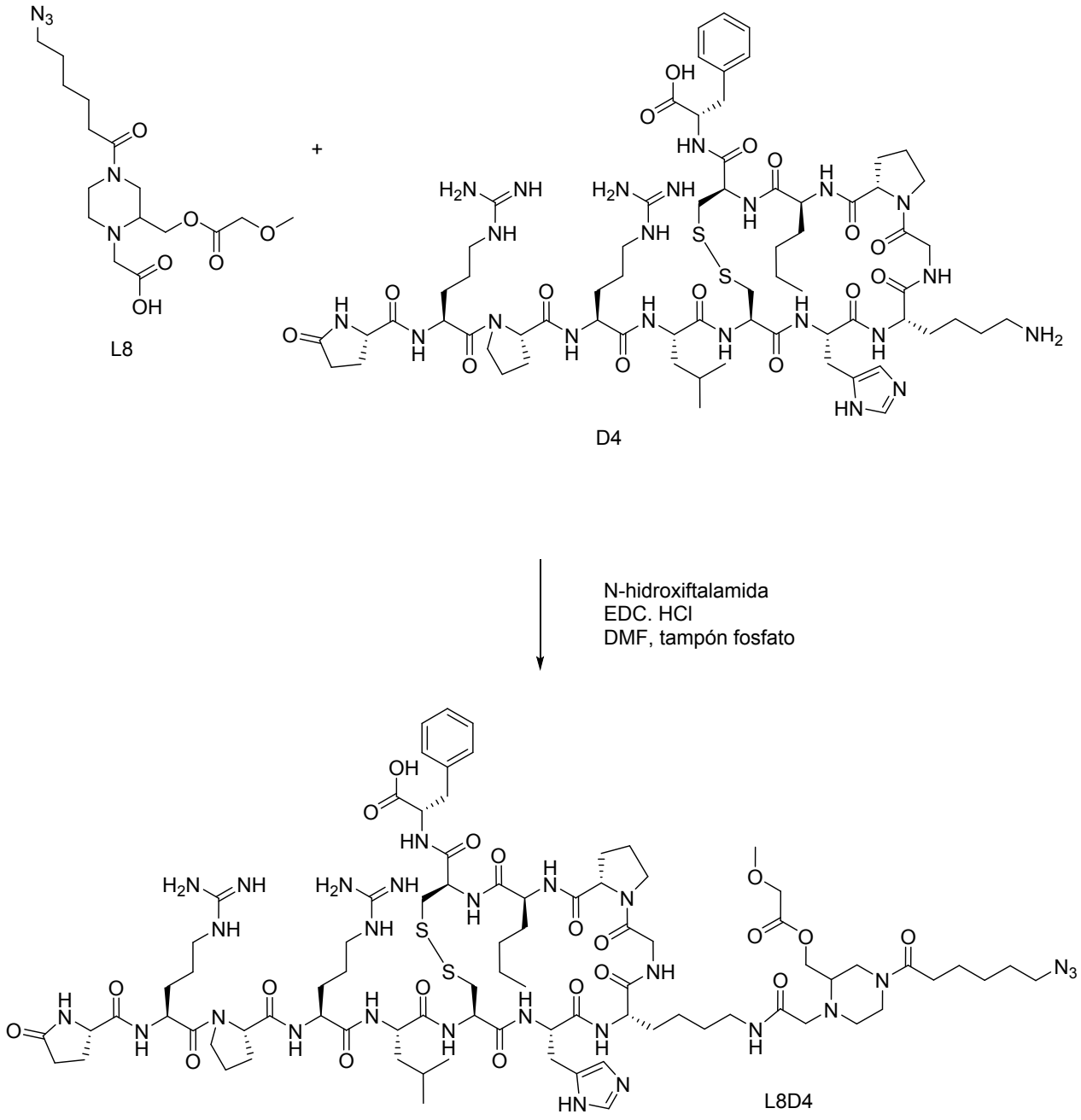
Tabla 15. Ejemplos de Aductos D–R. Caracterización del Aducto.

Número	Estudio	Usado para preparar el conjugado	MS (Método 9) *m/z* (producto mono-acilado)	Relación de producto MS (n=0 : n=1 : n=2) (Método 9)	Relación de producto SEC (n=0 : n=1 : n=2)	Relación de producto SDS-Page (n=0 : n=1 : n=2)
L1D1	Liberación in vitro 8.1	C1	26788.5	2 : 1 : traza	NA	NA
L2D1a	Liberación in vitro 8.1	C2a	26758.5	3 : 2 : traza	NA	NA
L3D1a	Liberación in vitro 8.1	C3a	26772.5	3 : 1 : traza	NA	NA
L3D1b		C3b	26773.0	5 : 1 : 0	78 : 20 : 2	68 : 32 : 0
L3D1c		C6	NA	NA	89 : 11 : 0	NA
L4D1a		C4a	26786.5	2 : 1 : traza	NA	NA
L4D1b		C4b	26786.0	5 : 1 : 0	81 : 18 : 1	67 : 33 : 0
L4D1c		C7	26786.0	NA	90 : 10 : 0	NA
L4D1d		C14, C15	26787.0	5:1:0	84:16:trace	NA
L5D1		C5	NA	NA	83 : 17 : 0	NA
L1D2a		C8	ND	ND	NA	48 : 42 : 10
L1D2b	Liberación in vitro 8.2	C10	ND	ND	NA	73 : 27 : 0
L2D2	Liberación in vitro 8.2	C11	ND	ND	NA	60 : 40 : 0
L5D2	Liberación in vitro 8.2	C12	ND	ND	NA	80 : 20 : 0

NA: no medido.

ND: Los productos de las reacciones de D2 con ligantes no se ionizan bien y no pueden detectarse utilizando la tecnología QTOF como está configurada, a menos que esté presente en una alta concentración.

L8D4



L8 (43.4 mg, 0.113 mmol) fue disuelto en dimetilformamida (2.55 mL), seguido por EDC·HCl (21.2 mg, 0.111 mmol) y N-hidroxiftalimida (18.6 mg, 0.114 mmol). La solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche (~16 hr). A esta solución se agregó **D4** (35 mg, 0.02 mmol) disuelto en 1.5 mL dimetilformamida y 1.5 mL de 100 mM tampón fosfato (pH 6.5). Luego de 2 h, la reacción se diluyó con 4 mL de acetonitrilo, fue filtrada,

y purificada por HPLC de fase inversa preparativa con recogida de fracciones dirigida a masa (Método a continuación). Las fracciones conteniendo el producto fueron agrupadas, congeladas, y liofilizadas para proveer **L8D4**. MS (ESI+) *m/z* = 952.5 $(M+2H)^{2+}$.

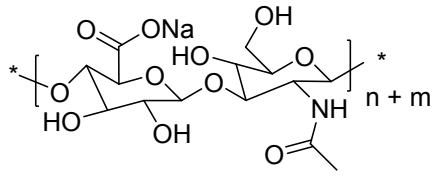
Condiciones de HPLC Preparativa: Waters XSelect CSH OBD; tamaño de partícula: 5 µm; tamaño de columna: 19 × 150 mm; eluyente/gradiente: 24% CH_3CN/H_2O/1.65 min, 24-34% CH_3CN/H_2O/8.35 minutos (CH_3CN y H_2O conteniendo 0.1% TFA); velocidad de flujo: 30 mL/min; temperatura de columna: temperatura ambiente; recolección *m/z*: +951.7.

Ejemplo 3

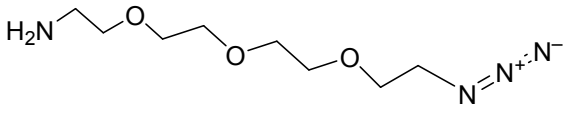
Funcionalización de ácido hialurónico

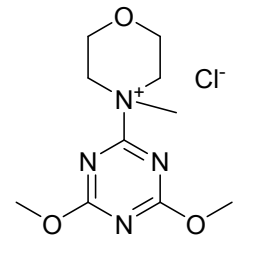
Este ejemplo describe la síntesis de un ácido hialurónico funcionalizado, que puede ser un portador en si mismo o también puede reaccionar con un resto reticulante para formar un hidrogel.

Síntesis de intermedio de ácido hialurónico [HA-N3]:

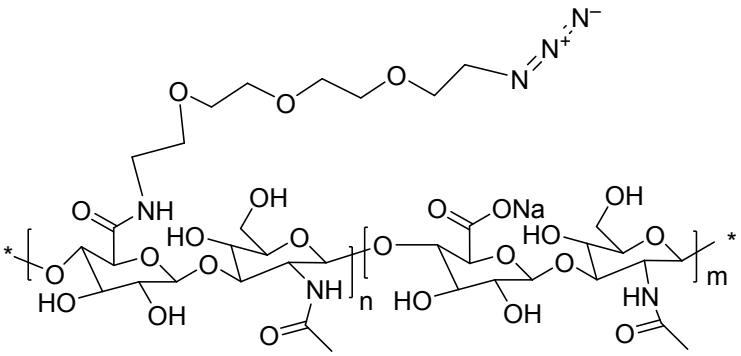


Ácido hialurónico (HA), 200 kD





50 mM MES
buffer, pH 5.5



[HA-N_3]

La sal de sodio de ácido hialurónico es un polímero lineal que consiste en unidades diméricas repetitivas de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina, con un peso molecular unitario repetitivo de 401.3 Da. En este ejemplo, los moles de ácido hialurónico informados se refieren a los moles de unidad la repetitiva y los equivalentes de reactivos utilizados en la reacción con ácido hialurónico se informan en relación con los moles de la unidad repetitiva de ácido hialurónico. El peso molecular promedio del polímero determina el número promedio de unidades repetitivas por cadena de polímero. La sal de sodio de ácido hialurónico que según el proveedor, Lifecore Biomedical (HA200K, Chaska, MN) tiene un peso molecular promedio nominal de 200kDa puede variar de un lote a otro en el rango de 151–300 kDa, según lo determinado por la viscosimetría. En este ejemplo, esta molécula de sal de sodio de ácido hialurónico con un peso molecular promedio nominal supuesto de 200 kDa tendría una longitud promedio de aproximadamente 500 unidades de monómero.

Síntesis de [HA-N3]-23%

Una solución de ácido hialurónico, sal de sodio (peso molecular promedio nominal 200 kD; 250.1 mg, 0.623 mmol; Lifecore Biomedical, LLC; número de producto HA200K) fue totalmente disuelta en 25 mL de tampón MES (50 mM, pH 5.5). A esta solución se agregó 4-(4',6'-dimetoxi-1',3',5'-triazin-2'-il)-4-metilmorfolin-4-io cloruro (DMTMM, 295 mg, 1.07 mmol, 1.71 eq), y a los 5 minutos se agregó 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina (N3-PEG3-NH2, 196 mg, 0.90 mmol). La reacción fue agitada durante la noche, luego diluida con 25 mL de solución de NaCl 0.25 M y purificada por filtración de flujo tangencial.

La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo utilizando un cartucho MWCO Vivaflow-50R hidrosart de 30 kDa de Sartorius, levigando con 400 mL de solución de NaCl 0.25 M, luego 400 mL de agua.

El producto fue congelado rápidamente y liofilizado para proveer el material del título **[HA-N3]-23%** .

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.45 (bs, 2H), 4.0–3.1 (m, 15.5H), 1.95 (s, 3H).

DOSY-NMR. Los espectros de RMN ordenados por difusión unidimensional (DOSY) se recogieron usando el eco estimulado con una secuencia de pulso gradiente incoherente (stegp1s1d) en un instrumento Bruker AVANCE III a 400 MHz (para 1H) con criosonda DCH de 5 mm. El tiempo de difusión y el tiempo de gradiente de difusión se establecieron en 50 ms y 4 ms, respectivamente. Se recogieron dos espectros con fuerza de gradiente (gpz6) establecida en 2% y 95%. La comparación de los dos espectros no mostró diferencias aparte del pico del disolvente, lo que indica que no había impurezas de moléculas pequeñas en el polímero.

Análisis Elemental: C: 40.05% : H: 5.67% ; N: 5.70% .

El grado de sustitución del **[HA-N3]** se define como el % de unidades repetitivas en las que el resto carboxilato se ha sometido a una reacción para dar la amida ilustrada. El análisis elemental se utilizó para determinar el grado de sustitución. La relación [% C /% N] determinada por el análisis elemental de una muestra purificada se introduce en la siguiente fórmula para proporcionar el grado de sustitución. Dónde y = [(% C)/(% N)]) luego:

Grado de sustitución =

$$100 \times \frac{\frac{14 \times 12.01}{14.01 \times y} - 1}{4 - \frac{8 \times 12.01}{14.01 \times y}}$$

En este ejemplo, el grado de sustitución (DS) de **[HA-N3]** fue de 23% .

Este ácido hialurónico de 200 kDa, funcionalizado con 23% del ligante azida se identifica como **[HA-N3]-23%** .

En el resto de los ejemplos, un ácido hialurónico de 200 kDa, funcionalizado con X% del ligante azida se identifica como **[HA-N3]-X%** .

Las especies de la Tabla 16 se prepararon y caracterizaron utilizando métodos análogos a los utilizados en la Síntesis. de **[HA-N3]-23%** . Encontramos que el grado de sustitución alcanzado depende del stock dado de reactivo DMTMM utilizado y puede ser idiosincrásico. En general, para un stock dado de DMTMM, el grado de sustitución aumenta a medida que aumenta el número de equivalentes de DMTMM utilizado, y el grado de sustitución disminuye a medida que disminuye el número de equivalentes de DMTMM utilizado. Algunos de los intermedios [HA-N3] se purificaron por diálisis en lugar de filtración de flujo tangencial (**[HA-N3]-23% b**, **[HA-N3]-37%**). En estos casos, una mezcla de reacción cruda se introdujo en una membrana de diálisis de celulosa regenerada (MWCO 1–25 kD) y se dializó 1–3 días contra NaCl 0,25 M - 1 M, con varios cambios de la solución de diálisis, a lo que siguieron 1-3 días de diálisis contra agua desionizada, también con múltiples cambios de la solución de diálisis. Al finalizar, la muestra se retiró del tubo de diálisis, se congeló rápidamente y se liofilizó.

Tabla 16. Ejemplos de Especies de Ácido Hialurónico Funcionalizado

Derivado de ácido hialurónico	DS	Equivalentes de DMTMM/N3-PEG3-NH2 usados en la reacción	Elemental análisis
[HA-N3]-15%	15%	1.66/1.42	C: 39.80 H: 5.52 N: 4.93
[HA-N3]-22%	22%	1.65/1.42	C: 39.89 H: 5.76

			N: 5.53
[HA-N3]-23%	23%	1.71/1.44	C: 40.05 H: 5.67 N: 5.70
[HA-N3]-23% b	23%	4.08/3.04	C:36.93 H: 5.97 N: 5.18
[HA-N3]-23% c	23%	1.60/1.02	C: 36.85 H: 6.44 N: 5.19
[HA-N3]-26%	26%	1.90/1.44	C: 39.78 H: 5.72 N: 5.92
[HA-N3]-33%	33%	1.75/1.43	C: 40.60 H: 5.97 N: 6.63
[HA-N3]-37%	37%	3.84/2.88	C: 39.87 H: 5.92 N: 6.82

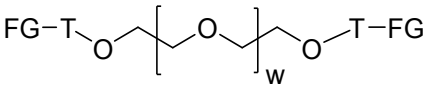
Ejemplo 4

Preparación de polímeros de PEG, XL-1–XL-10

Este ejemplo describe la síntesis de reticuladores que pueden reaccionar con otros polímeros funcionalizados para formar hidrogeles.

Polímeros de reticulación a base de PEG

Estructura general 1.



Estructura general 2.

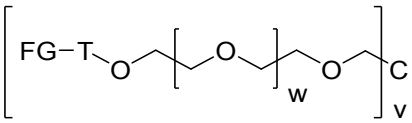
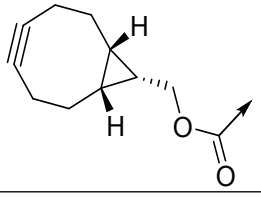
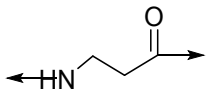
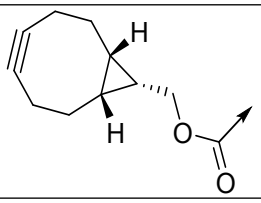
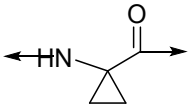
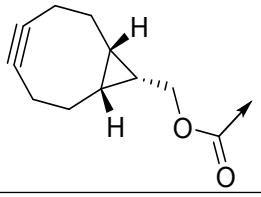
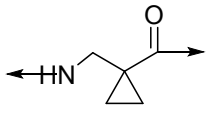
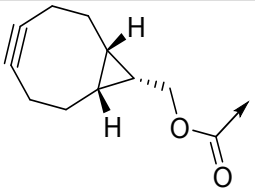
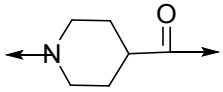
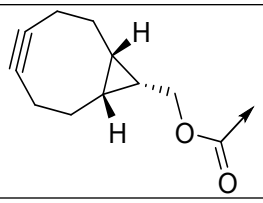
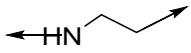
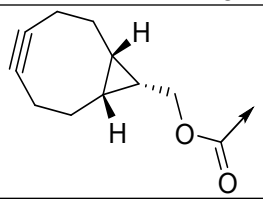
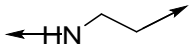
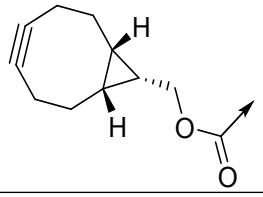
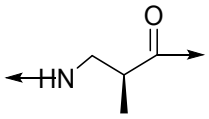
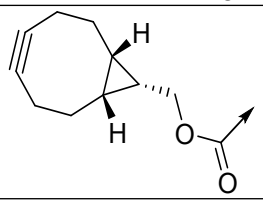
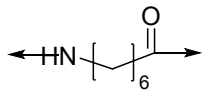
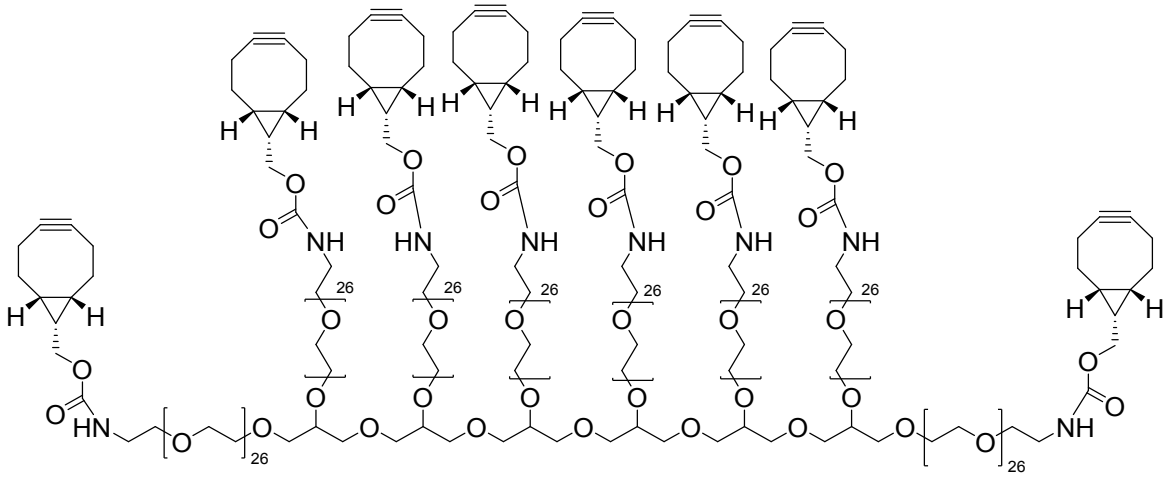


Tabla 17. Ejemplos de especies de reticulación

Número	Estructura general	FG	T	v	M_n ~ PEG inicial (Da)
XL-1	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-2	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-3	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-4	1			NA	2000 (w ~ 45)

XL-5	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-6	2			4	10000 (w ~ 57)
XL-7 (producto comercial)	2	N_3	$-CH_2CH_2-$	4	10000 (w ~ 57)
XL-9	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-10	1			NA	2000 (w ~ 45)

La estructura de **XL-8**:

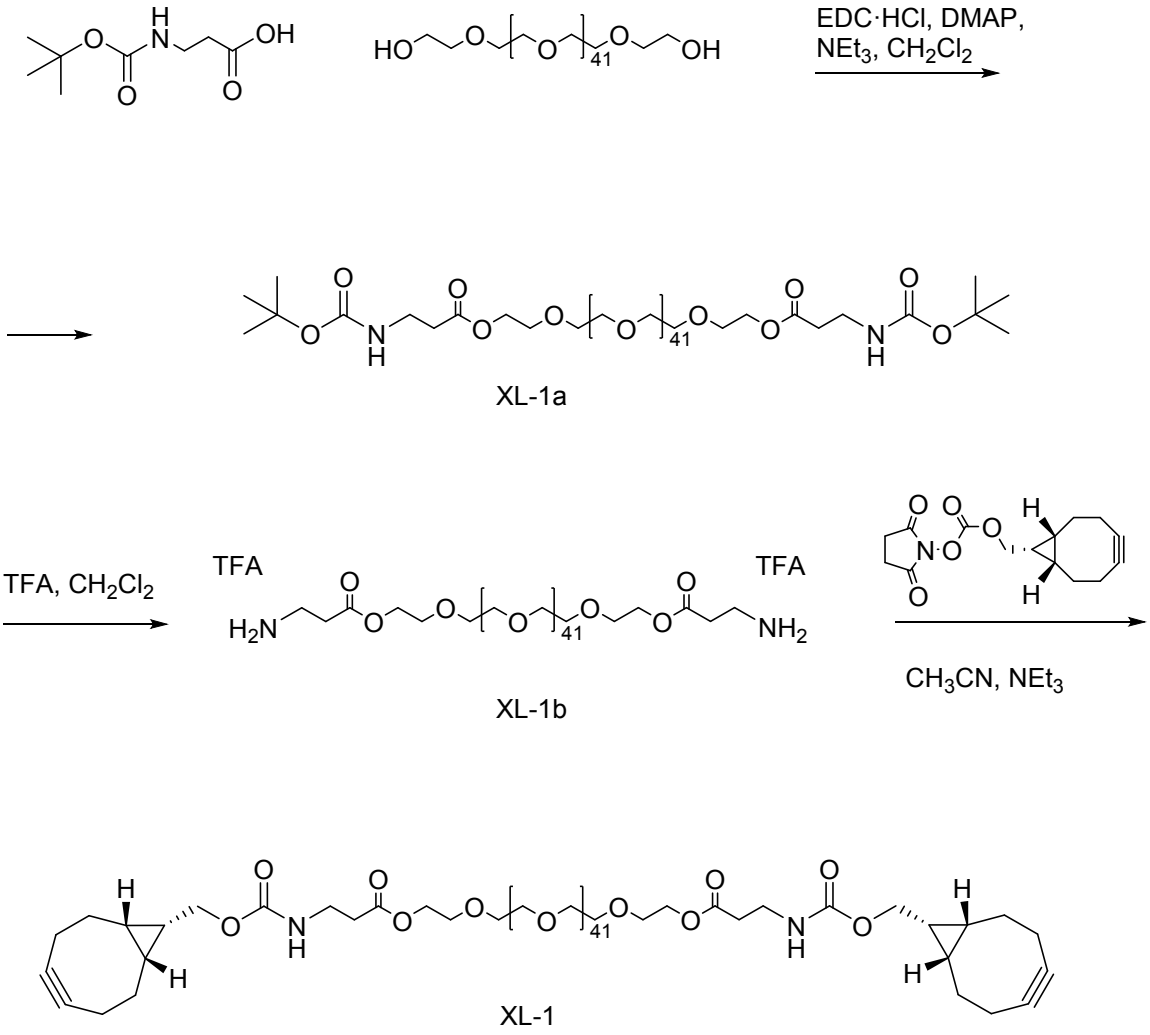


MW de PEG inicial: M_n ~ 10,000 kDa.

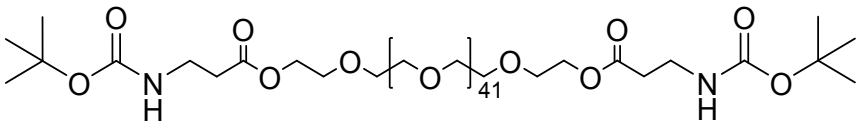
Síntesis de Polímeros de reticulación a base de PEG

El grado de sustitución es un parámetro importante para los reticuladores derivados de PEG y se define como el porcentaje de grupos finales de PEG sustituidos con el grupo funcional introducido deseado. El grado de sustitución se determinó usando ^{1}H-NMR para comparar la integración de un grupo metileno específico al grupo final PEG para la integración de protones específicos al grupo funcional introducido. Para **XL-1–XL-6**, el grupo metileno específico para el resto PEG fue el éster o carbamato metileno [–(C=O)-O-C$\underline{H_2}$-], que se comparó con la integración de protones en el resto biciclo[6.1.0]non-4-ina. Grado de sustitución = ((moles introducidos en el grupo funcional por ^{1}H-NMR)/(moles de grupo terminal de PEG por ^{1}H-NMR)) × 100.

XL-1. PEG(2000)-bis-[3-(((((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato]



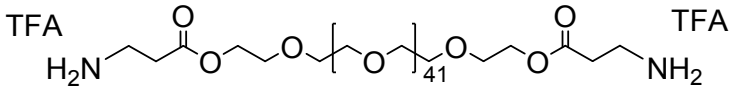
XL-1a. PEG(2000)-bis-[3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato]



Se disolvió ácido 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoico (1.892 g, 10.00 mmol) y M_n ~ 2 kDa PEG (5 g, 2.500 mmol) en 50 mL de diclorometano. Se agregaron dimetilaminopiridina (0.153 g, 1.250 mmol) y EDC·HCl (1.922 g, 10.03 mmol) y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna instantánea en sílice con un gradiente de 0–

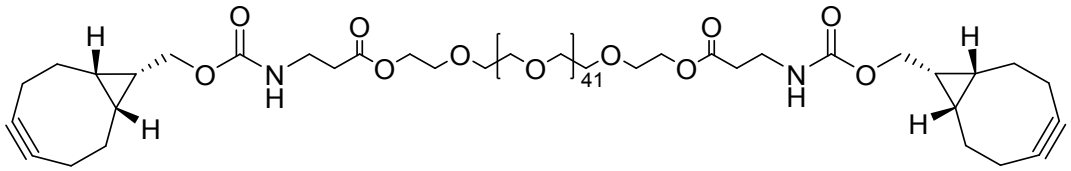
15% diclorometano : metanol. Las fracciones conteniendo el producto se combinaron y redujeron a sequedad para proveer **XL-1a**. ^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4) δ 4.23 (m, 4H), 3.70 (m, 4H), 3.63 (br s, 167H), 2.52 (m, 4H), 1.43 (br s, 18H).

XL-1b. PEG(2000)-bis-[3-(amino)propanoato], ácido bis-trifluoroacético



XL-1a (600 mg, 0.261 mmol) fue disuelto en diclorometano (6 mL). Se agregó ácido trifluoroacético (2 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida. El producto crudo fue triturado con Et_2O dos veces, luego secado bajo vacío para proveer **XL-1b**. ^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4) δ 4.33 (m, 4H), 3.73 (m, 4H), 3.64 (br s, 183H), 2.80 (m, 4H).

XL-1-1. PEG(2000)-bis-[3-(((((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanoato]



XL-1b (200 mg, 0.086 mmol) fue disuelto en acetonitrilo (3 mL). Se agregó trietilamina (0.599 mL, 4.30 mmol), seguida por ((1*R*,8*S*,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (200 mg, 0.688 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción fue directamente purificada por HPLC de fase inversa preparativa con recolección de fracción activada por ELSD (Método a continuación). Las fracciones conteniendo el producto fueron agrupadas, congeladas y liofilizadas para proveer **XL-1-1**. Con fines de almacenamiento, **XL-1-1** se mantuvo como acetonitrilo, DMSO, o solución de metanol en un congelador. HPLC-CAD analítica (Método a continuación): tiempo de retención = 11.93 min. ^{1}H NMR

(400 MHz, metanol-d4) δ 4.23 (m, 4H), 4.14 (m, 4H), 3.63 (br s, 175H), 2.54 (m, 4H), 2.22 (m, 12H), 1.60 (m, 4H), 1.37 (m, 2H), 0.94 (m, 4H).

Condiciones de HPLC Preparativa: Waters XBridge C18; tamaño de partícula: 5 µm; tamaño de columna: 19 × 250 mm; eluyente/gradiente: 5% CH_3CN/H_2O/0.5 min, 5–95% CH_3CN/H_2O/12.5 min, 95% CH_3CN/H_2O/3 min; velocidad de flujo: 30 mL/min; temperatura de columna: temperatura ambiente.

Condiciones de HPLC-CAD analítica: Waters XBridge BEH300 C18; tamaño de partícula: 3.5 µm; tamaño de columna: 4.6 × 100 mm; eluyente/gradiente: 2% CH_3CN/H_2O/0.5 min, 2–98% CH_3CN/H_2O/17.5 minutos (CH_3CN conteniendo 0.05% TFA y H_2O conteniendo 0.1% TFA); velocidad de flujo: 1 mL/min; temperatura de columna: 50 °C.

Condiciones de HPLC-CAD analítica (Método 10): Waters ACQUITY BEH C18; tamaño de partícula: 1.7 µm; tamaño de poro: 130Å; tamaño de columna: 2.1 × 50 mm; eluyente/gradiente: 5% CH_3CN/H_2O/1.2 min, 5–95% CH_3CN/H_2O/1.8 minutos (CH_3CN conteniendo 0.1% TFA y H_2O conteniendo 0.1% TFA); velocidad de flujo: 1 mL/min; temperatura de columna: 45 °C.

Alternativamente, la mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía instantánea (SiO_2, 0–10% metanol : dicloroetano) para proveer el lote menos puro XL-1-2.

Las especies de la Tabla 18 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **XL-1** (con la excepción de **XL-1-2**):

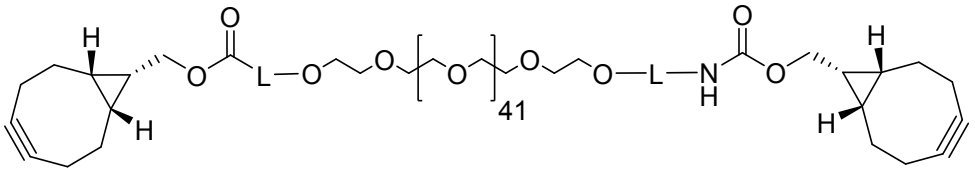
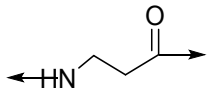
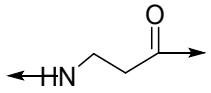
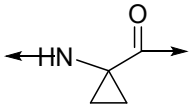
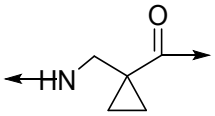
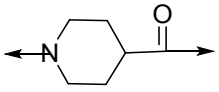
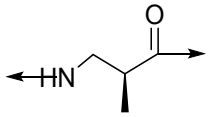
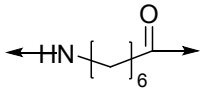


Tabla 18. Ejemplos de Polímeros de Reticulación a base de PEG				
Número	**T**	**Número de grupos terminales de PEG sustituidos**	**HPLC (CAD) Analítica Tiempo de Retención (min)**	**^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4)**

		con grupo funcional		
XL-1-1		2 de 2 100%	11.93 min	δ 4.23 (m, 4H), 4.14 (m, 4H), 3.63 (br s, 175H), 2.54 (m, 4H), 2.22 (m, 12H), 1.60 (m, 4H), 1.37 (m, 2H), 0.94 (m, 4H)
XL-1-2		(1.5-1.8) de 2 75%	NA	δ 4.23 (m, 4H), 4.14 (m, 3.3H), 3.63 (br s, 156H), 2.55 (m, 4H), 2.21 (m, 9.6H), 1.60 (m, 3.6H), 0.94 (m, 3.9H)
XL-2		2 de 2 100%	12.20 min	δ 4.23 (m, 8H), 3.63 (br s, 180H), 2.23 (m, 12H), 1.61 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.39 (m, 2H), 1.15 (m, 4H), 0.95 (m, 4H).
XL-3		2 de 2 100%	12.93 min	δ 4.19 (m, 8H), 3.85-3.43 (m, 192H), 3.36 (br s, 4H), 2.22 (m, 12H), 1.60 (m, 4H), 1.38 (m, 2H), 1.19 (m, 4H), 0.95 (m, 8H).
XL-4		2 de 2 100%	13.25 min	δ 4.22 (m, 8H), 4.02 (m, 4H), 3.84-3.43 (m, 194H), 3.00 (br s, 4H), 2.60 (m, 2H), 2.23 (m, 12H), 1.91 (m, 4H), 1.61 (m, 8H), 1.42 (m, 2H), 0.97 (m, 4H).
XL-9		2 de 2 100%	1.85 minutos (Método 10)	δ 4.29 – 4.19 (m, 4H), 4.14 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 3.87 – 3.41 (m, 179H), 3.28 – 3.18 (m, 3H), 2.78 – 2.62 (m, 2H), 2.37 – 2.06 (m, 12H), 1.72 – 1.51 (m, 4H), 1.47 – 1.31 (m, 2H), 1.21

				– 1.09 (m, 6H), 1.04 – 0.87 (m, 4H).
XL-10		2 de 2 100%	1.96 minutos (Método 10)	δ 4.25 – 4.18 (m, 4H), 4.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 3.85 – 3.40 (m, 178H), 3.09 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.31 – 2.09 (m, 11H), 1.72 – 1.54 (m, 8H), 1.54 – 1.44 (m, 4H), 1.44 – 1.25 (m, 11H), 1.03 – 0.85 (m, 4H).

Intermedios usados en la síntesis de Polímeros de reticulación a base de PEG:

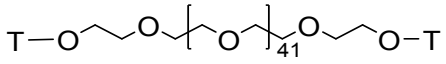
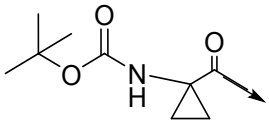
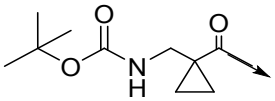
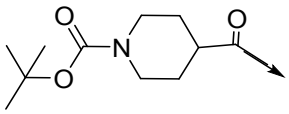
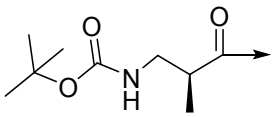
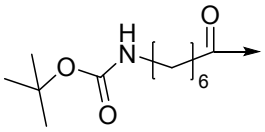
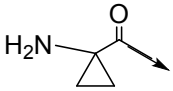
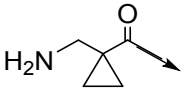
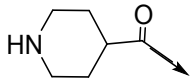
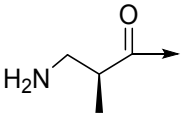
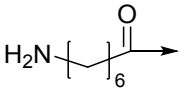
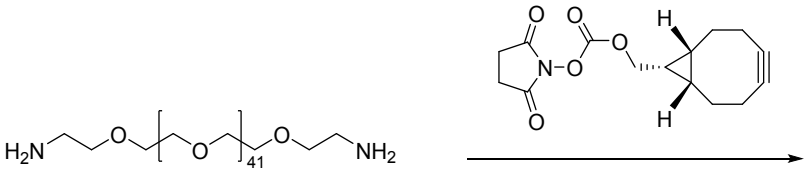


Tabla 19. Ejemplos de Polímeros de Reticulación a base de PEG			
Número	**T**	**Número de grupos finales de PEG sustituidos con grupo funcional**	**^{1}H NMR (400 MHz)**
XL-2a		2 de 2 100%	(cloroformo-d) δ 4.23 (m, 4H), 3.64 (br s, 165H), 1.52 (br m, 4H), 1.45 (br s, 18H), 1.16 (br m, 4H).
XL-3a		2 de 2 100%	(metanol-d4) δ 4.23 (m, 4H), 3.83-3.41 (m, 181H), 1.44 (br s, 18H) 1.17 (m, 4H), 0.94 (m, 4H).
XL-4a		2 de 2 100%	(metanol-d4) δ 4.23 (m, 4H), 3.95 (m, 4H), 3.85-3.41 (m, 180H), 2.92 (br s, 4H), 2.57 (m, 2H), 1.89 (m, 4H), 1.56 (m, 4H), 1.45 (m, 18H).
XL-9a		2 de 2 100%	(metanol-d_4) δ 4.31 – 4.17 (m, 4H), 3.83 – 3.44 (m, 179H), 3.27 – 3.15 (m, 4H), 2.72 – 2.61 (m, 2H), 1.50 – 1.39 (m, 18H), 1.14 (d, J = 7.2 Hz, 6H).

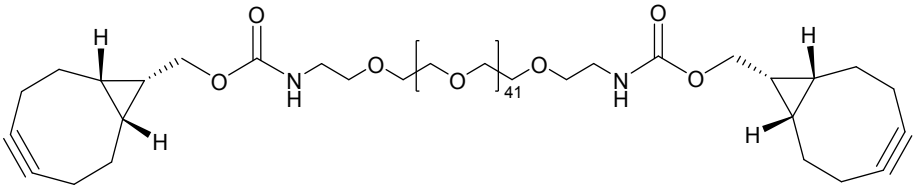
XL-10a		2 de 2 100%	(metanol-d_4) δ 4.27 – 4.15 (m, 4H), 3.83 – 3.44 (m, 180H), 3.04 – 2.99 (m, 4H), 2.34 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 1.68 – 1.57 (m, 4H), 1.55 – 1.40 (m, 22H), 1.39 – 1.27 (m, 9H).
XL-2b	 Sal de Bis-TFA	2 de 2 100%	(cloroformo-d) δ 4.23 (m, 4H), 3.64 (br s, 165H), 1.55 (br m, 4H), 1.19 (br m, 4H).
XL-3b	 Sal de Bis-TFA	2 de 2 100%	(metanol-d4) δ 4.33 (m, 4H), 3.88-3.42 (m, 184H), 2.91 (br m, 4H), 3.22 (br s, 2H), 1.41 (m, 4H), 1.15 (m, 4H),
XL-4b	 Sal de Bis-TFA	2 de 2 100%	(metanol-d4) δ 4.30 (m, 4H), 3.85-3.54 (m, 178H), 3.39 (m, 4H), 3.15, (m, 4H), 2.79 (m, 2H), 2.14 (m, 4H), 1.95 (m, 4H).
XL-9b	 Sal de Bis-TFA	2 de 2 100%	(metanol-d_4) δ 4.56 – 4.43 (m, 2H), 4.32 – 4.20 (m, 2H), 3.92 – 3.41 (m, 180H), 3.25 – 3.12 (m, 4H), 2.99 – 2.84 (m, 2H), 1.28 (d, J = 7.0 Hz, 6H).
XL-10b	 Sal de Bis-TFA	2 de 2 100%	(metanol-d_4) δ 4.25 – 4.19 (m, 4H), 4.10 – 3.41 (m, 180H), 3.04 – 2.90 (m, 4H), 2.44 – 2.30 (m, 4H), 1.77 – 1.55 (m, 8H), 1.54 – 1.33 (m, 8H).

XL-5. PEG(2000)-bis-[3-(((((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metilcarbamoilo]



. 2 HCl

CH_3CN, NEt_3



XL-5

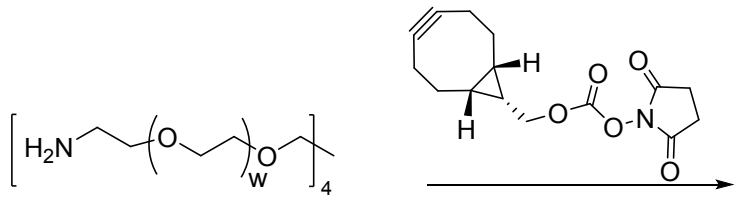
PEG diamina clorhidrato M_n ~ 2 kDa (JenKem Technology, 300 mg, 0.148 mmol) fue disuelto en acetonitrilo (3 mL). Se agregó trietilamina (0.413 mL, 2.96 mmol), seguida por ((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (345 mg, 1.184 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción fue directamente purificada por HPLC de fase inversa preparativa con recolección de fracción activada por ELSD (Método a continuación). Las fracciones conteniendo el producto fueron agrupadas, congeladas y liofilizadas para proveer **XL-5**. Con fines de almacenamiento, **XL-5** se mantuvo como un acetonitrilo, DMSO, o solución de metanol en un congelador. HPLC-CAD Analítica (Método a continuación): tiempo de retención = 11.85 min. ^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4) δ 4.14 (m, 4H), 3.63 (br s, 186H), 3.54 (m, 4H), 2.22 (m, 12H), 1.61 (m, 4H), 1.38 (m, 2H), 0.94 (m, 4H).

Condiciones de HPLC Preparativa: Waters XBridge C18; tamaño de partícula: 5 µm; tamaño de columna: 19 × 250 mm; eluyente/gradiente: 5% CH_3CN/H_2O/0.5 min, 5–95% CH_3CN/H_2O/12.5 min, 95% CH_3CN/H_2O/3 min; velocidad de flujo: 30 mL/min; temperatura de columna: temperatura ambiente.

Condiciones de HPLC-CAD analítica: Waters XBridge BEH300 C18; tamaño de partícula: 3.5 µm; tamaño de columna: 4.6 × 100 mm; eluyente/gradiente: 2% CH_3CN/H_2O/0.5 min, 2-98% CH_3CN/H_2O/17.5 minutos (CH_3CN conteniendo 0.05% TFA

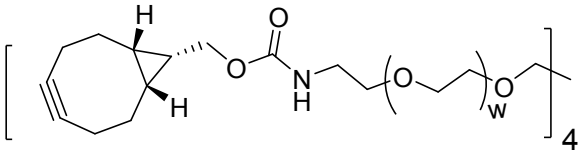
y H_2O conteniendo 0.1% TFA); velocidad de flujo: 1 mL/min; temperatura de columna: 50C.

XL-6. PEG(10000)-tetra-[3-(((((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metilcarbamoilo]



Sal de HCl, w ~ 56,
núcleo de pentaeritritol
JenKem

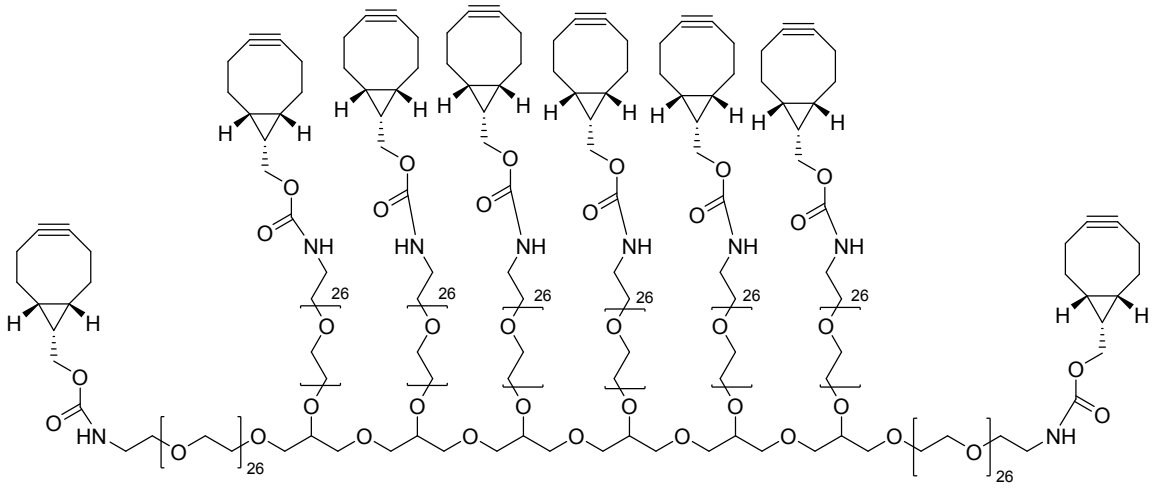
CH_2Cl_2, Et_3N



XL-6

Clorhidrato de amina PEG M_n ~ 10 kDa de 4-brazos (núcleo de pentaeritritol, JenKem Technology, 500 mg, 0.05 mmol) fue disuelto en diclorometano (15 mL). Se agregó trietilamina (0.554 mL, 4.00 mmol), seguida por ((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (175 mg, 0.600 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción fue directamente purificada por diálisis contra metanol utilizando una membrana de diálisis de celulosa regenerada Spectra/Por 6 de MWCO 2 kDa (Spectrum, Inc.). Para análisis y utilización en futuras reacciones, **XL-6** fue aislado por concentración usando un roto evaporador. Con fines de almacenamiento el compuesto fue mantenido como una solución de metanol a temperatura ambiente. ^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4) δ 4.14 (m, 8H), 3.63 (br s, 995H), 2.22 (m, 24H), 1.61 (m, 8H), 1.38 (m, 4H), 0.94 (m, 8H).

XL-8.

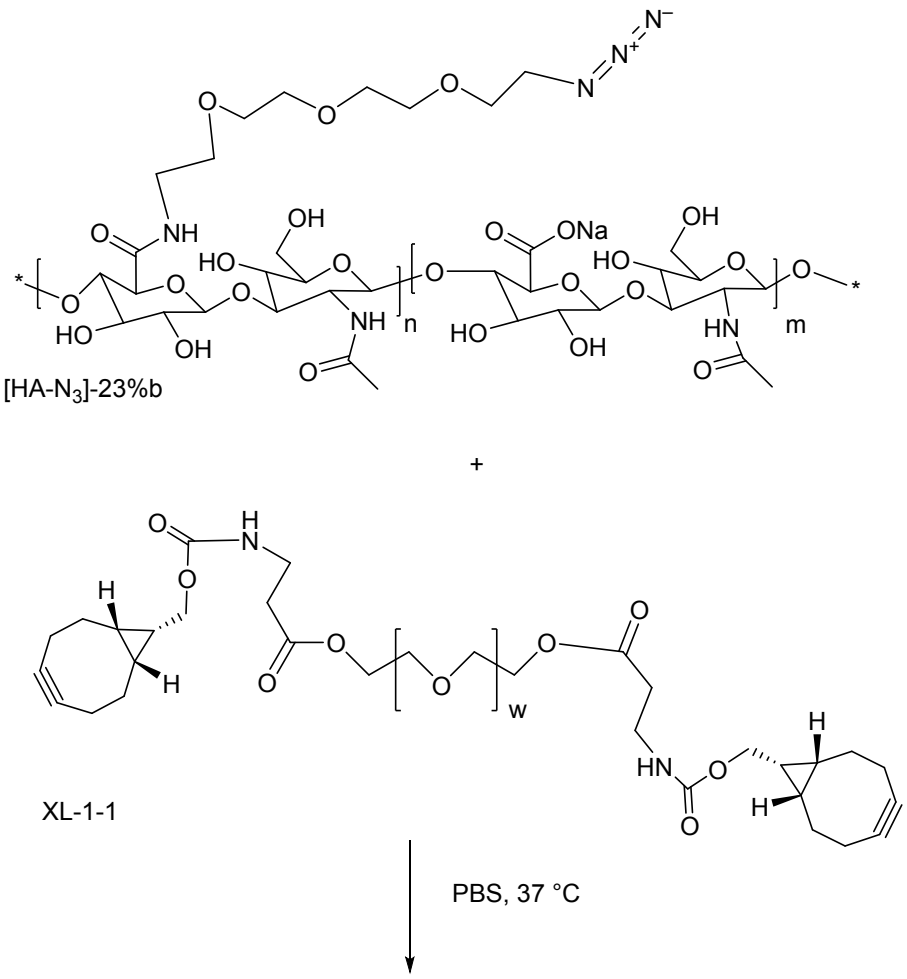


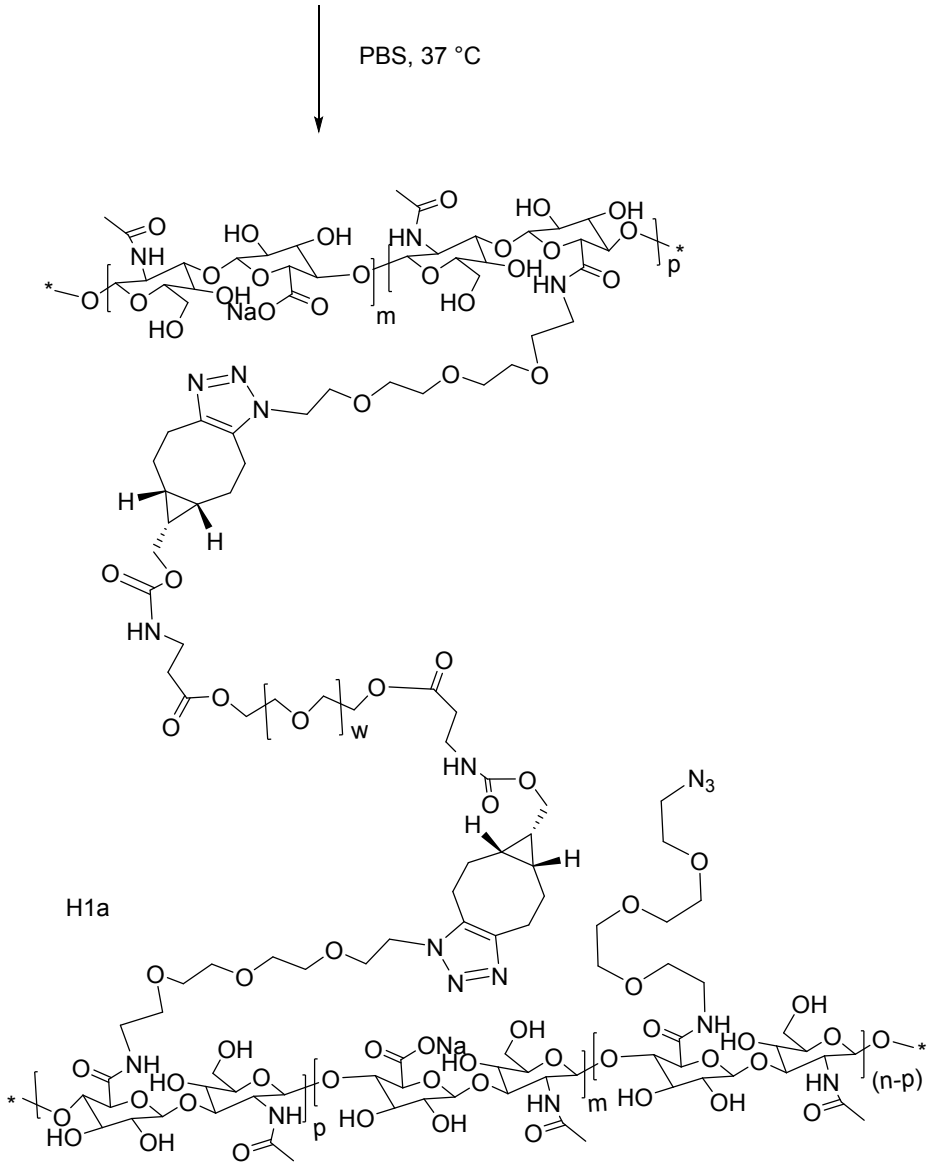
Clorhidrato de amina PEG de 8 brazos M_n ~ 10 kDa (núcleo de hexaglicerol, JenKem Technology, 800 mg, 0.08 mmol) fue disuelto en diclorometano (5 mL). Se agregó trietilamina (0.887 mL, 6.40 mmol), seguida por ((1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-il)metil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (807 mg, 2.56 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción fue concentrada usando un evaporador rotativo, luego disuelta en metanol y purificada por diálisis contra metanol utilizando una membrana de diálisis de celulosa regenerada Spectra/Por 6 de 2 kDa MWCO (Spectrum, Inc.). Para el análisis y utilización en reacciones adicionales, **XL-8** se aisló por concentración usando un roto evaporador, sin embargo con fines de almacenamiento **XL-8** se mantuvo como una solución de metanol a temperatura ambiente. ^{1}H NMR (400 MHz, metanol-d4) δ 4.14 (m, 16H), 3.63 (br s, 935H), 2.23 (m, 48H), 1.61 (m, 16H), 1.38 (m, 8H), 0.95 (m, 16H).

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la síntesis de hidrogeles preparados haciendo reaccionar polímeros funcionalizados adecuadamente con reticuladores.

Síntesis de Hidrogel de Ácido Hialurónico: H1a





[HA-N3]-23% b (60 mg, 136 µmol, grado de sustitución = 23 %) fue disuelto en 3.8 mL tampón estéril 1 × PBS, pH 7.4 a temperatura ambiente durante 30 minutos en un tubo Eppendorf de 5 ml. El peso molecular de la unidad repetitiva de dímero de la sal de carboxilato de sodio no sustituida es de 401.3 Da. El MW de la unidad repetitiva de dímero azidiloada es de 579.6 Da. El MW promedio de una unidad de dímero para la forma sal de sodio de **[HA-N3]-23% b** es 442.3 Da = ((401.3 × 0.77) + (579.6 × 0.23)). Usando el MW promedio de una unidad de dímero de sal de sodio, los moles totales de la unidad repetitiva de dímero son 136 µmol y el número de moles de la unidad repetitiva de dímero azidiloada es 31 µmol.

A esta solución se agregó una solución de 50 mg/mL de **XL-1-1** (0.215 mL, 4.30 µmol de reactivo asumiendo un MW de 2500 Da, 8.60 µmol de funcionalidad del reactivo). Esto dio como resultado una solución de 1.5% p/v con respecto a **[HA-N3]-23% b** y donde 6.3% de las unidades repetitivas **[HA-N3]-22% b** se estimaron reticuladas por **XL-1-1]** ((8.60 µmol [XL-1-1-funcionalidad del reactivo]/136 µmol [unidades HA) × 100 = 6.3 %).

La mezcla se sometió a vórtice brevemente para mezclar, luego se distribuyó en dos jeringas de 3 ml, que se taparon y se mantuvieron a 37°C durante la noche para proporcionar H1a. La inspección visual (prueba de inversión) mostró una gelificación exitosa.

Preparación de partículas de hidrogel a base de ácido hialurónico

H1a, 2 mL, se forzó a través de un disco de malla de acero inoxidable tamaño 100 en una jeringa de 5 ml, obteniéndose partículas de gel gruesas. A esta jeringa se agregó 1 ml de 1 × PBS, seguido de agitación en vórtex para mezclar. La jeringa se mantuvo a temperatura ambiente durante 6 h para permitir la expansión del hidrogel. Esto dio como resultado una mezcla de 1.0% con respecto a **[HA-N3]-23% b**. Las partículas de gel gruesas y expandidas de **H1a** se forzaron 20 veces a través de un disco de malla de acero inoxidable tamaño 200, obteniéndose partículas finas de gel como el producto final.

Los hidrogeles a base de ácido hialurónico (y las partículas de hidrogel correspondientes) enumerados en la Tabla 20 se prepararon de forma análoga a **H1a**. Un hidrogel se define mediante el componente **[HA-N3]** utilizado y su concentración en la reacción de reticulación, así como por el reticulador PEG utilizado y el grado esperado de formación de reticulados con la estructura polimérica (% de entrecruzamiento).

Tabla 20. Ejemplos de Hidrogeles a base de ácido hialurónico

Número	[HA-N_3]-X%	Conc. de [HA-N3] en reacción de hidrogel	XL-m	% de entrecruzamiento en el hidrogel
H1a	[HA-N_3]-23% b	1.5 %	**XL-1-1**	6.3
H1b	[HA-N_3]-23% b	1.0 %	**XL-1-1**	4.5
H1c	[HA-N_3]-37%	1.0 %	**XL-1-1**	5.3

H1e	[HA-N_3]-22%	1.4 %	**XL-1-1**	6.3
H1f	[HA-N_3]-23% b	1.0 %	**XL-1-1**	5.9
H2	[HA-N_3]-23%	1.4 %	**XL-2**	6.4
H5	[HA-N_3]-26%	1.4 %	**XL-5**	6.3
H6	[HA-N_3]-37%	1.8 %	**XL-6**	5.6
H7	[HA-N_3]-23% c	1.5 %	**XL-9**	6.1
H8	[HA-N_3]-23% c	1.5 %	**XL-10**	6.2

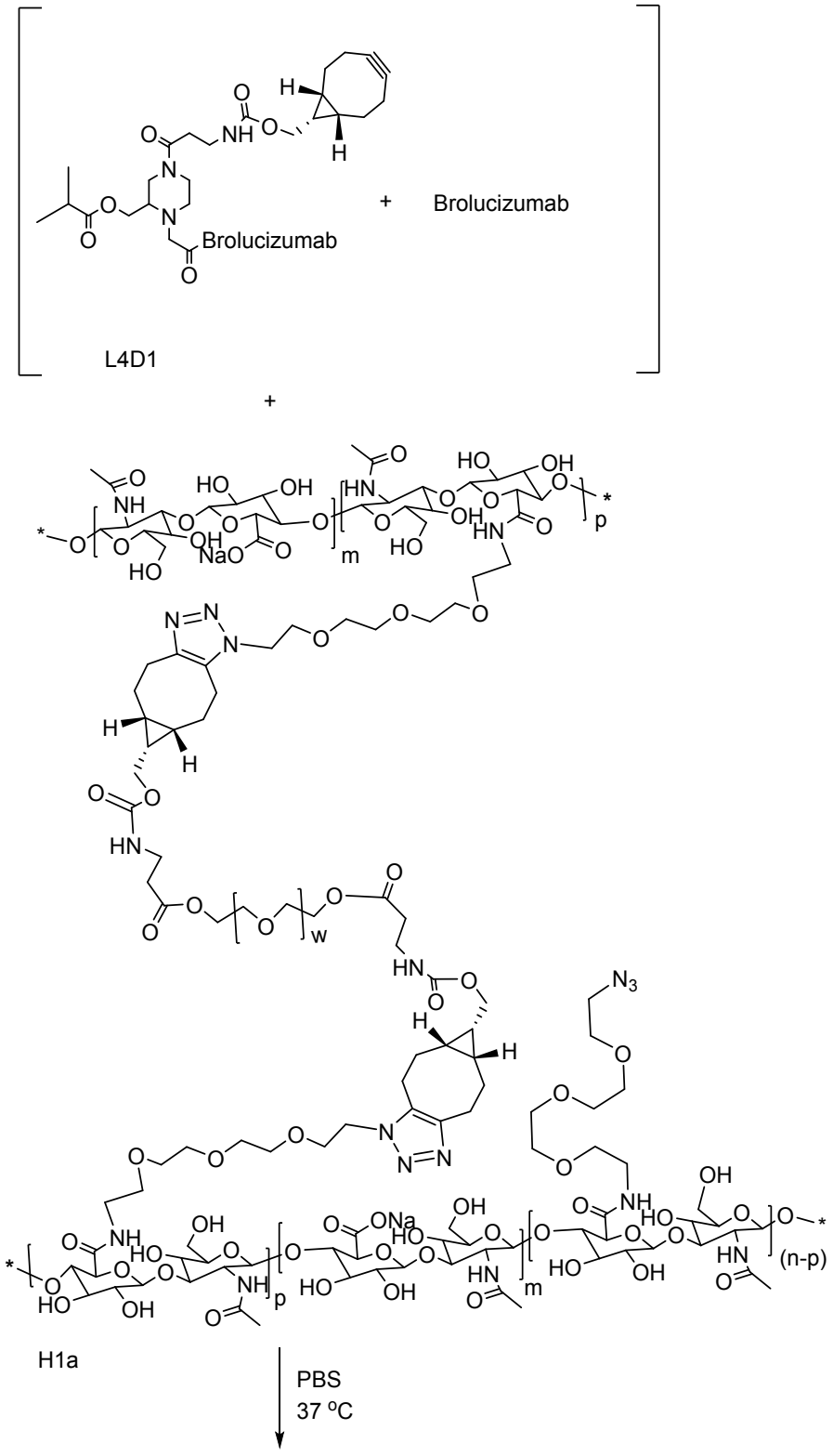
Ejemplo 6

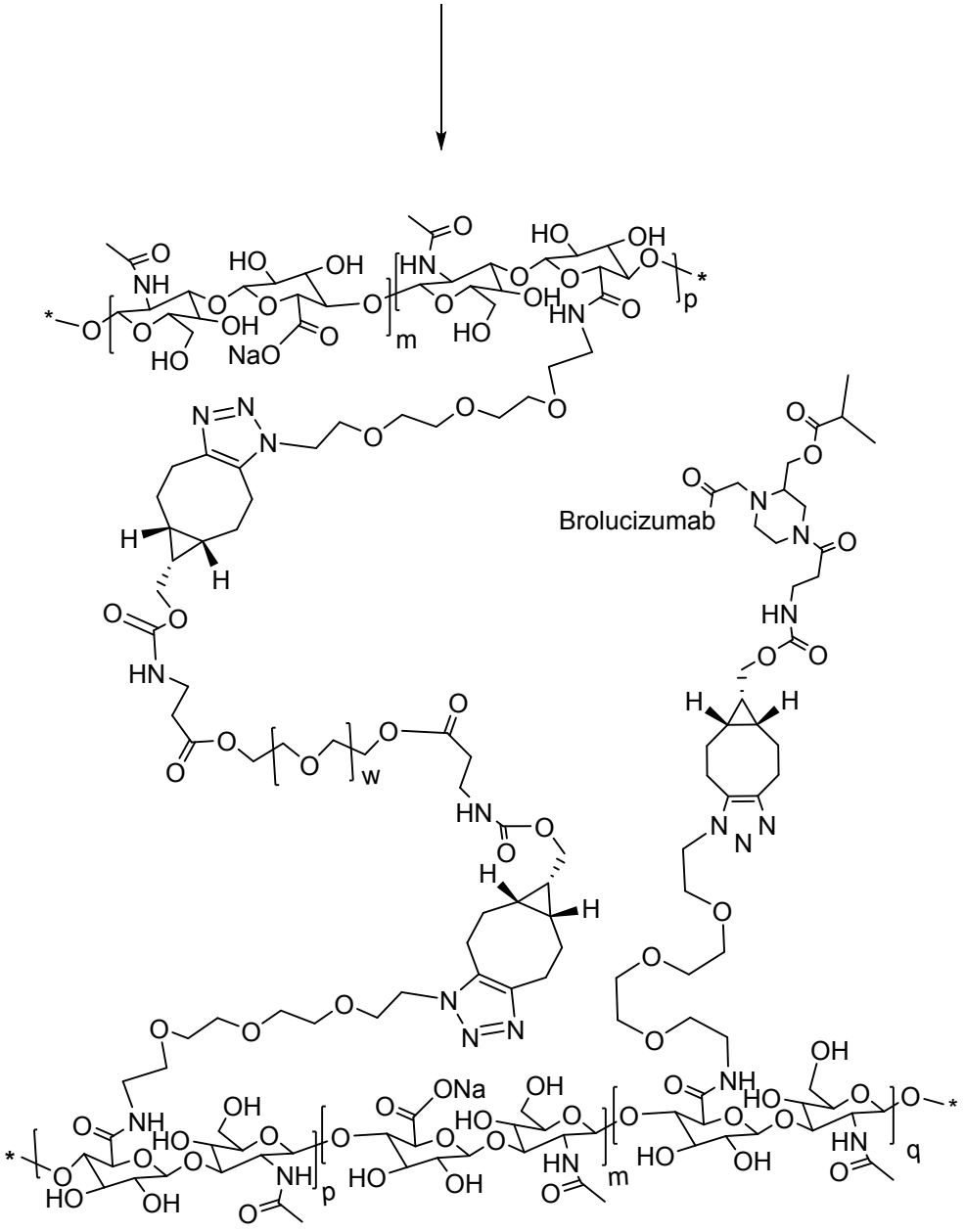
Síntesis de conjugados de hidrogel-fármaco

El presente ejemplo describe la síntesis de conjugados de hidrogel-fármaco, donde el fármaco se conjuga al portador mediante un ligante que no deja huellas.

Al preparar las muestras para la dosificación in vivo, todas las manipulaciones de materiales o soluciones sin tapar tuvieron lugar en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas. Todos los insumos utilizados estaban previamente sin abrir e identificados como "estériles".

C4b (H1a-L4D1)


Brolucizumab
+
Brolucizumab
L4D1
+
H1a
PBS
37 °C



C4b

Una suspensión de partículas de hidrogel de **H1a** (2.5 mL, 10mg/mL, 23 mM total unidad repetitiva de dímero) fue tratada con una solución de **L4D1b** (14.5 mL de 42 mg/mL solución en 1× PBS), sometida a vórtice y mantenida a 37 °C durante la noche. El tubo de reacción fue centrifugado (1000 rcf, 5 min) y el sobrenadante se retiró del tubo usando una aguja y una jeringa. Se agregó 1× PBS (10–15 mL) nuevo al tubo, que se

agitó para resuspender el gel. Se repitió la centrifugación, la eliminación del sobrenadante y la dilución con tampón nuevo. El lavado continuó hasta que no se detectó brolucizumab en el sobrenadante (se usó un espectrofotómetro Nanodrop para la detección de absorbancia a 280 nm, ~ 65 ml de lavado PBS en total). El sedimento de hidrogel restante, [C4b], se transfirió a una jeringa para su almacenamiento y distribución.

Un descriptor clave de los conjugados de hidrogel-fármaco es la cantidad de fármaco cargado por volumen de hidrogel (= carga de fármaco). Cuando el fármaco es una proteína, existen varios métodos para determinar la carga.

La carga proteica del hidrogel se determinó por liberación forzada de la proteína conjugada a partir de un volumen conocido de hidrogel, luego por cuantificación de la proteína liberada. En este ejemplo, se pesaron 37,3 µg de [C4b] en un tubo de reacción (esto corresponde a 37,3 µL de muestra, bajo el supuesto de que la densidad de este hidrogel es ~ 1g/ml). La muestra fue tratada con tampón Tris · HCl 1 M, pH 9,5 (1 ml), se agitó en vórtex y se agitó a 37°C durante 48 h (o hasta que la concentración medida alcanzó un estado estable). La concentración del fármaco liberado (brolucizumab) se midió (espectrofotómetro Nanodrop) en 0,48 mg/ml en esta muestra, lo que corresponde a 13,35 mg de brolucizumab/ml de hidrogel en [C4b] ((0,048 mg/ml/0,0373 ml) × (1,0373 ml de volumen total) = 13,35 mg/ml). Este análisis se realizó por triplicado. La carga de proteína determinada promedio para [C4b] antes de la dilución fue de 13,9 mg de brolucizumab/ml de hidrogel.

Un método alternativo para determinar la carga de proteína se basa en cálculos de diferencia. En este método, el brolucizumab medido (espectrofotómetro de Nanodrop) recuperado en los lavados de hidrogel se resta de la proteína agregada total conocida (por ejemplo: brolucizumab + L4D1). La diferencia da la carga de brolucizumab en función del volumen de hidrogel total.

Los hidrogeles en la Tabla 21 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **C4b**.

Tabla 21. Ejemplos de Conjugados de Hidrogel-Fármaco

Número	Estudio	Aducto de ligante-	Hidrogel usado	Carga de fármaco (mg/mL)	Método analítico

		fármaco usado			
C1a	Liberación in vitro Ejemplo 8.1	**L1D1**	**H1c**	12.0	Diferencia
C2a	Liberación in vitro Ejemplo 8.1	**L2D1a**	**H1c**	14.1	Diferencia
C2b	Estudio in vivo Ejemplo 9.1	**L2D1b**	**H1b**	10.2	Diferencia
C3a	Liberación in vitro Ejemplo 8.1	**L3D1a**	**H1c**	15.0	Diferencia
C3b		**L3D1b**	**H1a**	11.4	Liberación Forzada
C6		**L3D1c**	**H2**	21.7	Liberación Forzada
C4a	Liberación in vitro Ejemplo 8.1	**L4D1a**	**H1c**	18.5	Diferencia
C4b		**L4D1b**	**H1a**	13.9	Liberación Forzada
C7		**L4D1c**	**H2**	17.0	Liberación Forzada
C5		**L5D1**	**H1e**	11.1	Liberación Forzada
C8		**L1D2a**	**H6**	17.2	Liberación Forzada
C10	Liberación in vitro Ejemplo 8.2	**L1D2b**	**H5**	13.2	Diferencia
C11	Liberación in vitro Ejemplo 8.2	**L2D2**	**H5**	12.5	Diferencia
C12	Liberación in vitro Ejemplo 8.2	**L5D2**	**H5**	10.6	Diferencia
C9		**L1D3**	**H6**	3.2	Liberación Forzada
C14		**L4D1d**	**H7**	14.7	Liberación Forzada
C15		**L4D1d**	**H8**	15.6	Liberación Forzada

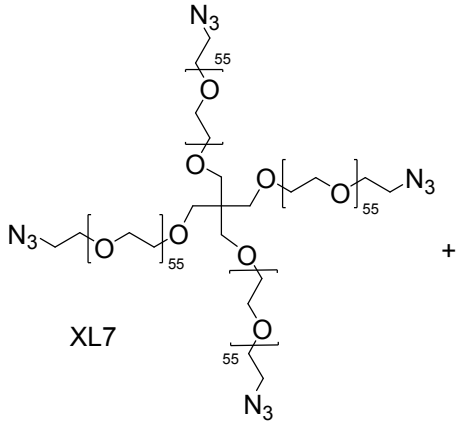
El conjugado de hidrogel-fármaco se puede diluir con 1 × PBS para alcanzar la concentración final de fármaco deseada para la dosificación. La cantidad de 1 × PBS que se agregará puede calcularse mediante la siguiente ecuación: (diluyente de PBS (ml)) = [(fármaco total (mg)/carga de fármaco deseada (mg/ml)] - (volumen inicial de conjugado (ml)).

Se diluyó el conjugado **C4b** (2 mL conjugado de hidrogel, 13.9 mg/mL brolucizumab, total brolucizumab = 27.8 mg) preparado según lo descripto mediante la adición de 1× PBS (0.8 mL). La jeringa se tapó y se agitó vigorosamente para homogeneizar. Esto dio como resultado un volumen de muestra total de 2.8 ml con carga de proteína = 27.8 mg de brolucizumab/2.8 ml = 9.93 mg/ml de brolucizumab.

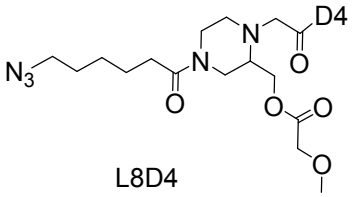
El conjugado **C4b** fue expendido para la dosificación en jeringas de insulina de 0,5 ml con agujas 30G, retirando el émbolo y rellenando con el volumen deseado de **C4b**.

Los conjugados de hidrogel-fármaco se almacenaron a 4 °C.

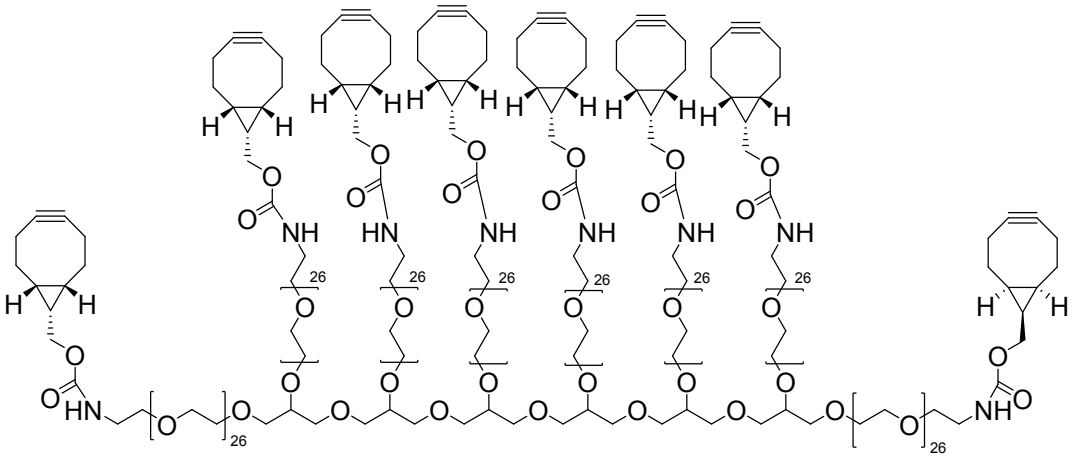
Síntesis de conjugado de hidrogel fármaco: C13



XL7



L8D4



XL8

C13

El aducto de ligante-fármaco **L8D4** (sal de tris trifluoroacetato, 19.9 mg, 8.86 µmol) fue tratado con una solución de **XL-8** (0.157 mL de a 200 mg/mL solución en DMSO), agitado y retenido durante 80 min, momento en el cual el análisis por HPLC mostró la conjugación completa de **L8D4** a **XL-8**. A esta solución se agregó una solución de **XL-7** (0.154 mL de a 200 mg/mL solución en DMSO). La reacción fue agitada y mantenida a temperatura ambiente durante 4 h.

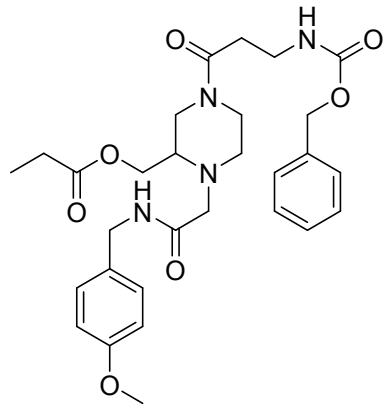
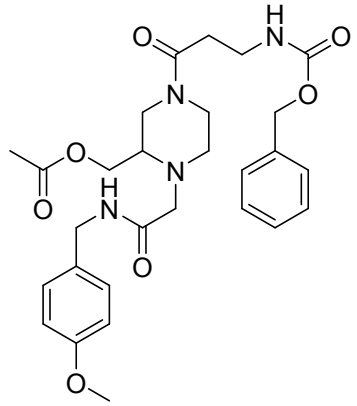
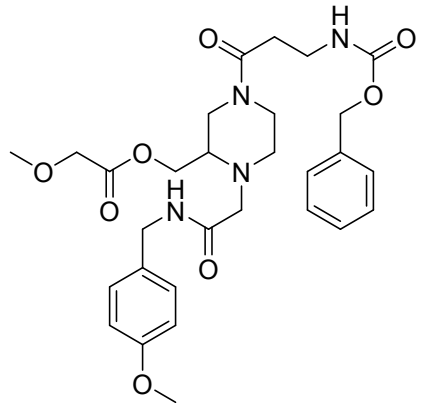
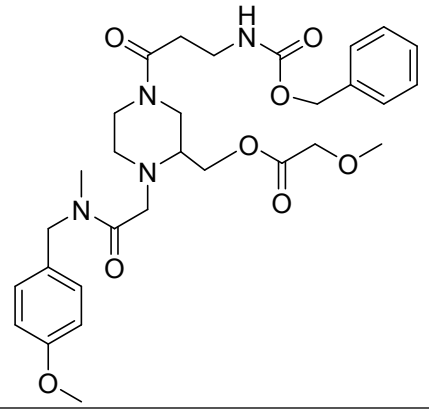
El gel a granel se forzó a través de un disco de malla de acero inoxidable tamaño 100 en una jeringa de 3 ml, produciendo partículas de gel gruesas. A esta jeringa se añadieron 2 ml de DMSO, seguido de agitación en vórtex para mezclar. La jeringa se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h para permitir la expansión del gel. Las partículas de gel gruesas y expandidas se forzaron 20 veces a través de un disco de malla de acero inoxidable tamaño 200, produciendo partículas de gel finas.

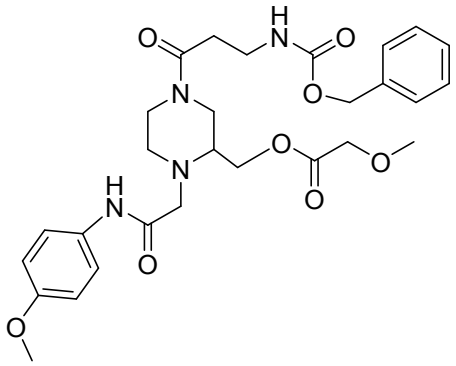
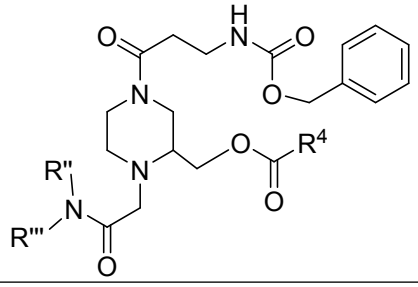
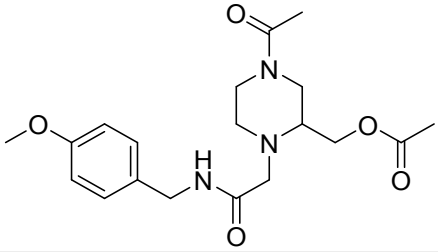
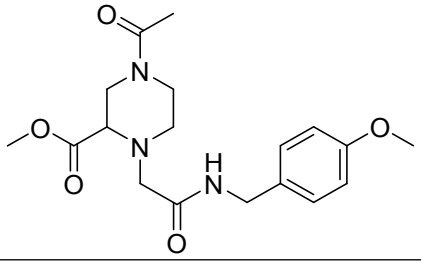
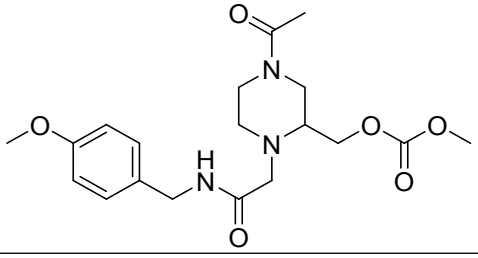
La suspensión de partículas de gel finas (en una jeringa tapada) se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rcf para sedimentar el gel. El sobrenadante se eliminó usando una aguja y una jeringa, y el sedimento se lavó con 1 × PBS frío, pH 6,5, de la siguiente manera para eliminar las especies no conjugadas del gel. La suspensión se centrifugó a 2000 rcf durante 5 minutos para sedimentar el gel. El sobrenadante se retiró de la jeringa usando una aguja y una jeringa, se agregó 1 × PBS nuevo, pH 6,5, para llenar la jeringa, y la jeringa tapada se agitó para resuspender el gel. La centrifugación, la eliminación del sobrenadante y la dilución con tampón nuevo se repitieron cuatro veces más. Luego de la centrifugación final y la eliminación del tampón, se hizo una prueba de endotoxina al sobrenadante y el sedimento de gel lavado se diluyó con 1 × PBS, pH 6,5, hasta un volumen total final de 1,4 ml. La suspensión de partículas diluidas se agitó en vórtex para mezclar y el producto, **C13**, se almacenó a 4ºC.

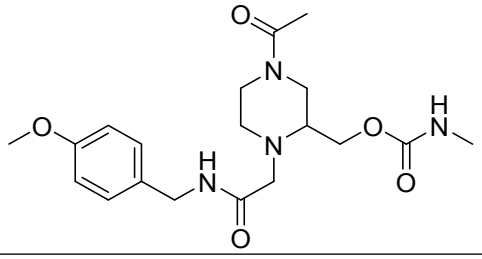
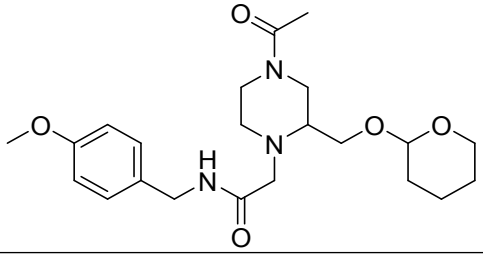
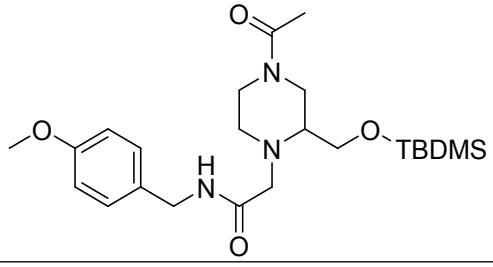
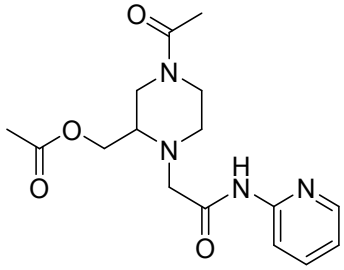
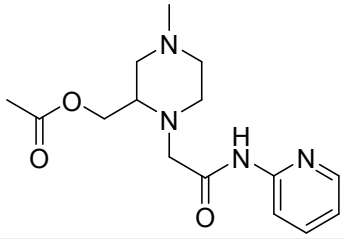
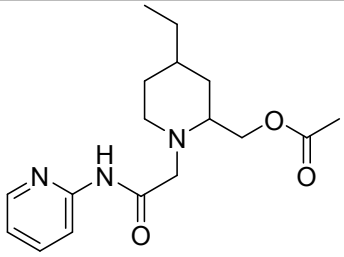
La concentración de D4 en **C13** (suponiendo un 100% de conjugación) fue de 10.3 mg/mL.

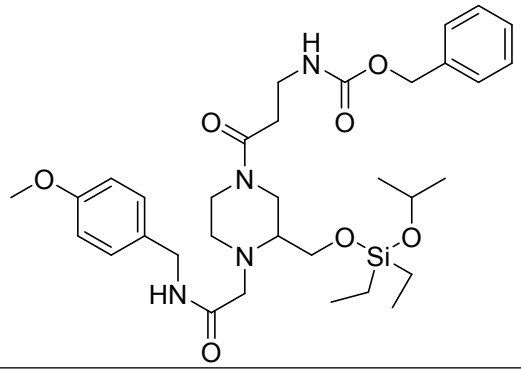
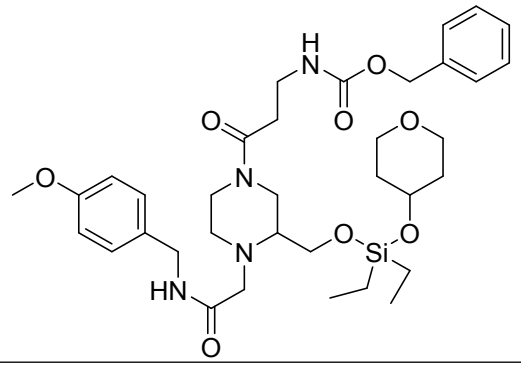
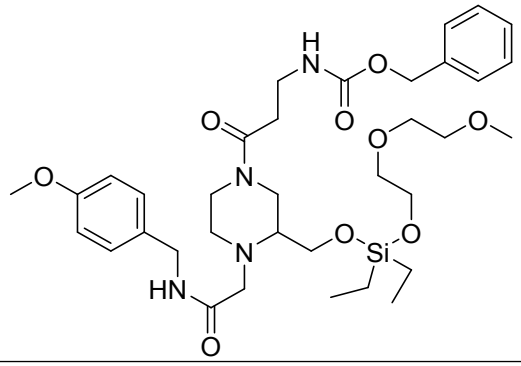
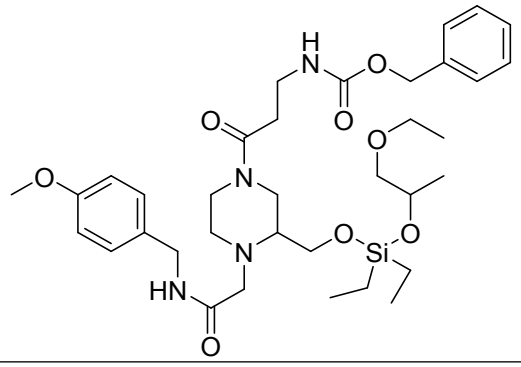
Ejemplo 7

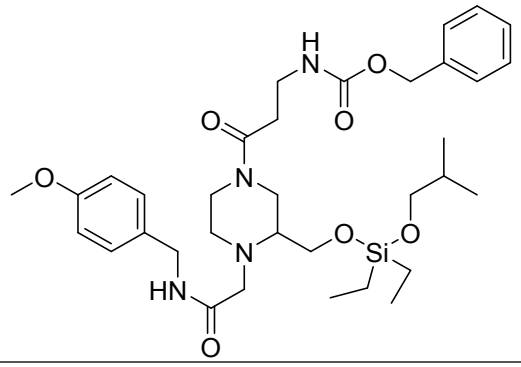
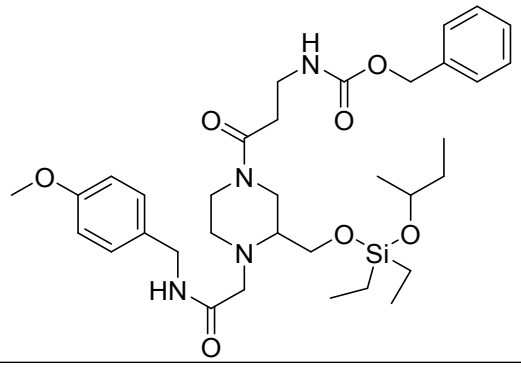
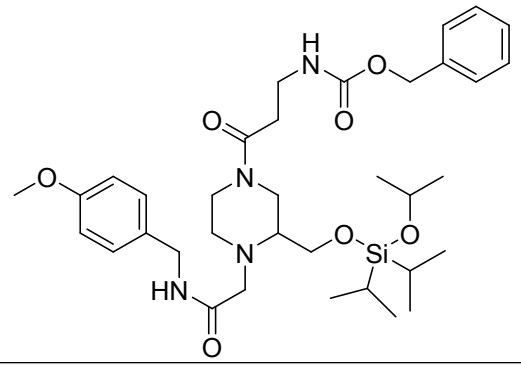
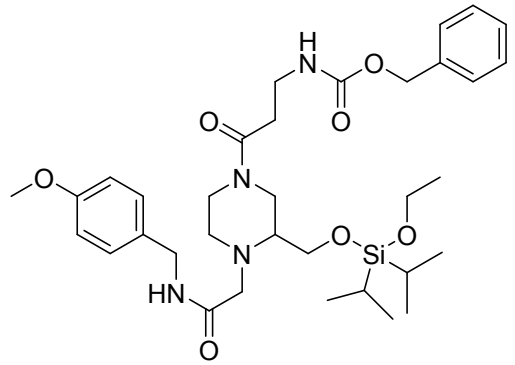
Este ejemplo describe la preparación de una serie de conjugados de fármaco ligante que no deja huellas modelo, en los que el "fármaco" modelo es un compuesto que contiene amina de bajo peso molecular, en la mayoría de los casos, p-metoxibencilamina. Los compuestos M1 – M27 no se conjugaron a un polímero, hidrogel u otro portador. Los estudios de liberación in vitro del compuesto conteniendo amina de bajo peso molecular de los compuestos M1 – M27 permitieron evaluar varios desencadenantes de versiones diferentes.

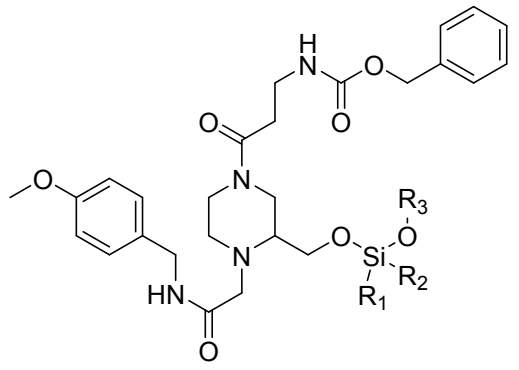
Tabla 22. Compuestos Modelo	
Estructura	**Número**
	**M1**
	**M2**
	**M3**
	**M4**

	**M5**
Estructura general para M1–M5 	**M1–M5**
	**M6**
	**M7**
	**M8**

	**M9**
	**M10**
	**M11**
	**M17**
	**M18**
	**M19**

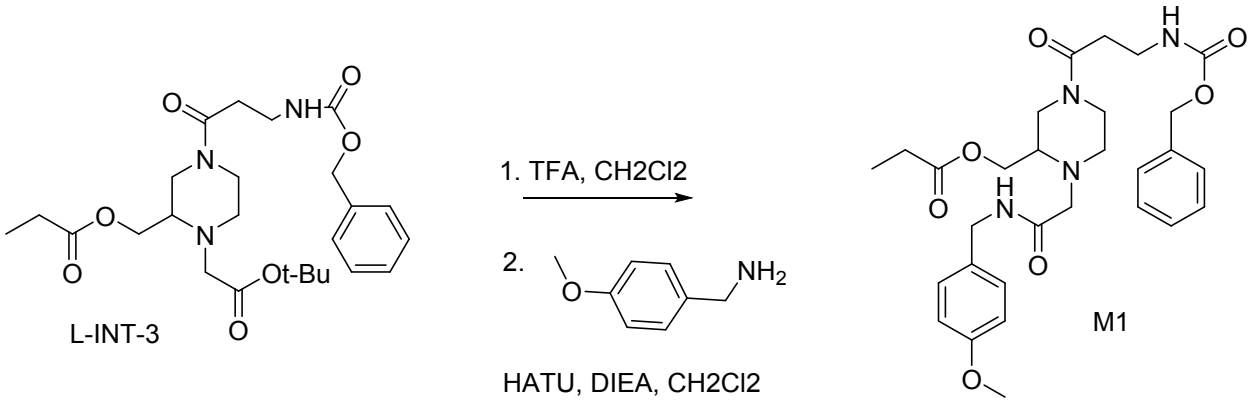
	**M20**
	**M21**
	**M22**
	**M23**

	**M24**
	**M25**
	**M26**
	**M27**
Estructura general para M20–M27:	**M20–M27**

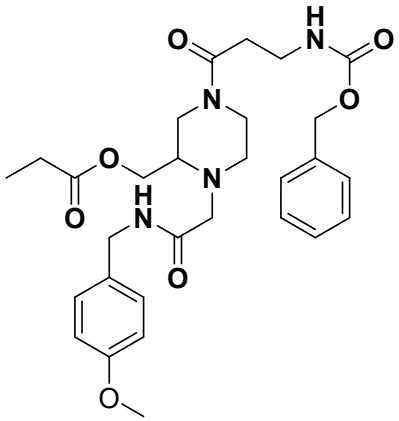
	

Síntesis de los compuestos modelo:

M1. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2-il)metil propionato

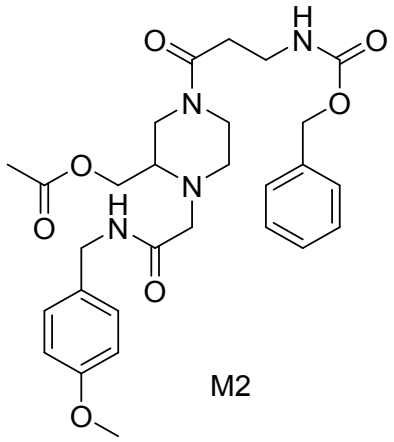


M1. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2-il)metil propionato



Una solución de **L-INT-3** (61.7 mg, 0.13 mmol) en diclorometano (3 mL) fue tratada con ácido trifluoroacético (1 mL) y agitada durante la noche a temperatura ambiente, luego evaporada. El intermedio crudo fue disuelto en diclorometano (3 mL) y tratado con diisopropiletilamina (0.066 mL, 0.38 mmol), HATU (57.3 mg, 0.15 mmol) y p-metoxibencilamina (0.017 mL, 0.13 mmol), agitado durante 1 h, luego evaporado. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 0–15% metanol : diclorometano) dio como resultado **M1**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.16 min; MS (ESI+) *m/z* 555.2 (M+H). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.25 (m, 5H), 7.12 (m, 2H), 6.80 (m, 2H), 5.43 (m, 1H), 5.01 (m, 2H), 4.33 (d, 2H), 4.02 (tdt, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.55-3.2 (m, 7H), 3.09 (m, 1H), 2.72 (m, 2H), 2.41 (dq, 3H), 2.18 (m, 2H), 1.04 (dt, 3H).

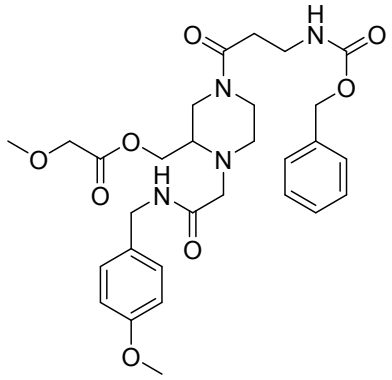
M2. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2-il)metil acetato



M2

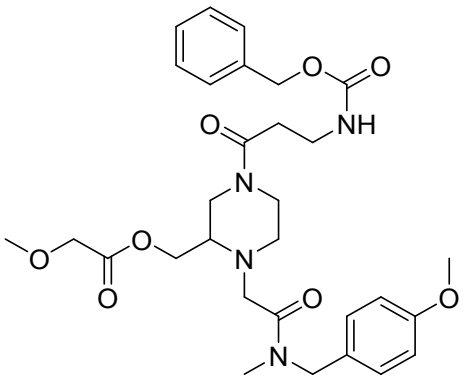
M2 se preparó a partir del intermedio (**L-INT-2**) usando métodos análogos a aquellos empleados para sintetizar **M1**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.10 min: MS (ESI+) *m/z* 541.1 (M+H). NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.35 (m, 5H), 7.20 (m, 2H), 6.88 (m, 2H), 5.53 (m, 1H), 5.09 (m, 2H), 4.41 (d, 2H), 4.10 (tdt, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.55-3.2 (m, 7H), 3.17 (dd, 1H), 2.79 (m, 2H), 2.49 (dq, 3H), 2.0 (m, 3H).

M3. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2-il)metil metoxiacetato



M3 se preparó a partir del intermedio (**L-INT-1**) usando métodos análogos a aquellos empleados para sintetizar **M1**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.11 minutos MS (ESI+) *m/z* 571.2 (M+H). NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.37 (m, 5H), 7.21 (m, 2H), 6.90 (m, 2H), 5.49 (m, 1H), 5.10 (m, 2H), 4.42 (d, 2H), 4.23 (tdd, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.55-3.2 (m, 9H), 3.20 (dd, 1H), 2.83 (d, 2H), 2.52 (m, 3H).

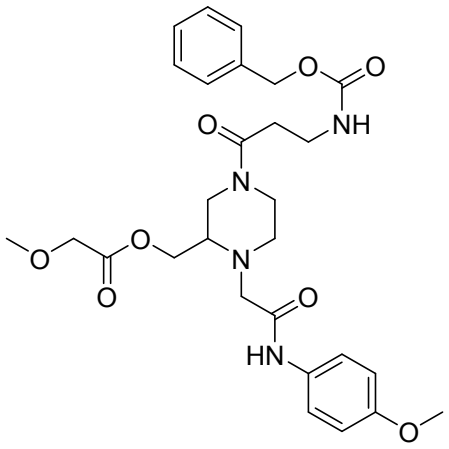
M4. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxibencil)(metil) amino)-2''-oxoetil) piperazin-2-il)metil 2-metoxiacetato



M4 se preparó a partir del intermedio (**L-INT-1**) usando métodos análogos a aquellos empleados para sintetizar **M1**, con la excepción que se sustituye N-metil-p-metoxibencilamina por p-metoxibencilamina. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.04 minutos MS (ESI+) *m/z* 585.2 (M+H). NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 7.35 (m, 5H), 7.20 (m,

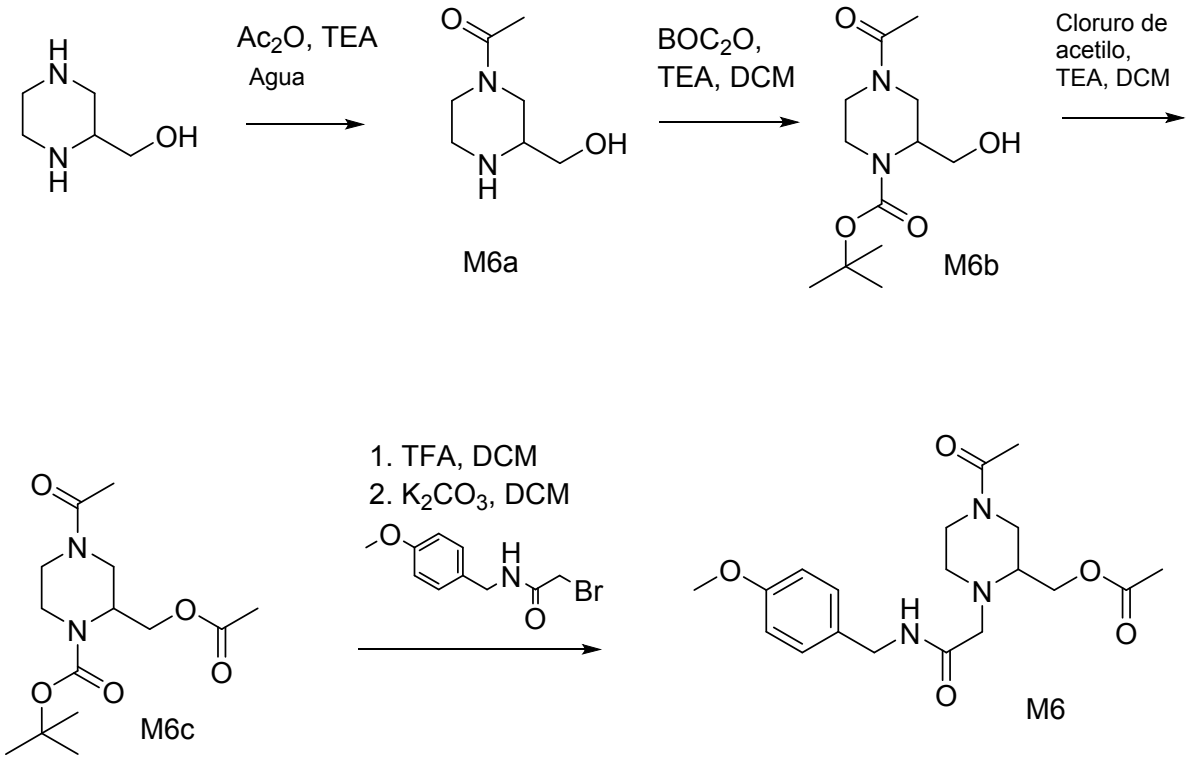
2H), 6.80 (m, 2H), 5.43 (m, 1H), 5.13 (m, 2H), 4.7-3.9 (m, 7H), 3.82 (m, 3H), 3.8-3.2 (m, 10H), 2.8 (m, 3H), 2.7 (m, 3H), 2.6 (m, 2H).

M5. (4-(3'-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoil)-1-(2''-((4'''-metoxifenil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2-il)metil 2''''-metoxiacetato

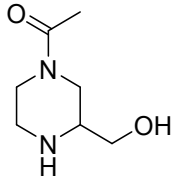


M5 se preparó a partir del intermedio (**L-INT-1**) usando métodos análogos a aquellos empleados para sintetizar **M1**, con la excepción que se sustituye 4-metoxianilina por p-metoxibencilamina. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 1.14 minutos MS (ESI+) *m/z* 557.1 (M+H). NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 8.7 (br s, 1H), 7.4 (d, 2H), 7.37 (m, 5H), 6.8 (m, 2H), 5.5 (m, 1H), 5.1 (m, 2H), 4.3 (m, 2H), 4.0 (m, 2H), 3.8 (s, 4H), 3.7-3.2 (m, 11H), 3.2 (m, 1H), 2.8 (m, 2H), 2.5 (m, 2H), 2.18 (m, 3H).

M6. (4-acetil-1-(2-((4-metoxibencil)amino)-2-oxoetil)piperazin-2-il)metil acetato

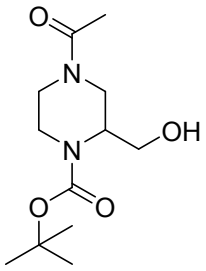


M6a. 1-N-acetil-3-hidroximetil piperazina



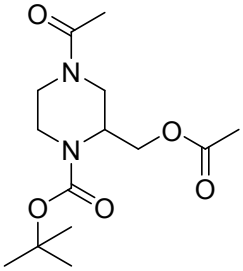
Una solución de 2-(hidroximetil) piperazina (2 g, 17.2 mmol) en agua (25 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con trietilamina (3.5 mL, 25 mmol), agitada durante 10 min, luego se trató por goteo con una solución de anhídrido acético (1.64 mL, 17.3 mmol) en agua (15 mL). La reacción fue agitada 2 h a temperatura ambiente, luego tratada con 2 M carbonato de sodio (10 mL) y cloruro de sodio saturado (20 mL). La fase acuosa fue evaporada y el residuo purificado por cromatografía instantánea (alúmina básica, 3% metanol : diclorometano) para proveer **M6a**. MS (ESI+) *m/z* 159.0 (M+H).

M6b. terc-butil 4-acetil-2-(hidroximetil) piperazina-1-carboxilato



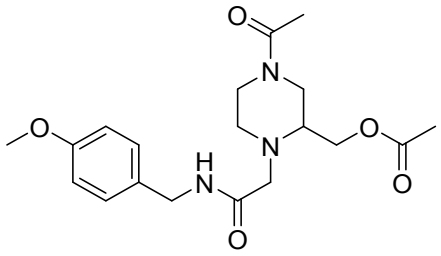
Una solución de **M6a** (1.4 g, 8.84 mmol) en diclorometano (20 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con trietilamina (1.78 g, 17.6 mmol), agitada durante 10 min, luego se trató por goteo con di-terc-butil dicarbonato (2.12 g, 9.73 mmol). La reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente, luego diluida con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 3% metanol : diclorometano) dio como resultado **M6b**. MS (ESI+) *m/z* 259.0 (M+H).

M6c. terc-butil 2-(acetoximetil)-4-acetil piperazina-1-carboxilato



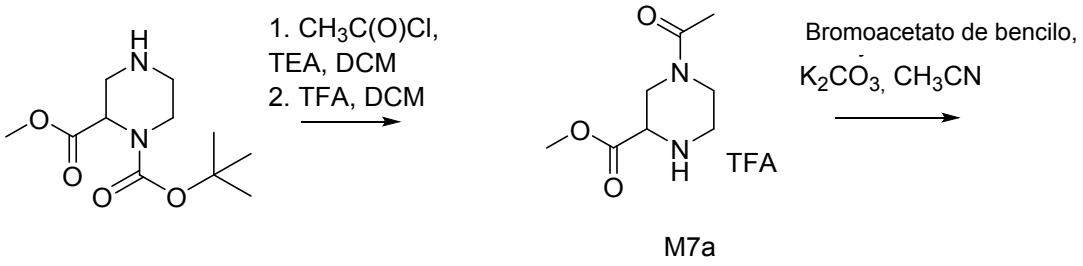
Una solución de **M6b** (0.20 g, 0.77 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con trietilamina (0.20 g, 1.94 mmol), agitada durante 10 min, luego se trató por goteo con cloruro de acetilo (0.072 g, 0.93 mmol). La reacción fue agitada 4 h a temperatura ambiente, luego diluida con DCM, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 3% metanol : diclorometano) dio como resultado **M6c**. MS (ESI+) *m/z* 301.1 (M+H).

M6. (4-acetil-1-(2'-((4''-metoxibencil)amino)-2'-oxoetil)piperazin-2-il)metil acetato

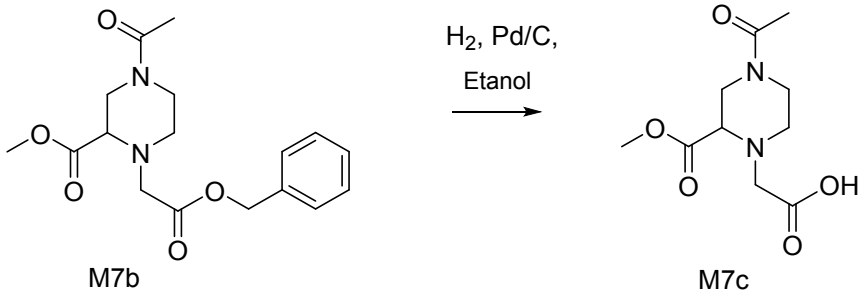


Una solución de **M6c** (0.15 g, 0.49 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con ácido trifluoroacético (2.0 mL), y se agitó 4 h a temperatura ambiente, luego fue evaporada. Este material fue disuelto en acetonitrilo (10 mL) y mantenido a 0 °C bajo argón, luego tratado con carbonato de potasio (0.414 g, 2.99 mmol) y 2-bromo-N-(4-metoxibencil) acetamida (0.232 g, 0.89 mmol). La reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente, luego evaporada. La mezcla cruda fue extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 5% metanol : diclorometano), seguida por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5 mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–8 min: 20% B; 8 min–fin: 40% B;) dio como resultado **M6**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 2.67 min; MS (ESI+) *m/z* 378.2 (M+H).

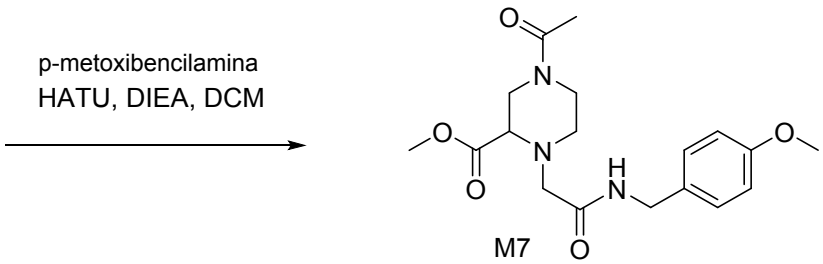
M7. metil 4-acetil-1-(2'-((4''-metoxibencil)amino)-2'-oxoetil) piperazina-2-carboxilato



M7a

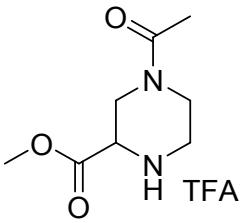


M7b M7c



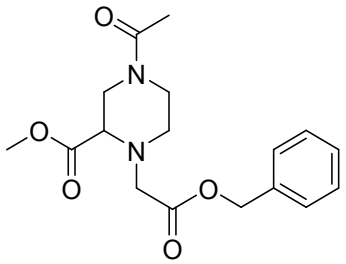
M7

M7a. metil 4-acetil piperazina-2-carboxilato, sal de ácido trifluoroacético



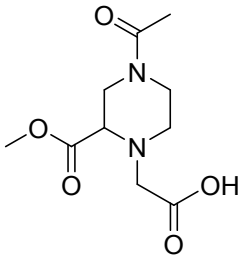
Una solución de 1-(terc-butil) 2-metil piperazina-1,2-dicarboxilato (0.20 g, 0.82 mmol) y trietilamina (0.33 g, 3.27 mmol) en diclorometano (4 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con cloruro de acetilo (0.125 mg, 25 mmol), luego fue agitada 2 h a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con agua, fue extraída con diclorometano, y la fase orgánica secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 2% metanol : etil acetato) dio como resultado el producto intermedio: MS (ESI+) *m/z* 287 (M+H). Este material fue disuelto en diclorometano (5 mL) a 0 °C y fue tratado por goteo con ácido trifluoroacético, luego fue agitado 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue evaporada, lavada con pentano y secada, para proveer **M7a**, como la sal de ácido trifluoroacético que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 187 (M+H).

M7b. metil 4-acetil-1-(2'-(benciloxi)-2'-oxoetil) piperazina-2-carboxilato



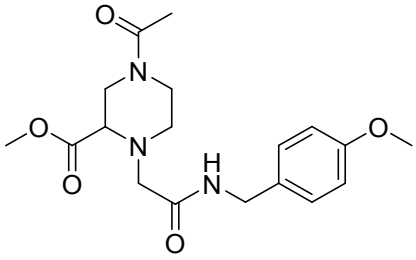
Una mezcla de **M7a** (0.16 g, 0.86 mmol) y carbonato de potasio (0.30 mg, 2.15 mmol) en acetonitrilo (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con bencil bromoacetato (0.234 mg, 1.03 mmol), se dejó que alcanzara lentamente la temperatura ambiente, y luego fue agitada 12 h a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con agua, fue extraída con etilacetato, y la fase orgánica secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina neutra, 1% metanol : etilacetato) dio como resultado **M7b**. MS (ESI+) *m/z* 335 (M+H).

M7c. Ácido 2-(4'-acetil-2'-(metoxicarbonil)piperazin-1'-il) acético



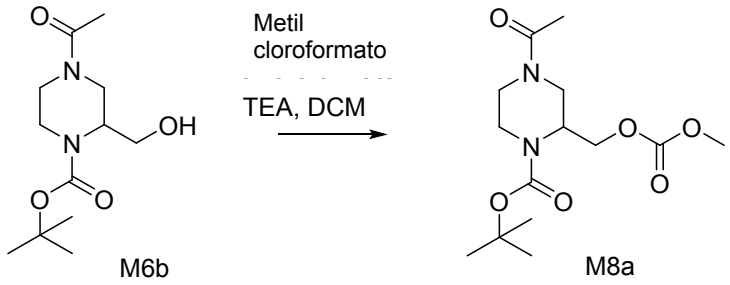
A una solución de **M7b** (0.285 g, 0.85 mmol) se agregó 10% paladio sobre carbono (0.02 g), luego fue agitada bajo presión de un globo de hidrógeno durante 12 h a temperatura ambiente. La reacción fue filtrada por Celite, lavada con metanol, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. **M7c** se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 245 (M+H).

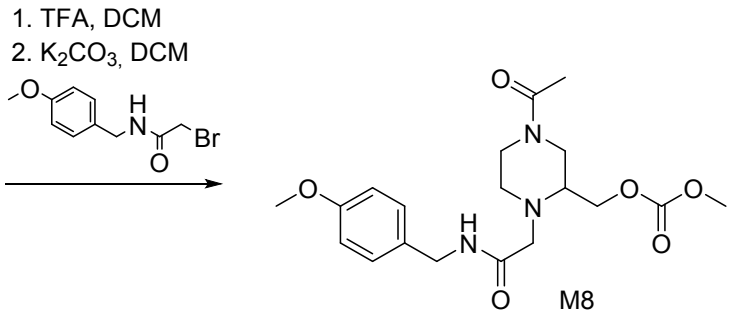
M7. Metil 4-acetil-1-(2'-((4''-metoxibencil)amino)-2'-oxoetil) piperazina-2-carboxilato



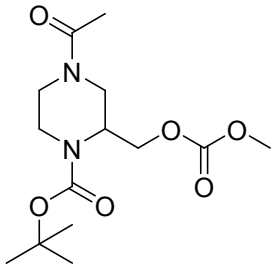
Una solución de **M7c** (0.21 g, 0.86 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada con diisopropiletilamina (0.275 g, 2.14 mmol) y HATU (0.39 g, 1.03 mmol), transcurridos 15 minutos con 4-metoxibencilamina (0.117 g, 0.86 mmol). La reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente, luego tratada con agua y extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por HPLC preparativa (Columna: XBridge (150 × 19 mm); fase móvil: A=(0.01% TFA en agua), B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 20% B; 2–8 min: 20% B; 8 min–fin: 80% B) dio como resultado **M7**. LCMS (Método 3): tiempo de retención = 2.85 min; MS (ESI+) *m/z* 364 (M+H).

M8. (4-acetil-1-(2'-((4''-metoxibencil)amino)-2'-oxoetil)piperazin-2-il)metil metil carbonato



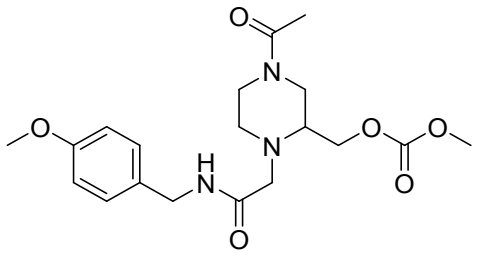


M8a (4-acetil -1-(terc-butoxicarboxil)piperazin-2-il)metil metilcarbonato



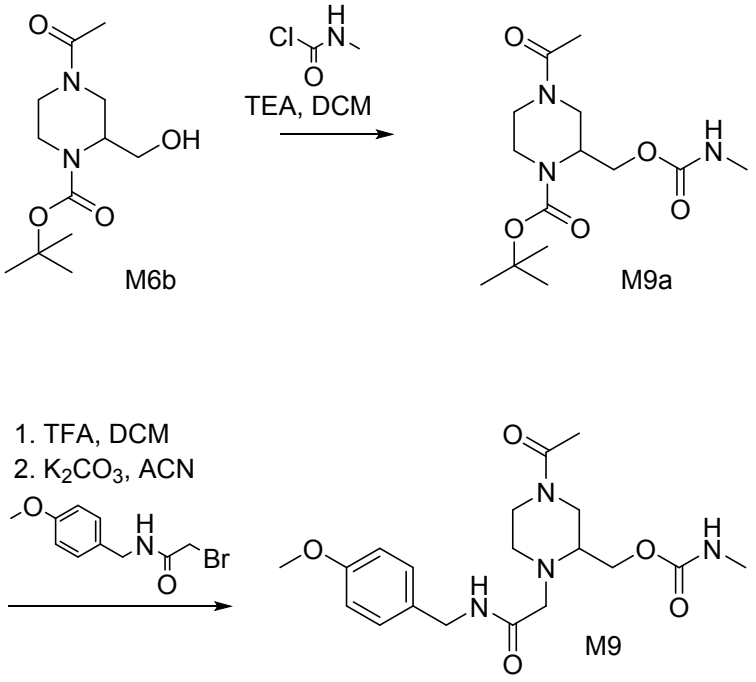
Una solución de **M6b** (0.30 g, 1.16 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con trietilamina (0.20 g, 1.94 mmol), agitada durante 10 min, luego se trató por goteo con metil cloroformato (0.54 g, 5.8 mmol). La reacción fue agitada 72 h a temperatura ambiente, luego diluida con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 3% metanol: diclorometano) dio como resultado **M8a**. MS (ESI+) *m/z* 317.1 (M+H).

M8. (4-acetil-1-(2'-((4''-metoxibencil)amino)-2'-oxoetil)piperazin-2-il)metil metil carbonato

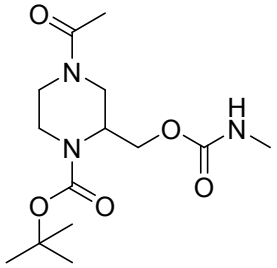


Una solución de **M8a** (0.09 g, 0.28 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con ácido trifluoroacético (2.0 mL), y se agitó 4 h a temperatura ambiente, luego fue evaporada. Este material fue disuelto en acetonitrilo (10 mL) y mantenido a 0 °C bajo argón, luego tratado con carbonato de potasio (0.23 g, 1.66 mmol) y 2-bromo-N-(4-metoxibencil) acetamida (0.128 g, 0.49 mmol). La reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente, luego evaporada. La mezcla cruda fue extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 5% metanol : diclorometano), seguida por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–10 min: 20% B; 10 min-fin: 50% B;) dio como resultado **M8**. LCMS (Método 7): tiempo de retención = 0.24 min; MS (ESI+) *m/z* 394.2 (M+H).

M9. 1-(4'-acetil-1'-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2'-il)metil N-metilcarbamato

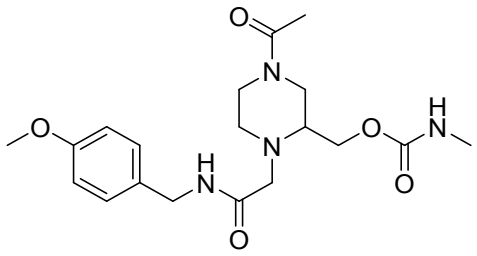


M9a. 1-(4'-acetil-1'-(terc-butoxicarbonil)piperazin-2'-il)metil N-metilcarbamato



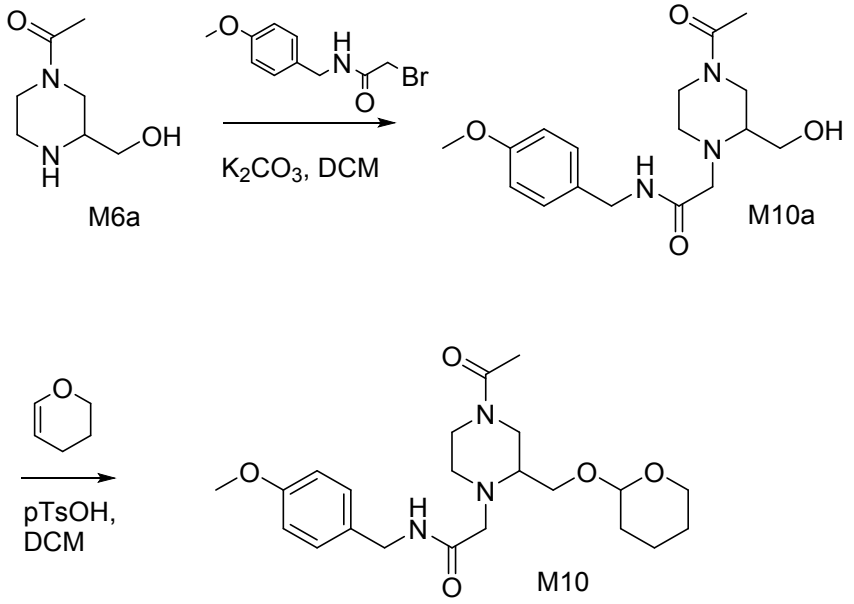
Una solución de **M6b** (0.30 g, 1.16 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con trietilamina (0.30 mg, 2.90 mmol) y agitada durante 10 min. Se agregó cloruro metilcarbámico (0.11 g, 1.27 mmol) y la reacción fue agitada 72 h a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano, fue lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 3% metanol : etil acetato) dio como resultado **M9a**. MS (ESI+) *m/z* 316.1 (M+H).

M9. 1-(4'-acetil-1'-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-2'-il)metil N-metilcarbamato

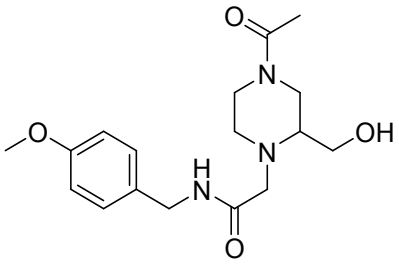


Una solución de **M9a** (0.12 g, 0.38 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con ácido trifluoroacético (2.0 mL), y se agitó 4 h a temperatura ambiente, luego fue evaporada y usada sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 216.1 (M+H). Este material fue disuelto en acetonitrilo (10 mL) y mantenido a 0 °C bajo argón, luego tratado con carbonato de potasio (0.385 g, 2.78 mmol) y 2-bromo-N-(4-metoxibencil) acetamida (0.215 g, 0.83 mmol). La reacción fue agitada 12 h a temperatura ambiente, luego evaporada. La mezcla cruda fue extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 5% metanol : diclorometano), seguida por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5 mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–8 min: 20% B; 8 min–fin: 50% B) dio como resultado **M9**. LCMS (Método 3): tiempo de retención = 2.61 min; MS (ESI+) *m/z* 393.2 (M+H).

M10. 2-(4'-acetil-2'-(((tetrahidro-2''H-piran-2''-il)oxi)metil)piperazin-1'-il)-N-(4'''-metoxibencil) acetamida

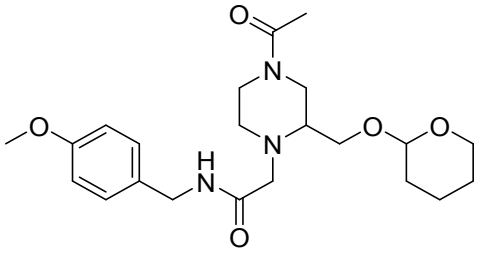


M10a. 2-(4'-acetil-2'-(hidroximetil)piperazin-1'-il)-N-(4''-metoxibencil) acetamida



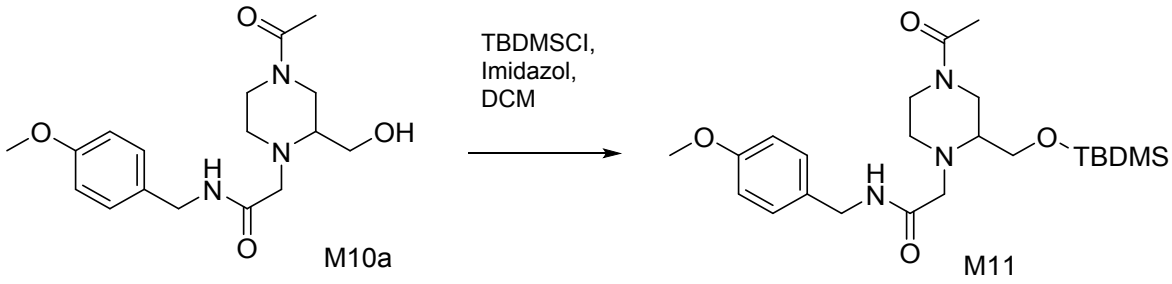
Una solución de **M6a** (1.0 g, 6.32 mmol) en acetonitrilo (20 mL) se mantuvo a 0 °C bajo argón, luego fue tratada con carbonato de potasio (2.62 g, 19.0 mmol) y 2-bromo-N-(4'-metoxibencil) acetamida (1.4 g, 5.68 mmol). La reacción fue agitada 16 h a temperatura ambiente, luego tratada con agua, extraída con etil acetato, y la capa orgánica combinada fue secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 1–2 % metanol : diclorometano) dio como resultado **M10a**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 2.61 min; MS (ESI+) *m/z* 336.3 (M+H).

M10. 2-(4'-acetil-2'-(((tetrahidro-2''H-piran-2''-il)oxi)metil)piperazin-1'-il)-N-(4'''-metoxibencil) acetamida

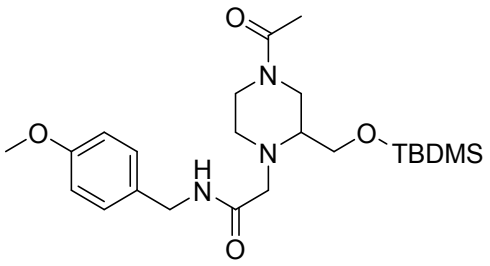


Una solución de **M10a** (0.10 g, 0.30 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada con 3,4-dihidro-2H-piran (0.05 g, 0.60 mmol), luego se agregó ácido p-toluenesulfónico (0.030 g, 0.89 mmol) en porciones y la reacción fue agitada 4 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con bicarbonato de sodio acuoso saturado y extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 1–2 % metanol : diclorometano) dio como resultado **M10**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 2.78 min; MS (ESI+) *m/z* 420.3 (M+H).

M11. 2-(4'-acetil-2'-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)piperazin-1'-il)-N-(4'''-metoxibencil) acetamida

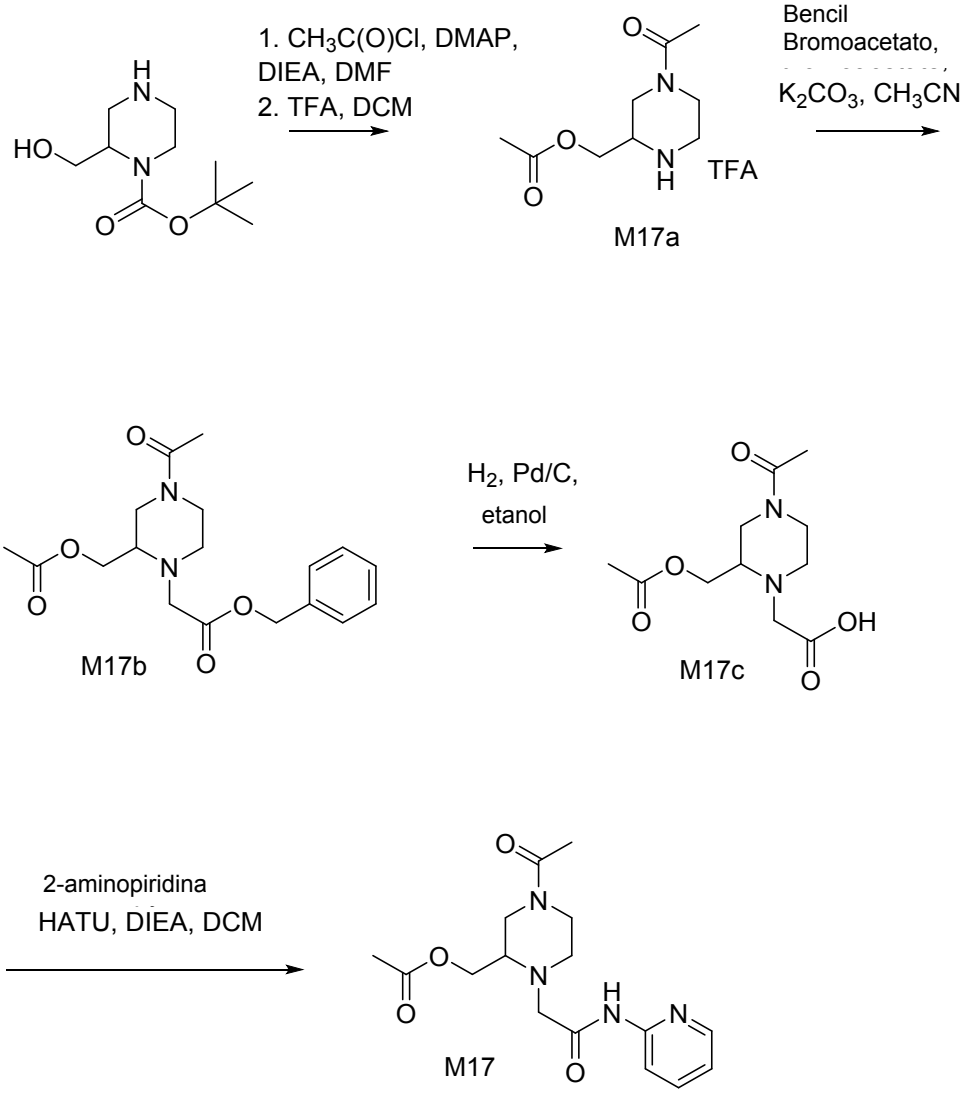


M11. 2-(4'-acetil-2'-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)piperazin-1'-il)-N-(4'''-metoxibencil) acetamida

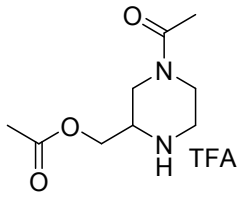


Una solución de **M10a** (0.10 g, 0.30 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada con imidazol (0.061 g, 0.89 mmol), luego se agregó gota a gota terc-butildimetilclorosilano (0.054 g, 0.36 mmol) y la reacción fue agitada 2 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con cloruro de amonio acuoso saturado y extraída con diclorometano, lavada con solución salina, secada sobre sulfato de sodio y evaporada. La purificación por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5 mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 30% B; 2–8 min: 40% B; 8 min–fin: 90% B;) dio como resultado **M11**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 3.48 min; MS (ESI+) *m/z* 450.3 (M+H).

M17. 1-(4'-acetil-1'-(2''-oxo-2''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperazin-2'-il)metil acetato



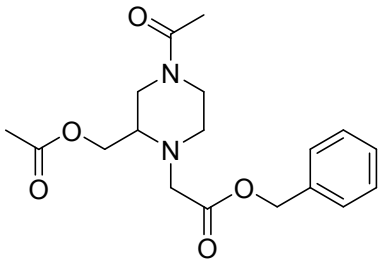
M17a 1-(4'-acetilpiperazin-2'-il)metil acetato, sal de ácido trifluoroacético



A una solución de terc-butil 2-(hidroximetil) piperazina-1-carboxilato (0.70 g, 3.23 mmol) en DMF (7 mL) a 0 °C bajo argón se agregó diisopropiletilamina (1.65 mL, 2.76 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0.007 g) y cloruro de acetilo (0.57 mL, 8.09 mmol), y se

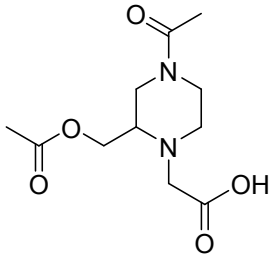
agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con agua y extraída con etil acetato. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua y solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y evaporadas. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 50% etil acetato : hexano) dio como resultado el compuesto intermedio que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 323 (M+Na). Este material fue disuelto en diclorometano (2 mL) a 0 °C y tratado con ácido trifluoroacético (1 mL), y se agitó 16 h a temperatura ambiente, luego fue evaporado. El residuo fue lavado con pentano y secado bajo alto vacío para proveer **M17a**, como la sal de ácido trifluoroacético que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 201 (M+H).

M17b. bencil 2-(2'-(acetoximetil)-4'-acetilpiperazin-1'-il)acetato



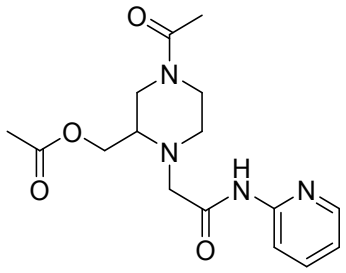
Una solución de **M17a** (0.75 g, 3.73 mmol) en acetonitrilo (8 mL) bajo argón fue tratada con carbonato de potasio (1.54 g, 11.9 mmol) y bencil 2-bromoacetato (0.59 mL, 3.73 mmol) y agitada durante 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue concentrada y purificada por cromatografía instantánea (alúmina básica, 1% metanol : diclorometano) para proveer **M17b**. MS (ESI+) *m/z* 349 (M+H).

M17c. Ácido 2-(2'-(acetoximetil)-4'-acetilpiperazin-1'-il) acético



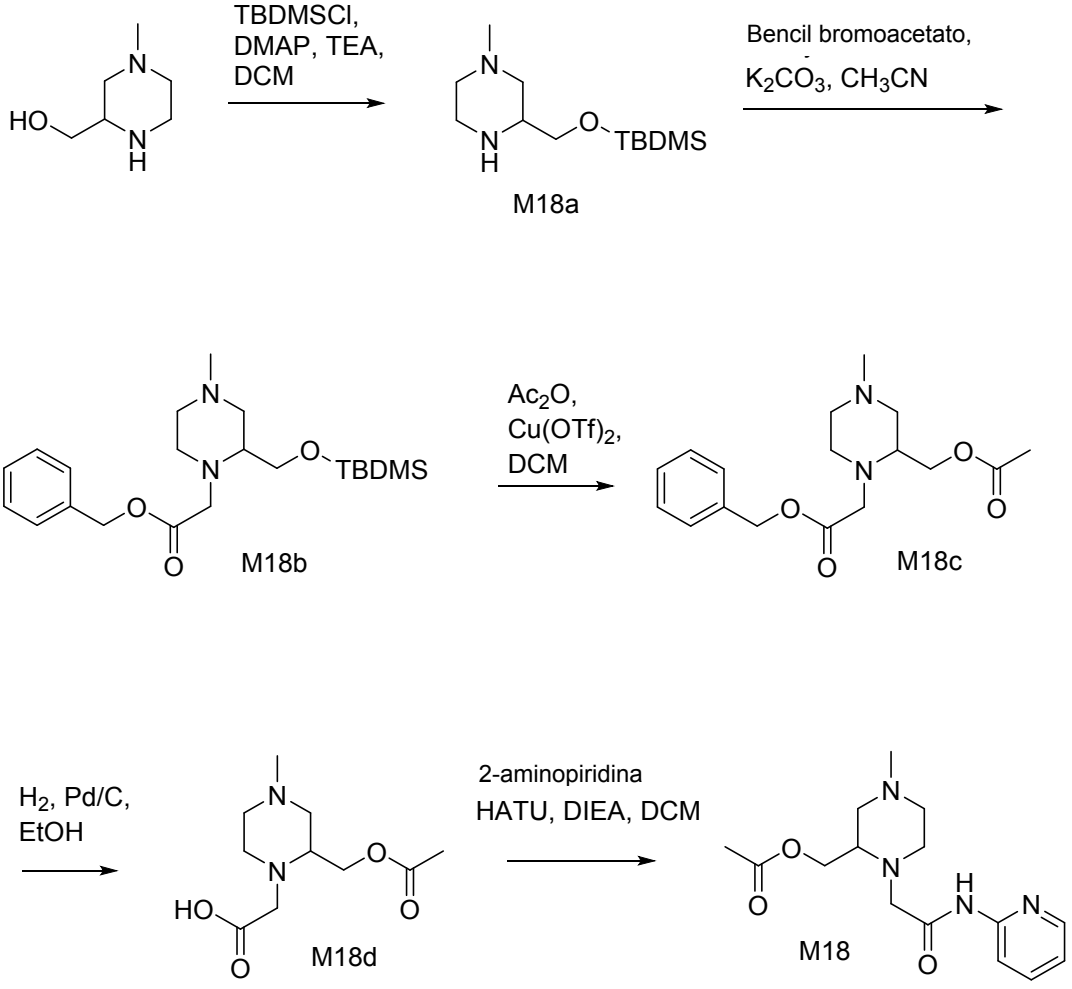
A una solución de **M17b** (0.30 g, 0.86 mmol) en etanol (6 mL) se agregó 5% paladio sobre carbono (0.060 g) y la reacción fue agitada bajo presión de un globo de hidrógeno durante 16 h. La reacción fue concentrada y purificada por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5 mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–10 min: 20% B; 10 min–fin: 40% B) para proveer **M17c**. MS (ESI+) *m/z* 259 (M+H).

M17. 1-(4'-acetil-1'-(2''-oxo-2'''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperazin-2'-il)metil acetato

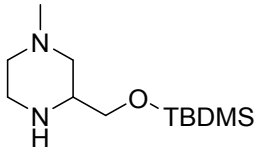


A una solución de **M17c** (0.070 g, 0.27 mmol) en diclorometano (1 mL) bajo argón se agregó diisopropiletilamina (0.039 mL, 0.81 mmol), HATU (0.35 g, 0.90 mmol) y 2-aminopiridina (0.028 g, 0.29 mmol) y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con agua y extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina y evaporadas. La purificación por HPLC preparativa (Columna: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21.5 mm *5 mm); fase móvil: A=agua, B=acetonitrilo; gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–6 min: 20% B; 6 min–fin: 70% B) dio como resultado **M17**. LCMS (Método 3): tiempo de retención = 2.35 min; MS (ESI+) *m/z* 335.2 (M+H).

M18. 1-(4'-metil-1'-(2''-oxo-2''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperazin-2'-il) metil acetato



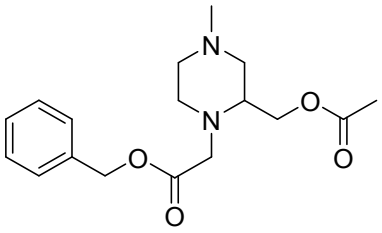
M18a. 3-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-metil piperazina



A una solución de (4-metilpiperazin-2-il)metanol (0.60 g, 4.6 mmol) en diclorometano (7 mL) bajo argón se agregó trietilamina (1.08 mL, 7.82 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0.01 g), luego gota a gota, una solución de terc-butildimetilchorosilano (1 g, 6.91 mmol) en diclorometano (20 mL), y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se agregó más trietilamina (0.6 eq) y terc-

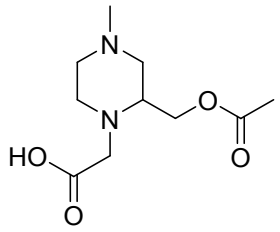
butildimetilchorosilano (0.6 eq) a la solución, que se agitó 2 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con agua y extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron secadas sobre sulfato de sodio y evaporadas. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 1% metanol: diclorometano) dio como resultado **M18a**. MS (ESI+) *m/z* 245 (M+H).

M18c. bencil 2-(2'-(acetoximetil)-4'-metilpiperazin-1'-il)acetato



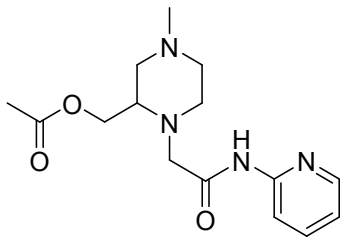
Una solución de **M18a** (1.2 g, 4.91 mmol) en acetonitrilo (12 mL) bajo argón fue tratada con carbonato de potasio (1.69 g, 12.3 mmol) y bencil 2-bromoacetato (0.7 mL, 4.42 mmol) y agitada durante 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con agua y extraída con etil acetato. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua, secadas sobre sulfato de sodio y concentradas. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina básica, 1% metanol : diclorometano) dio como resultado el intermedio **M18b.** A una solución de **M18b** (0.49 g, 1.25 mmol) en diclorometano desgasificado (con argón) (12 mL) se agregó trifluorometanosulfonato de cobre (II) (0.45 g, 1.25 mmol). Esta mezcla fue nuevamente desgasificada (10 min), a lo que siguió por la adición de anhídrido acético (0.31 g, 3.0 mmol), una tercera desgasificación (10 min) y fue agitada bajo argón durante 48 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con bicarbonato de sodio acuoso saturado y fue extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y concentradas. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina neutra, 0.25% metanol: diclorometano) dio como resultado **M18c**. MS (ESI+) *m/z* 321 (M+H)

M18d. Ácido 2-(2'-(acetoximetil)-4'-metilpiperazin-1'-il) acético



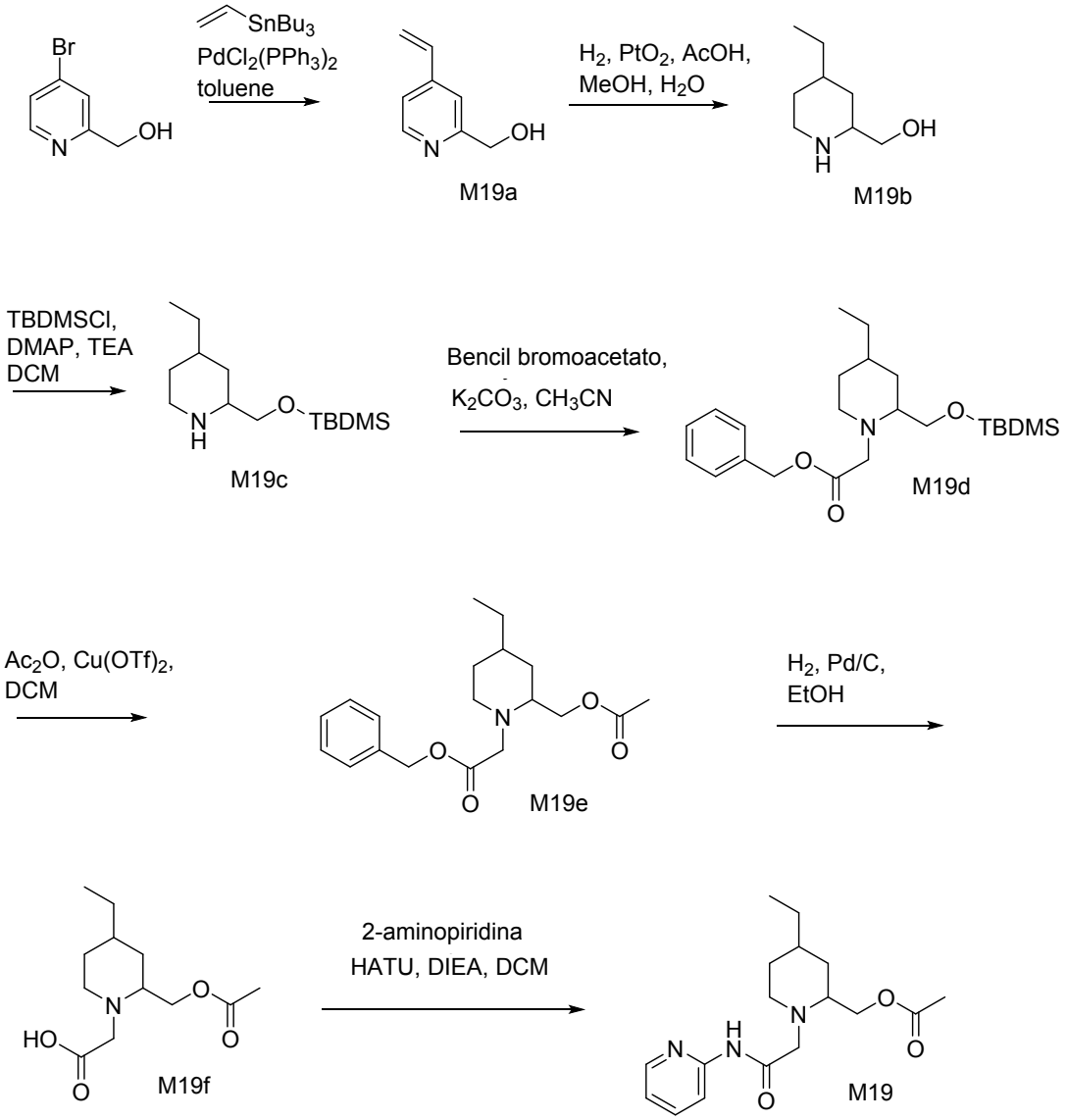
A una solución de **M18c** (0.225 g, 0.70 mmol) en etanol (5 mL) se agregó 5% paladio sobre carbono (0.045 g) y la reacción fue agitada bajo presión de un globo de hidrógeno durante 5 h. La reacción fue filtrada por Celite, el filtrado fue secado sobre sulfato de sodio y concentrado para proveer **M18d** que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 231.2 (M+H)

M18. 1-(4'-metil-1'-(2''-oxo-2''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperazin-2'-il)metil acetato

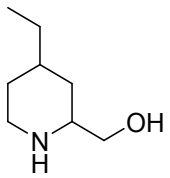


A una solución de **M18d** (0.060 g, 0.26 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón se agregó diisopropiletilamina (0.10 g, 0.78 mmol) y HATU (0.146 g, 0.39 mmol). La solución fue agitada 10 min, luego se agregó 2-aminopiridina (0.029 g, 0.31 mmol). La reacción fue agitada 16 h a temperatura ambiente luego tratada con agua y extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y evaporadas. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 10–12% metanol : diclorometano), seguida por HPLC preparativa (Columna: XBridge (150 × 19 mm); fase móvil: A=(0.1% TFA en agua), B=(CAN : metanol); gradiente: 0–2 min: 10% B; 2–8 min: 20% B; 8 min–fin: 50% B) dio como resultado **M18**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 2.12 min; MS (ESI+) *m/z* 307.1 (M+H).

M19. 1-(4'-etil-1'-(2''-oxo-2''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperidin-2'-il)metil acetato



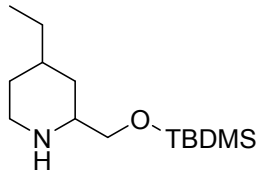
M19b. 1-(4'-etilpiperidin-2'-il)metanol



A una solución de 1-(4'-bromopiridin-2'-il)metanol (2 g, 10.6 mmol) en tolueno desgasificado (20 mL) se agregó tributil vinil estaño (4.44 g, 16.0 mmol) y $PdCl_2(PPh_3)_2$

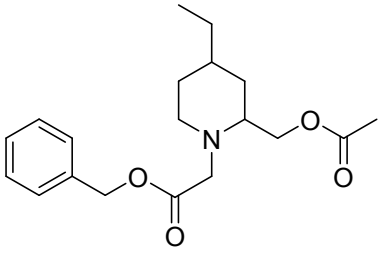
(0.746 g, 1.06 mmol), seguido por una segunda desgasificación de 10 minutos. La reacción fue agitada bajo argón durante 18 h a 50 °C, luego tratada con porciones adicionales de tributil vinil estaño (0.5 eq) y $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0.05 eq), y se agitó 18 h a 80 °C. La reacción fue evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 30% etil acetato : hexano) dio como resultado el intermedio **M19a**. Una mezcla de **M19a** (1.4 g, 10.4 mmol), óxido de platino (0.941 g, 4.15 mmol) y ácido acético (0.622 g, 10.4 mmol) en metanol (54 mL) y agua (36 mL) se mantuvo en un agitador Parr durante 36 h a 80 psi de presión de hidrógeno. La reacción fue filtrada por Celite® y concentrada. El residuo fue tratado con agua y extraído con etil acetato. La capa acuosa fue concentrada para proveer **M19b**, que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 144 (M+H).

M19c. 2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-etilpiperidina



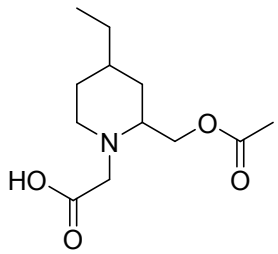
A una solución de **M19b** (0.4 g, 2.79 mmol) en diclorometano (8 mL) se agregó trietilamina (0.85 g, 8.4 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0.01 g), luego por goteo, una solución de terc-butildimetilchorosilano (1.26 g, 8.4 mmol) en diclorometano (4 mL), y se agitó 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con agua y extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y fueron evaporadas. La purificación por cromatografía instantánea (alúmina neutra, 10% etil acetato : hexano) dio como resultado **M19c**. MS (ESI+) *m/z* 258.6 (M+H).

M19e. bencil 2-(2'-(acetoximetil)-4'-etilpiperidin-1'-il)acetato



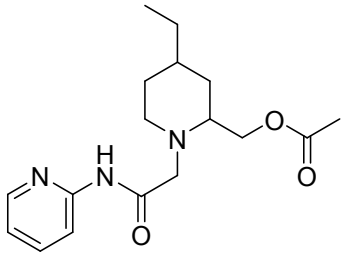
Una solución de **M19c** (0.50 g, 1.94 mmol) y carbonato de potasio (0.67 g, 4.86 mmol) en acetonitrilo (10 mL) a 0 °C bajo argón fue tratada por goteo con bencil 2-bromoacetato (0.53 g, 2.33 mmol) y agitada 6 h a temperatura ambiente. La reacción fue tratada con cloruro de amonio acuoso saturado y fue extraída con etil acetato. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y concentradas. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 10% etil acetato : hexano) dio como resultado el intermedio **M19d**. A una solución de **M19d** (0.30 g, 0.74 mmol) en diclorometano desgasificado (con argón) (12 mL) se agregó trifluorometanosulfonato de cobre (II) (0.267 g, 0.74 mmol). Esta mezcla fue nuevamente desgasificada (10 min), a lo que siguió la adición de anhídrido acético (0.18 g, 1.78 mmol), una tercera desgasificación (10 min) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente bajo argón. La reacción fue tratada con bicarbonato de sodio acuoso saturado y fue extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y concentradas. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 15% etil acetato : hexano) dio como resultado **M19e**. MS (ESI+) *m/z* 334.0(M+H).

M19f. Ácido 2-(2'-(acetoximetil)-4'-etilpiperidin-1'-il) acético



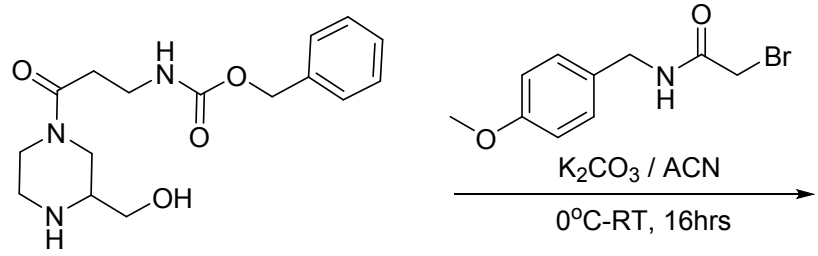
A una solución de **M19e** (0.40 g, 1.2 mmol) en etanol (8 mL) se agregó 5% paladio sobre carbono (0.08 g) y la reacción fue agitada bajo presión de un globo de hidrógeno durante 5 h. La reacción fue filtrada por Celite®. El filtrado fue secado sobre sulfato de sodio y concentrado para proveer **M19f** que se usó sin purificación adicional. MS (ESI+) *m/z* 244.1 (M+H).

M19. 1-(4'-etil-1'-(2''-oxo-2''-(piridin-2'''-ilamino)etil)piperidin-2''-il)metil acetato

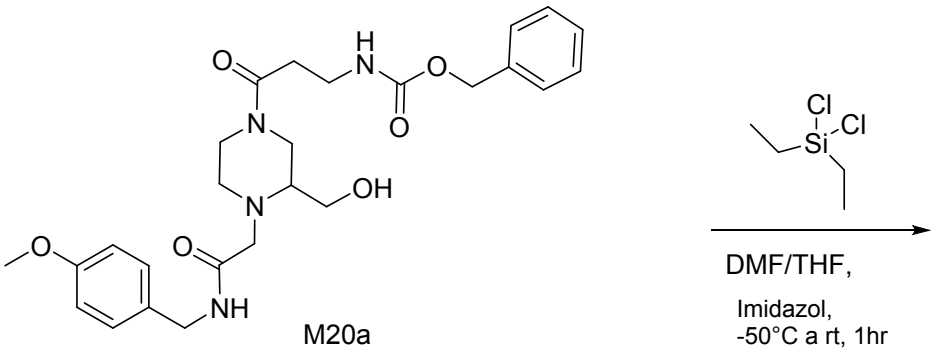


A una solución de **M19f** (0.10 g, 0.41 mmol) en diclorometano (5 mL) a 0 °C bajo argón se agregó diisopropiletilamina (0.16 g, 1.23 mmol) y HATU (0.187 g, 0.39 mmol). La solución fue agitada 15 min, luego se agregó 2-aminopiridina (0.046 g, 0.49 mmol). La reacción fue agitada 16 h a temperatura ambiente luego tratada con agua y extraída con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución salina, secadas sobre sulfato de sodio y evaporadas. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, 25–30% etil acetato : hexano) dio como resultado **M19**. LCMS (Método 8): tiempo de retención = 2.58 min; MS (ESI+) *m/z* 320.5 (M+H).

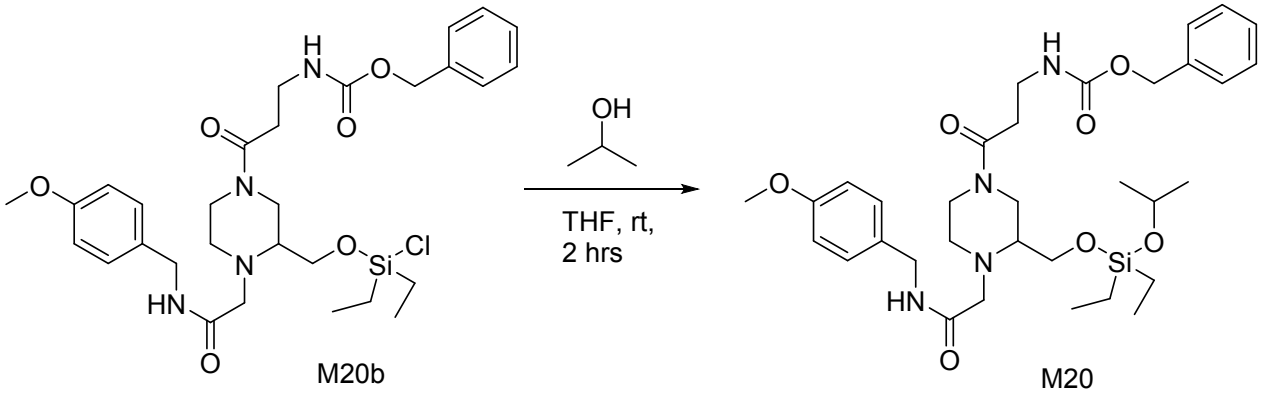
M20. Bencil N-(3-(3'-(((dietil(isopropoxi)silil)oxi)metil)-4'-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-1'-il)-3-oxopropil)carbamato



L-INT-1b



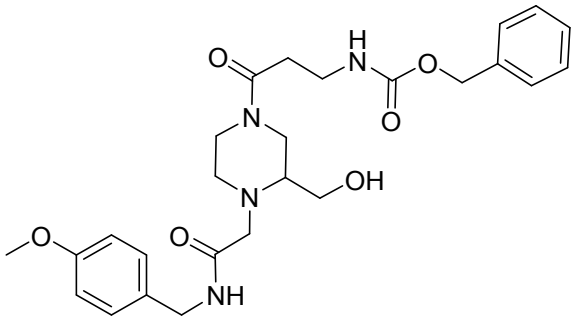
M20a



M20b

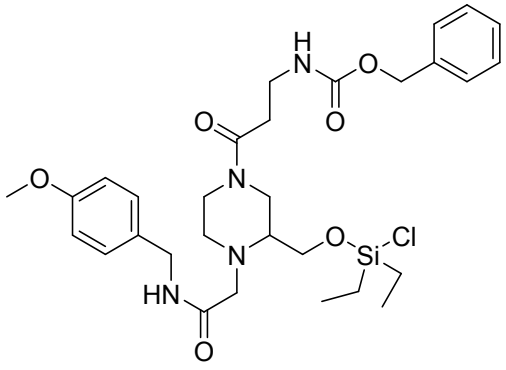
M20

M20a. Bencil (3-(3-(hidroximetil)-4-(2-((4-metoxibencil)amino)-2-oxoetil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)carbamato



L-INT-1b (342 mg, 1.065 mmol) fue disuelto en acetonitrilo (5 mL), y enfriado a 0 °C. La reacción fue tratada con carbonato de potasio (402 mg, 2.91 mmol) y 2-bromo-N-(4-metoxibencil) acetamida (250 mg, 0.969 mmol) y agitada a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción fue tratada con agua y extraída con etil acetato. La fase orgánica fue lavada con solución salina, secada (sulfato de sodio) y evaporada. La purificación por cromatografía instantánea (SiO_2, levigado con 0–10% metanol : diclorometano) dio como resultado **M20a**. LCMS (Método 1): tiempo de retención = 0.91 min; MS (ESI+) *m/z* 499.4 (M+H).

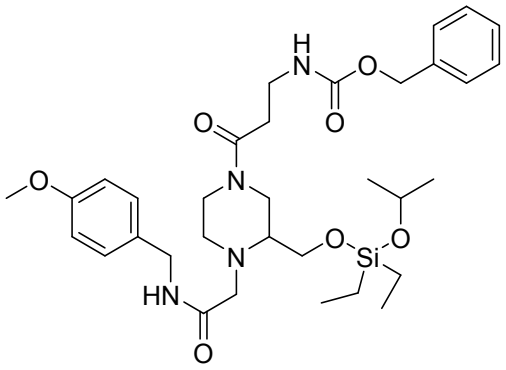
M20b. Bencil N-(3-(3'-(((clorodietilsilil)oxi)metil)-4'-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-1'-il)-3-oxopropil)carbamato



Se disolvió **M20a** (40 mg, 0.080 mmol) e imidazol (273 mg, 4.01 mmol) en tetrahidrofurano (2 mL) a temperatura ambiente, y se agregó por goteo durante unos pocos minutos a una solución de diclorodietilsilano (0.120 mL, 0.802 mmol) en

dimetilformamida (1 mL) y tetrahidrofurano (1 mL) a ~ −50 °C. La solución resultante se retiró del baño frío y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora para proveer **M20b**, que se usó sin purificación adicional. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 1.13 min; MS (ESI+) *m/z* 601.3 (M+H para M20b hidrolizado).

M20. Bencil N-(3-(3'-(((dietil(isopropoxi)silil)oxi)metil)-4'-(2''-((4'''-metoxibencil)amino)-2''-oxoetil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)carbamato



Se agregó por goteo 2-propanol (0.061 mL, 0.802 mmol) a temperatura ambiente a la solución de **M20b** crudo en DMF/THF preparada anteriormente. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 2 h y luego concentrada. La purificación por HPLC preparativa (columna: Waters XBridge 5 µm 30 × 50 mm; método: 45% a 70% acetonitrilo/H_2O con 10 mM NH_4OH durante 3.5 minutos gradiente a 75 mL/min) produjo fracciones que fueron concentradas, congeladas rápidamente y liofilizadas para proveer **M20**. LCMS (Método 5): tiempo de retención = 1.35 min; MS (ESI+) *m/z* 643.3 (M+H). ^{1}H-NMR (CD_3OD, ppm): δ: 7.25-7.39 (m, 5H), 7.22 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.85-6.90 (m, 2H), 5.06 (d, J=1.3 Hz, 2H), 4.27-4.42 (m, 2H), 4.08-4.12 (m, 1H), 3.70-3.84 (m, 5H), 3.61-3.66 (m, 1H), 3.44-3.55 (m, 1H), 3.34-3.43 (m, 4H), 3.03-3.19 (m, 2H), 2.74-2.85 (m, 1H), 2.39-2.66 (m, 4H), 1.15 (d, J=6.0 Hz, 6H), 0.92-0.98 (m, 6H), 0.52-0.63 (m, 4H).

Las especies de la Tabla 23 se prepararon utilizando métodos análogos a los utilizados en la síntesis de **M20**:

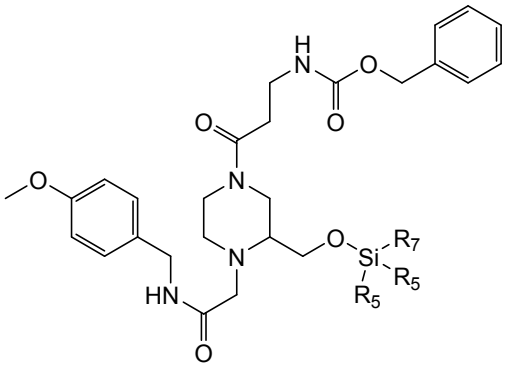
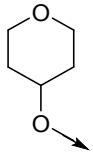
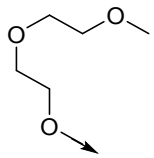
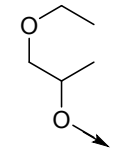
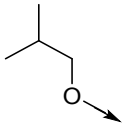
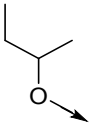
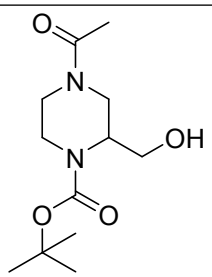
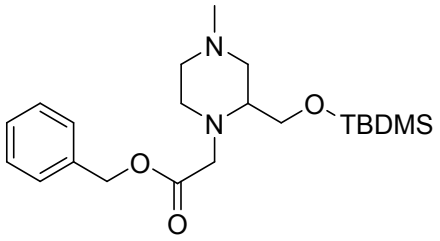
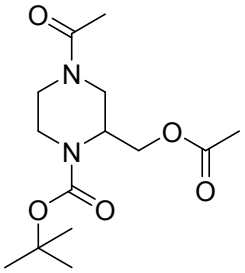
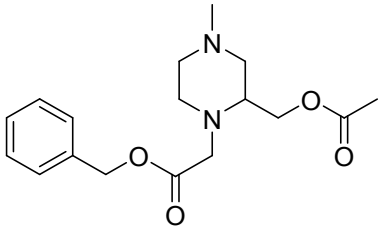
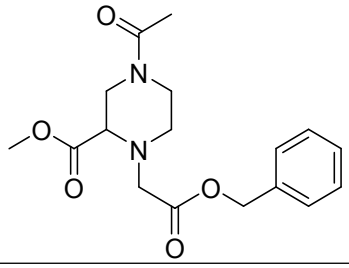
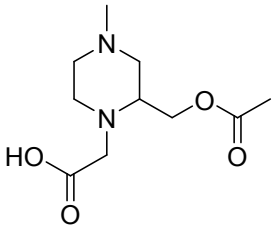
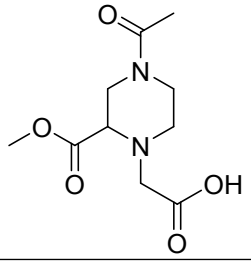
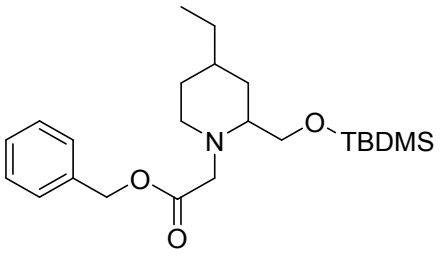
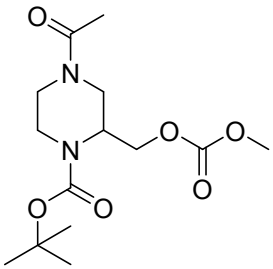
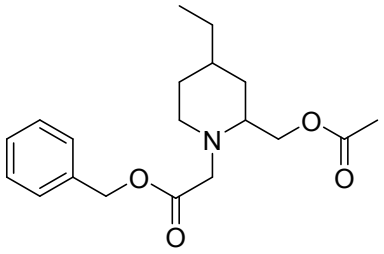
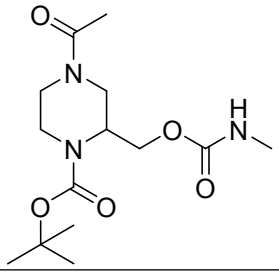
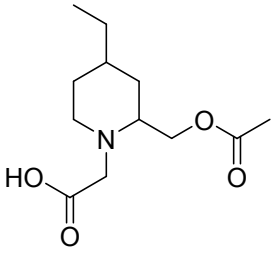
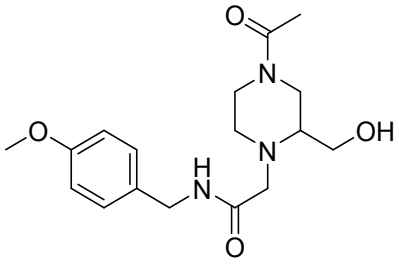
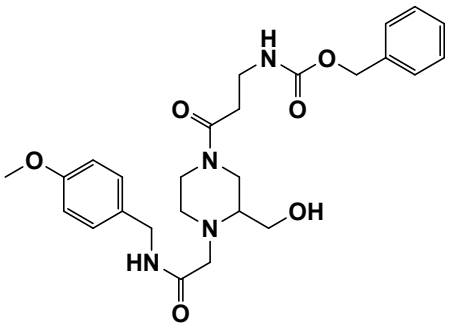
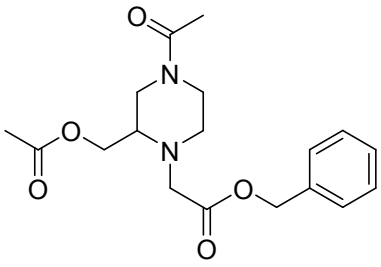
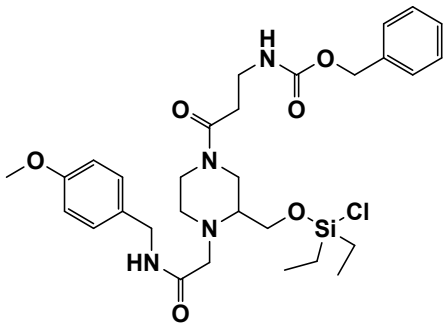
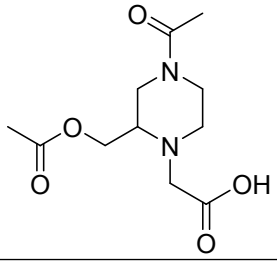

H
N
O
O
O
N
O
N
O
Si
R7
R5
R5
HN
O

Tabla 23. Compuestos Modelo			
R_5 **R_7** **Nombre**	**Número (intermedios usados)**	**LCMS: [M+H]; tiempo de retención (método)**	**^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD)**
R_7 =  R_5 = Et bencil N-(3-(3'-(((dietil((tetrahidro-2''H-piran-4''-il)oxi)silil)oxi)metil)-4'-(2'''-((4''''-metoxibencil)amino)-2'''-oxoetil)piperazin-1'-il)-3-oxopropil)carbamato	**M21** **(M20a,** **M20b)**	685.5; 1.43 min; (5)	7.25-7.40 (m, 5H), 7.22 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.85-6.91 (m, 2H), 5.06 (d, J=1.3 Hz, 2H), 4.27-4.41 (m, 2H), 3.93-4.04 (m, 1H), 3.87 (dt, J=11.7, 4.5 Hz, 2H), 3.71-3.83 (m, 5H), 3.61-3.66 (m, 1H), 3.34-3.52 (m, 7H), 3.02-3.20 (m, 2H), 2.74-2.85 (m, 1H), 2.42-2.69 (m, 4H), 1.75-1.86 (m, 2H), 1.47-1.57 (m, 2H), 0.96 (t, J=7.9 Hz, 6H), 0.54-0.65 (m, 4H).
R_7 =  R_5 = Et bencil N-(3-(3'-(((dietil(2''-(2'''-metoxietoxi)etan-1''-il)oxisilil)oxi)metil)-4'-(2''''-((4'''''-metoxibencil)amino)-2''''-oxoetil)piperazin-1'-il)-3-oxopropil)carbamato	**M22** **(M20a,** **M20b)**	703.5; 1.41; (5)	7.26-7.37 (m, 5H), 7.18-7.25 (m, 2H), 6.87 (d, J=8.7 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.27-4.43 (m, 2H), 3.65-4.11 (m, 7H), 3.45-3.65 (m, 6H), 3.32-3.44 (m, 9H), 3.08-3.20 (m, 2H), 2.73-2.85 (m, 1H), 2.52-2.67 (m, 3H), 2.39-2.49 (m, 1H), 0.87-1.03 (m, 6H), 0.49-0.68 (m, 4H)
R_7 =  R_5 = Et bencil N-(3-(3'-(((dietil(1''-etoxipropan-2''-il)oxisilil)oxi)metil)-4'-(2'''-	**M23** **(M20a,** **M20b)**	687.6; 1.55; (5)	7.25-7.37 (m, 5H), 7.22 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.85-6.90 (m, 2H), 5.01-5.15 (m, 2H), 4.29-4.41 (m, 2H), 4.01-4.10 (m, 1H), 3.58-3.92 (m, 7H), 3.32-3.58 (m, 8H), 3.05-3.19 (m, 2H), 2.73-2.85 (m, 1H), 2.41-2.66 (m, 4H), 1.31-1.37 (m, 1H), 1.11-1.18 (m, 5H), 0.90-

((4’’’-metoxibencil)amino)-2’’’-oxoetil)piperazin-1’-il)-3-oxopropil)carbamato			0.99 (m, 6H), 0.54-0.65 (m, 4H)
R_7 =  R_5 = Et bencil N-(3-(3’-(((dietil(isobutoxi)silil)oxi)metil)-4’-(2’’-((4’’’-metoxibencil)amino)-2’’-oxoetil)piperazin-1’-il)-3-oxopropil)carbamato	**M24** **(M20a,** **M20b)**	657.4; 1.44; (5)	7.25-7.39 (m, 5H), 7.18-7.25 (m, 2H), 6.84-6.90 (m, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.28-4.41 (m, 2H), 3.68-3.84 (m, 5H), 3.50-3.68 (m, 2H), 3.32-3.50 (m, 7H), 3.02-3.19 (m, 2H), 2.72-2.85 (m, 1H), 2.39-2.71 (m, 4H), 1.58-1.75 (m, 1H), 0.81-1.05 (m, 11H), 0.50-0.64 (m, 4H)
R_7 =  R_5 = Et bencil N-(3-(3’-(((sec-butoxidietilsilil)oxi)metil)-4’-(2’’-((4’’’-metoxibencil)amino)-2’’-oxoetil)piperazin-1’-il)-3-oxopropil)carbamato	**M25** **(M20a,** **M20b)**	657.4; 1.42; (5)	7.25-7.38 (m, 5H), 7.22 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.84-6.90 (m, 2H), 5.06 (d, J=1.3 Hz, 2H), 4.28-4.41 (m, 2H), 3.69-3.90 (m, 6H), 3.44-3.69 (m, 3H), 3.35-3.40 (m, 3H), 3.02-3.18 (m, 2H), 2.74-2.85 (m, 1H), 2.41-2.69 (m, 4H), 1.36-1.52 (m, 2H), 1.13 (d, J=6.1 Hz, 3H), 0.93-0.98 (m, 6H), 0.86-0.90 (m, 3H), 0.55-0.61 (m, 4H).
R_7 = OiPr R_5 = iPr bencil N-(3-(3’-(((isopropoxidiisopropilsilil)oxi)metil)-4’-(2’’-((4’’’-metoxibencil)amino)-2’’-oxoetil)piperazin-1’-il)-3-oxopropil)carbamato	**M26** (**M20a**, diclorodiisopropilsilano)	671.4; 1.51; (1)	7.31 (m, 5H), 7.22 (d, 2H), 6.92 (m, 2H), 6.86 (m, 1H), 5.05 (d, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.4-3.90 (m, 10H), 3.37 (m, 4H), 3.08 (m, 2H), 2.78 (m, 1H), 2.60 (m, 3H), 2.44 (m, 1H), 0.5-1.3 (m, 20H)
R_7 = OEt R_5 = iPr bencil N-(3-(3’-(((etoxidiisopropilsilil)oxi)metil)-4’-(2’’-((4’’’-metoxibencil)amino)-2’’-	**M27** (**M20a**, diclorodiisopropilsilano)	657.4; 1.63; (5)	7.31 (m, 5H), 7.21 (d, 2H), 6.86 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.3 (m, 0.5H), 4.13 (m, 2H), 3.4-3.90 (m, 11H), 3.37 (m, 4H), 3.09 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.57 (m, 3H), 2.45 (m, 1H), 1.09 (m, 18H)

oxoetil)piperazin-1'-il)-3-oxopropil)carbamato			

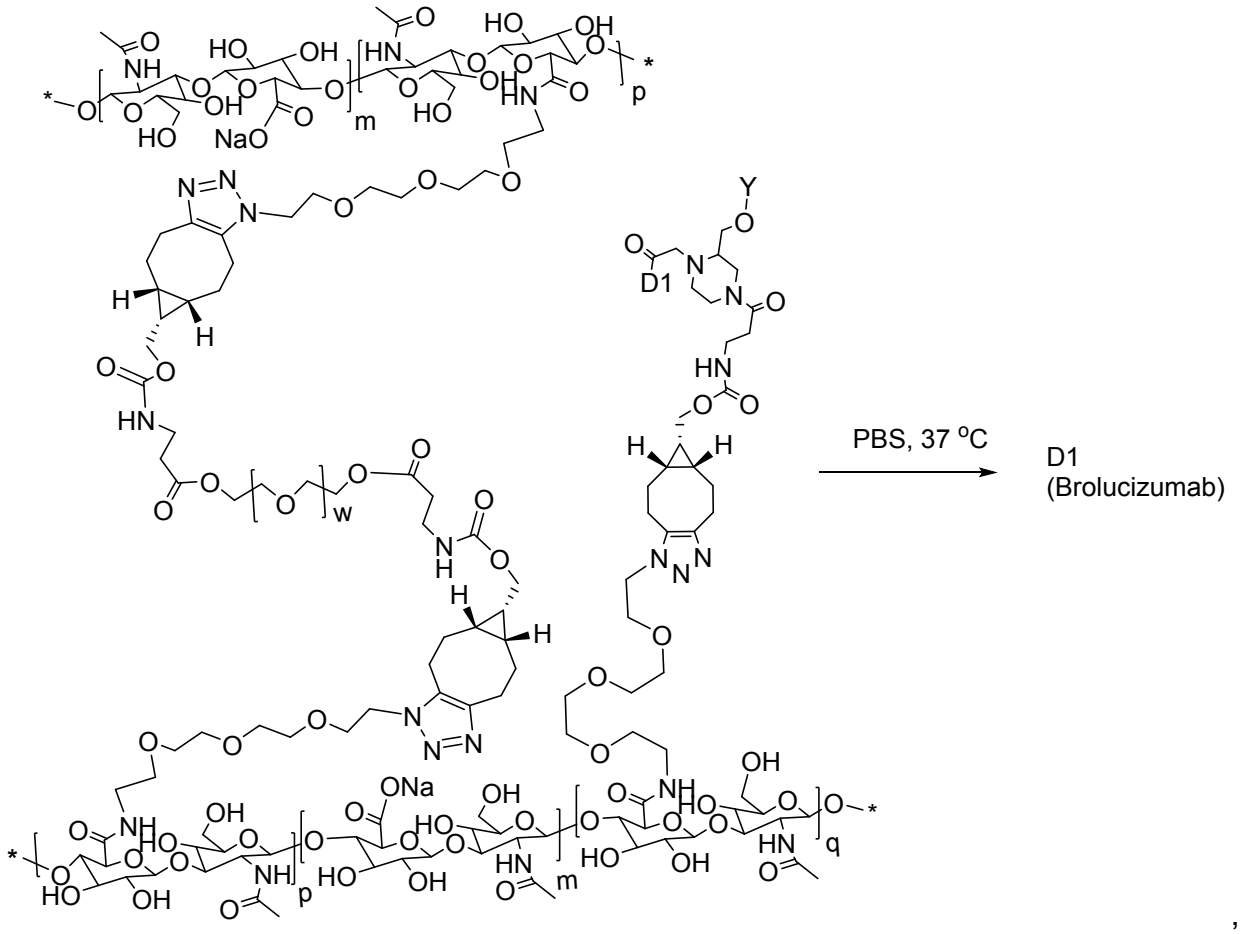
Tabla 24. Intermedios sintéticos de compuestos modelo			
Estructura	**Número**	**Estructura**	**Número**
	**M6b**		**M18b**
	**M6c**		**M18c**
	**M7b**		**M18d**
	**M7c**		**M19d**
	**M8a**		**M19e**
	**M9a**		**M19f**

	**M10a**		**M20a**
	**M17b**		**M20b**
	**M17c**	-	**-**

Ejemplo 8

Estudios de liberación de fármacos in vitro

8-1. Liberación de Brolucizumab de Conjugados de Hidrogel-Fármaco



,

donde Y se selecciona de la Tabla 2, precedente.

La liberación de brolucizumab de los conjugados de hidrogel C1a, C2a, C3a, y C4a se produce de acuerdo con lo ilustrado en la Figura 4A. En este estudio, se mantuvo una serie de conjugados de hidrogel-brolucizumab en 1 × PBS a 37°C para evaluar la liberación del fármaco después de la reacción de escisión del ligante que no deja huellas. Estas reacciones fueron muestreadas en varios puntos en el tiempo y analizadas para determinar la concentración de brolucizumab liberado en el sobrenadante.

Cada hidrogel (aproximadamente 50 µl; cantidad exacta determinada por pesaje, densidad supuesta de hidrogel = 1 g/mL) se agregó a un inserto Transwell® (Corning, Inc; membrana de policarbonato, 10 µm espesor, 6.5 mm diámetro, 0.4 µm tamaño de poro). Los pocillos de la placa se llenaron con 1 ml de 1 × PBS y los insertos conteniendo

hidrogel se colocaron en los pocillos. Se prepararon tres pocillos para cada muestra de hidrogel. La placa estaba bien tapada y mantenida a 37°C en un ambiente húmedo.

Se extrajeron muestras de tampón de recolección de los pocillos en varios puntos en el tiempo por hasta 180 días. En cada punto en el tiempo y para cada pocillo, se extrajo el inserto Transwell® y se transfirió todo el volumen de tampón de recolección a un tubo limpio y se pesó, luego se extrajo una muestra de punto en el tiempo del tampón de recolección (0,10 ml) y se almacenó a 4°C hasta el análisis final. El tampón de recolección se rellenó con 1 × PBS para restaurar el volumen del tampón de recolección a 1 ml y luego el tampón de recolección se devolvió al pocillo. El inserto se volvió a colocar en su pocillo y la placa volvió a la incubadora.

Al finalizar el estudio, la concentración de proteína de las muestras de punto en el tiempo (que representa la concentración de proteína en cada pocillo en el punto en el tiempo) se determinó utilizando un kit de análisis de proteínas (DC ™ Protein Assay Kit II, BioRad 5000112) con una curva estándar generada a partir de brolucizumab. Cada muestra de punto en el tiempo se analizó por duplicado y se promediaron los resultados. La cantidad total de proteína en un pocillo dado en un punto en el tiempo dado se calculó multiplicando la concentración de proteína en el punto en el tiempo por el volumen medido (suponiendo una densidad de 1 g/ml). La cantidad de proteína eliminada de un pocillo dado en un punto en el tiempo dado se calculó multiplicando la concentración de proteína en el punto en el tiempo por el volumen eliminado (0,10 ml). El brolucizumab liberado acumulado de cada hidrogel en cada pocillo hasta ese punto en el tiempo se calculó agregando la cantidad total de brolucizumab en el pocillo en cada punto en el tiempo a la cantidad acumulada de brolucizumab eliminado de ese pocillo en cada punto en el tiempo antes de ese punto en el tiempo. El porcentaje acumulativo de proteína liberada de los conjugados C1a, C2a, C3a y C4a hasta un punto en el tiempo dado se ilustra en la Figura 4B. El porcentaje acumulado de brolucizumab liberado se calcula dividiendo el brolucizumab liberado acumulado en un punto en el tiempo dado por el brolucizumab presente en la muestra inicial de hidrogel y multiplicándolo por 100. Los datos se normalizan al establecer la cantidad de fármaco liberada medida que ha alcanzado el valor de meseta como 100%. Como es evidente en la Figura 4B, la liberación de brolucizumab del portador se mantiene durante un período de meses y la

tasa de liberación está influenciada por la estructura del ligante que no deja huellas utilizado en el conjugado.

Concentración de proteínas en una pocillo en un punto en el tiempo t:

$$[P](t)$$

Volumen total en un pocillo en el punto en el tiempo t:

$$V(t)$$

Proteína total un pocillo en el punto en el tiempo t:

$$P_{pocillo}(t) = [P](t) \times V(t)$$

Proteína retirada del pocillo en un punto en el tiempo t:

$$R(t) = [P](t) \times 0.1mL$$

Proteína liberada acumulada del hidrogel hasta el punto en el tiempo t:

$$P_{cum}(t) = P_{pocillo}(t) + \sum_{i=0}^{t-1} R(t)$$

8-2. Liberación de D2 de conjugados de hidrogel-fármaco

Los ensayos de liberación in vitro fueron ejecutados en insertos de 6.5 mm Transwell® (8 µm tamaño de poro, Corning). Una alícuota de 100 µL de hidrogel HA ligado a fármaco se agregó a cada inserto Transwell junto con 100 µL de líquido sinovial bovino (BSF, de Bioreclamation IVT, suplementado con los siguientes agentes antimicrobianos: 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies) y 1% de Fungizone (Life Technologies)) o 100 µL de PBS. El volumen inicial total de gel y medio de liberación en el inserto fue de 200 µL. Se pipetearon 900 µL de BSF (más agentes antimicrobianos) o PBS en los pocillos de un plato Transwell, los insertos conteniendo hidrogel se colocaron en los pocillos y la placa se incubó en una incubadora humidificada a 37°C, 5% de CO2 (se prepararon dos insertos para cada muestra de hidrogel). En cada punto en el tiempo, los insertos Transwell se transfirieron a un nuevo pocillo lleno con 1000 µL de BSF nuevo (más agentes antimicrobianos) o PBS y el contenido del pocillo viejo se retiró y almacenó a -80°C hasta el análisis.

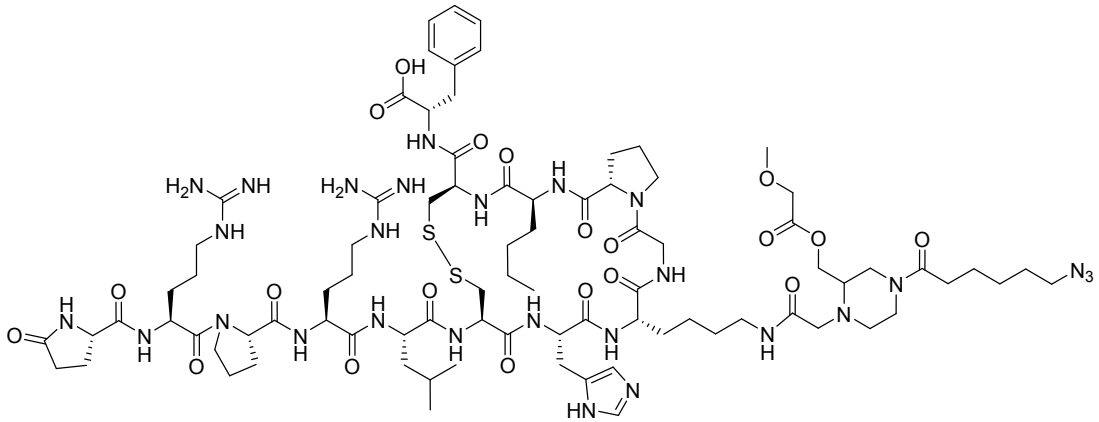
La cuantificación de D2 liberado se determinó mediante ELISA sandwich. El protocolo fue similar al descripto en el sistema de desarrollo DuoSet Elisa de IGF-1 humana (R&D Systems) con las siguientes modificaciones: para la preparación de la

placa, se recubrieron placas de formato de 96 pocillos (Costar) con anticuerpo de captura (Novartis) diluido en BupH Carbonate-Bicarbonate Buffer Pack (Thermoscientific) y se incubó durante la noche a 4°C. Todos los demás reactivos fueron de R&D Systems excepto el BSA (Sigma), tampón de lavado KPL (Kirkegaard & Perry) y la solución de bloqueo KPL milk diluent/blocking (Kirkegaard & Perry). El anticuerpo de detección se incubó durante 1,5 h. La cantidad acumulada de proteína liberada de los hidrogeles C10, C11 y C12 durante la incubación con PBS o BSF se muestra en la Figura 5. La cantidad de proteína liberada en el pocillo en un punto en el tiempo dado se calculó multiplicando la concentración de proteína en el medio de liberación (BSF o PBS) en el punto en el tiempo por el volumen total de medio de liberación (1.1 ml). La proteína liberada acumulada de cada hidrogel hasta un punto en el tiempo dado se calculó sumando la cantidad de proteína liberada en ese punto en el tiempo (valor promedio de los dos pocillos para cada hidrogel) a la cantidad acumulada de proteína liberada en cada punto en el tiempo antes de ese punto de tiempo. Como es evidente en la Figura 5, la liberación de D2 del portador se mantiene durante un período de semanas y la tasa de liberación está influenciada por la estructura del ligante que no deja huellas utilizado en el conjugado.

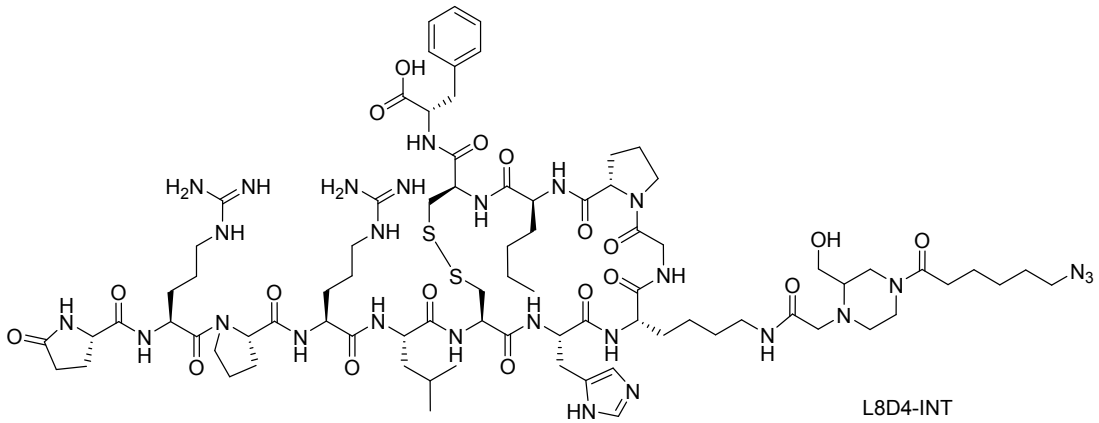
D2 es un fármaco que causa la fosforilación del receptor de IGF1 en las células NIH3T3 que sobreexpresan el receptor de IGF-1 humana. La actividad biológica del D2 liberado se evaluó cuantificando la fosforilación del receptor de IGF1 causada cuando las células NIH3T3 que sobreexpresan el receptor de IGF-1 humano se incuban con el medio de liberación conteniendo el fármaco de los puntos en el tiempo individuales (recogido según se ha descripto). El nivel de fosforilación del receptor de IGF-1 se determinó lisando las células y sometiendo los lisados a ELISA. Las células se sembraron a 6000 células/pocillo (formato de placa de 96 pocillos) en DMEM con alto contenido de glucosa, FCS al 10%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 U/ml y 100 µg/ml estreptomicina y se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO2. Luego, las células se privaron de suero en medios de inanición (DMEM de alta glucosa, BSA al 0,1%, piruvato de sodio al 1%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml) durante 1,5 ha 37°C, 5% de CO2 antes de incubarse con estándares de D2 nuevos o el

medio de liberación que contiene fármaco durante 1 hora a 37°C, 5% CO_2. El medo de liberación conteniendo se diluyó con medio de inanición antes de la adición a las células para lograr una concentración de D2 en el rango de la curva estándar, suponiendo que no hay pérdida de actividad. El factor de dilución apropiado para cada muestra se determinó en función de la concentración de D2 en el medio de liberación que previamente se había medido mediante ELISA sandwich utilizando el método descrito en el párrafo anterior. Las células se lisaron en 1 × solución salina tamponada con Tris (Tris·HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM), Triton X-100 al 1%, EDTA 5 mM, 1 x inhibidor de proteasa fosfatasa (Thermoscientific) durante 30–45 minutos en un agitador horizontal a 4°C. Las muestras se almacenaron durante la noche a -80°C. Los niveles de fosforilación de IGF-1R se analizaron mediante ELISA utilizando el DuoSet IC human phosphor-IGF-1R (R&D Systems) con las siguientes modificaciones: el anticuerpo de captura (R&D MAB391) se diluyó a 4 µg/ml en PBS, los pocillos se lavaron con 300 µl/pocillo de PBS-Tween (Millipore, 524653), se bloquearon los pocillos con 200 ul/pocillo de BSA al 1% en PBS, se detectó la fosforilación usando un anticuerpo HRP-anti-fosfotirosina (R&D, HAM1676) y se detectó la señal luminiscente con un sustrato de quimioluminiscencia (Pierce, 37069). La concentración equivalente de D2 nuevo requerida para lograr el nivel medido de fosforilación de IGF-1R en las células tratadas con D2 liberado se interpoló a partir de una curva estándar, y luego se corrigió para la dilución. Los valores resultantes, que se ilustran en la Figura 9 para el D2 liberado del conjugado C8 en medio de liberación BSF, representan la concentración equivalente de D2 nuevo que proporcionaría el nivel observado de fosforilación de IGF-1R en las células. Como es evidente en la Figura 9, la liberación de D2 biológicamente activo del conjugado C8 se mantiene durante un período de siete días.

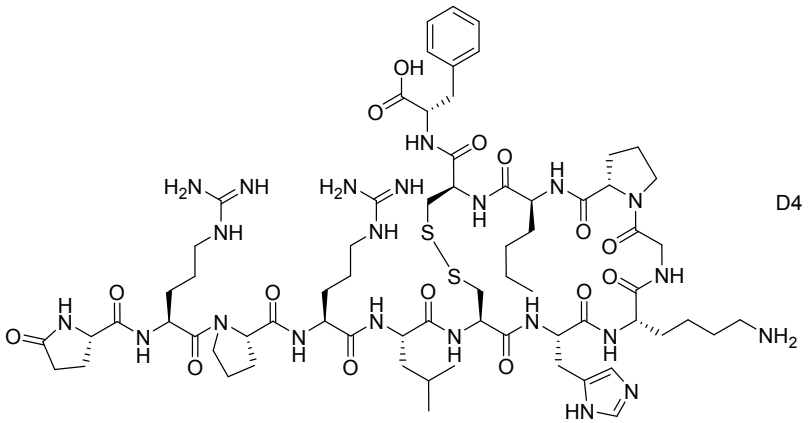
8-3. Liberación de D4 del Aducto Ligante-Fármaco: L8D4



L8D4



L8D4-INT



D4

Se preparó 1 mg/mL de solución de **L8D4** en 1× PBS. El pH de la solución de aducto se midió y estableció en 6.9. La solución se colocó en un Thermomixer a 40ºC con agitación a 600 rpm. Se extrajeron alícuotas para el análisis por HPLC en los siguientes puntos en el tiempo después de la disolución: 0 h, 2 h, 4 h, 21.5 h, 28.5 h, 43.5 h, 67.5 h, 100.5 h, 180.5 h, y 266.5 h.

La composición de la solución se evaluó en cada punto en el tiempo mediante HPLC (Método a continuación). Los picos parental (**L8D4**, *m/z* = +952.2 para $(M+2H)^{2+}$), intermedio (**L8D4-INT**, *m/z* = +916.4 para $(M+2H)^{2+}$), y fármaco liberado (**D4**, *m/z* = +1537.9 para M+H) fueron asignados por detección de MS, y las cantidades relativas de cada especie se determinaron mediante la integración de los picos del cromatograma generado usando la absorbancia UV a 214 nm. El porcentaje de cada especie presente en la solución se calculó dividiendo el área pico respectiva (ya sea **L8D4**, **L8D4-INT** o **D4**) por la suma de las tres áreas pico para **L8D4**, **L8D4-INT**, y **D4** y multiplicando el resultado por 100. El porcentaje de cada especie presente en la solución fue graficado versus tiempo (Figura 6) y la vida media de degradación para **L8D4** parental (1 día) y la vida media de liberación para **D4** (8 días) se estimó utilizando un software de ajuste de curvas, suponiendo una cinética de primer orden de liberación y degradación. Como es evidente en la Figura 6, la liberación de D4 del ligante que no deja huellas se mantiene durante un período de 11 días. Los productos de reacción observados son consistentes con el mecanismo de escisión del ligante que no deja huellas que se muestra en la Figura 1.

Condiciones de HPLC-MS Analítica: ACQUITY UPLC BEH C18; tamaño de partícula: 1.7 µm; tamaño de columna: 2.1 × 50 mm; eluyente/gradiente: 2–98% CH_3CN/H_2O/4.4 minutos (CH_3CN conteniendo 0.1% ácido fórmico y H_2O conteniendo 0.1% ácido fórmico); velocidad de flujo: 1.0 mL/min; temperatura de columna: 50 °C.

8-4a. Protocolo de estudio de liberación para los conjugados de ligante que no deja huellas-fármaco modelos M1–M19 in vitro

En este estudio una serie de conjugados de ligante que no deja huellas-fármaco modelo, donde el fármaco es un compuesto que contiene amina de bajo peso molecular, se mantuvo en 1 × PBS a 37°C. Estas reacciones fueron muestreadas en varios puntos

en el tiempo y analizadas para determinar la concentración del compuesto de partida restante, así como la concentración del fármaco que contiene amina liberado (p-metoxibencilamina, 2-amino-piridina, p-metoxianilina, o N-metil-p-metoxibencilamina). Se calcularon las vidas medias para la degradación de los compuestos parentales y las vidas medias de liberación para el fármaco que contiene amina.

Método para la estimación de las tasas de liberación de fármacos que contienen amina de M1–M19

Cada compuesto **M1–M19** se preparó como una solución madre de 0.1 M en DMF, al igual que un conjunto de soluciones estándar para el fármaco liberado que contiene amina (4-metoxibencilamina, 2-aminopiridina, p-metoxianilina, y N-metil-p-metoxibencilamina). Una alícuota de 35 µl de cada solución se agregó a 3.465 mL de PBS para obtener soluciones 1 mM de cada conjugado o fármaco conteniendo amina. Se colocó una alícuota de 150 µl de cada solución 1 mM en viales de LCMS con un inserto de polipropileno; se prepararon 2 viales para cada compuesto en cada punto en el tiempo.

Los viales se incubaron a 37°C. en cada punto en el tiempo (por ejemplo, 0, 1, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 49 y 56 días), se retiraron dos viales de cada conjugado de la incubadora y se congelaron a -20°C para evitar la hidrólisis adicional. Todas las muestras se descongelaron y analizaron en un lote después de completar el estudio de liberación utilizando el método analítico de HPLC que se describe a continuación. Cada muestra se analizó dos veces. Las soluciones de control de los fármacos conteniendo amina se prepararon antes del análisis y se analizaron tal cual sin incubación previa a 37°C.

Condiciones de HPLC-MS Analítica para el Estudio 8.4a

HPLC: Thermo Accela HPLC y Automuestreador; Temperatura de la Bandeja del Automuestreador: 8 °C; Volumen de Inyección: 20 µL; Columna: Phenomenex Kinetex C18, 2.1 × 50 mm, 2.6 µm. Temperatura de Columna: Ambiente; Fases Móviles: A = 0.1% ácido fórmico en agua; B = 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo; Velocidad de Flujo: 200 µL/min. Gradiente (tiempo/% B): 0/0, 3/0, 10/80, 15/80, 15.1/0, 18/0.

UV: Thermo Accela PDA; Rango de Escaneo: 200–400 nm; Paso de longitud de onda: 1 nm; Frecuencia de Muestreo: 20 Hz; Ancho de banda de filtro: 9 nm; MS: Thermo LTQ XL; Modo de ionización: ESI; Voltaje de Pulverización: 0 V a tiempo 0–1 minutos luego cambia a 4 kV; Temperatura Capilar: 250 °C; Válvula de Desvío: Eluato de LC para descarte 0–1 minutos luego MS con flujo desviado; Rango de Masa: 120–800 Da.

La composición de la solución se evaluó en cada punto en el tiempo usando HPLC. Los picos de los fármacos conteniendo amina parental, intermedio y liberado fueron asignados por detección de MS, y las cantidades relativas de cada especie se determinaron mediante la integración de los picos del cromatograma generado usando la detección de absorbancia UV a 272 nm. Al área pico promedio para cada compuesto M1 – M19 al día 0 se le asignó un valor normalizado de 100. Para el estándar del fármaco conteniendo amina liberado (por ejemplo, p-metoxibencilamina), se asignó al área pico promedio de cada estándar un valor normalizado de 100. El área absoluta bajo la curva para cada especie detectada se comparó con estos valores. La reproducibilidad de área pico de corrida a corrida se ubicó típicamente dentro del 20% en señal fuerte y considerablemente peor en señales débiles, por lo que las señales normalizadas por encima de 100 probablemente correspondan a valores cercanos a 100 (probablemente 90-100, dentro del error experimental). Se calculó el porcentaje de fármaco parental y que contiene amina presente en la solución dividiendo el área pico relevante por el área media a la que se le asignó un valor normalizado de 100 para la misma especie y multiplicando el resultado por 100. El porcentaje de fármaco parental y que contiene amina presente en la solución se graficó contra el tiempo y se estimó la vida media de degradación del fármaco parental y la vida media de liberación del fármaco que contiene amina presente en la solución usando un software de ajuste de curva suponiendo una cinética de primer orden. Las vidas medias calculadas redondeadas al día entero más cercano se presentan en la Tabla 25.

8-4b. Estudio de liberación in vitro de M20–M27

En este estudio, una serie de conjugados de fármaco-ligante que no deja huellas modelo M20–M27 se mantuvo en solución acuosa a 37°C. Estas reacciones fueron muestreadas en varios puntos temporales y se analizaron para determinar la

concentración del compuesto de partida restante. El método analítico no fue optimizado para determinar la concentración del fármaco conteniendo amina. Se calculó la vida media de degradación para el parental.

Método para la estimación de las tasas de degradación de conjugado para M20–M27

Cada compuesto **M20–M27** se preparó como una solución madre 0.1 M en DMF. Una alícuota de 35 µL de cada solución se agregó a 3.465 ml de 2:1 DMF: PBS (para el compuesto **M24**: 3:1 DMF: PBS) con el fin de obtener soluciones 1 mM de cada compuesto **M20 – M27**. Los viales de reacción se mantuvieron a 37°C. En cada punto en el tiempo (por ejemplo, 0, 1, 3, 8, 14, 21, 28, 35, 49, 56, 70, 92 días) se prepararon muestras analíticas recogiendo 150 µL de cada solución 1 mM y diluyéndolas con 75 µL DMF. Se recogieron dos muestras analíticas de cada vial de reacción en cada punto en el tiempo y se almacenaron a 4°C. Todas las muestras se analizaron en un lote después de la finalización del estudio de liberación. Cada muestra se analizó dos veces utilizando un método analítico de HPLC descrito a continuación.

La composición de la solución de reacción se evaluó en cada punto en el tiempo usando HPLC. Los picos para los compuestos **M20-M27** fueron asignados por detección de MS, y se determinó la integración del pico del cromatograma generado usando la detección de absorbancia UV a 272 nm. Al área pico promedio para cada compuesto **M20–M27** al día 0 se le asignó un valor normalizado de 100. El área absoluta bajo la curva para cada especie detectada se comparó con estos valores. La reproducibilidad de área pico de corrida a corrida se ubicó típicamente dentro del 20% en señal fuerte y considerablemente peor en señales débiles, por lo que las señales normalizadas por encima de 100 probablemente correspondan a valores cercanos a 100 (probablemente 90-100, dentro del error experimental). Se calculó el porcentaje de los compuestos **M20–M27** remanente en la solución dividiendo el área pico relevante por el área media a la que se le asignó un valor normalizado de 100 para la misma especie y multiplicando el resultado por 100. El porcentaje de compuesto **M20-M27** presente en la solución se graficó contra el tiempo y se estimó la vida media de degradación usando un software de

ajuste de curva suponiendo una cinética de primer orden. Las vidas medias calculadas redondeadas al día entero más cercano se presentan en la Tabla 25.

Condiciones de HPLC-MS Analítica para el estudio 8.4b.

Las condiciones son iguales a las usadas en el estudio 8.4a con las siguientes diferencias: Fases Móviles: A = 5 mM hidróxido de amonio en agua; B = 5 mM hidróxido de amonio en acetonitrilo; Velocidad de Flujo: 400 µL/min: Gradiente (tiempo/% B): 0/10, 0.5/10, 4/80, 8/80, 8.1/10, 12/10. Válvula de derivación conmutada 0,5 minutos después de la inyección de muestra.

Tabla 25. Resultados del Estudio de Liberación para M1–M27

Nombre	Estabilidad calculada $t_{1/2}$, parental (d)	Liberación calculada $t_{1/2}$, de fármaco conteniendo amina (d)
M1	37	59
M2	23	65
M3	2	12
M4	2	2
M5	3	2
M6	26	41
M7	3	No se liberó fármaco
M8	35	26
M9	Sin degradación	No se liberó fármaco
M10	Sin degradación	No se liberó fármaco
M17	50	34
M18	8	5
M19	6	4
M20	51	NA
M21	126	NA
M22	23	NA
M23	47	NA
M24	36	NA
M25	80	NA
M26	Sin degradación	NA
M27	Sin degradación	NA

Ejemplo 9

9-1. Liberación de Brolucizumab de Conjugados de Hidrogel-Fármaco

En estos ejemplos, el conjugado de hidrogel fármaco se administró por vía intravítrea a conejos a 2 dosis diferentes, seguido de una dosis de VEGF después de 32 días. Luego de 34 días, se examinaron los ojos de los conejos mediante imágenes para evaluar el grado de bloqueo de la fuga de vasos sanguíneos de la retina. También se determinó la exposición terminal de brolucizumab en la porción líquida del humor vítreo del ojo.

El conjugado de hidrogel-fármaco C2b, preparado a 10,2 mg/ml de carga de brolucizumab se diluyó antes de la dosificación para obtener muestras con cargas de brolucizumab de 6 mg/ml (C2b1) y 0,6 mg/ml (C2b2). La cantidad de 1 × PBS a añadir se calculó mediante la siguiente ecuación: (diluyente de PBS (ml)) = [(fármaco total (mg)/carga de fármaco deseada (mg/ml)] - (volumen inicial de conjugado (ml) .

Preparación de conjugado con carga de brolucizumab de 6 mg/ml (C2b1): a 0,9 ml de C2b en una jeringa de 3 ml se agregaron 0,63 ml de 1 × PBS. La jeringa se tapó y se agitó vigorosamente para homogeneizar. Esto dio como resultado un volumen de muestra total de 1,53 ml con carga de proteína = 9,18 mg de brolucizumab/1,53 ml = 6,0 mg/ml de brolucizumab en C2b1.

El conjugado C2b1 fue distribuido para la dosificación en jeringas de insulina de 0,5 ml con agujas 30G, retirando el émbolo y rellenando con el volumen deseado de C2b1. Se eliminaron las burbujas de aire mediante una suave manipulación de la jeringa.

Preparación del conjugado con carga de brolucizumab de 0,6 mg/ml (C2b2): a 0,1 ml de C2b1 en una jeringa de 3 ml, se agregó 0,9 ml de 1 × PBS. La jeringa se tapó y se agitó vigorosamente para homogeneizar. Esto dio como resultado un volumen de muestra total de 1,0 ml con carga de proteína = 0,60 mg de brolucizumab/1,0 ml = 0,6 mg/ml de brolucizumab en C2b2.

El conjugado C2b2 fue distribuido para la dosificación en jeringas de insulina de 0,5 ml con agujas 30G, retirando el émbolo y rellenando con el volumen deseado de C2b2. Se eliminaron las burbujas de aire mediante una suave manipulación de la jeringa.

La administración intravítrea de 400 ng/ojo de VEGF humano (hVEGF) en los ojos de conejos macho raza Dutch fajado (peso corporal de aproximadamente 1.6 a 2 kg) da como resultado una fuga máxima a las 48 horas después del tratamiento. Esta fuga de los vasos puede inhibirse por completo mediante la administración previa IVT de una molécula anti-VEGF como ranibizumab, bevacizumab o brolucizumab. El intervalo entre

la administración de la molécula anti-VEGF y el desafío hVEGF determina la duración de la acción de la molécula anti-VEGF. En este estudio, treinta y dos días antes del desafío hVEGF (34 días antes de la captura de imágenes), se inyectaron anticuerpos anti-VEGF (ya sea en solución o como el conjugado de hidrogel) o hidrogel solo (control negativo) en el vítreo. Cada cohorte de conejo consistió en 3–5 animales (6–10 ojos) inyectados con el mismo anticuerpo/construcción al mismo tiempo. La inhibición de la fuga vascular inducida por cada construcción anti-VEGF se calcula en relación con la fuga vascular observada en el grupo tratado con hidrogel solo.

Los ojos de conejos machos raza Dutch fajado (peso corporal de aproximadamente 1.6 a 2 kg) se dilataron con ciclopentolato tópico al 1% y 2.5 fenilefrina y la córnea anestesiada con proparacaína tópica al 0.5%. Los conejos luego fueron anestesiados con una inyección intramuscular de mezcla de ketamina/xilazina (17.5–35 y 2.5–5 mg/kg). Bajo visualización directa con un microscopio quirúrgico, se inyectaron 50 µL del tratamiento en el vítreo. La aguja de calibre 30 se insertó superotemporalmente aproximadamente a 2 mm del limbo en el medio del vítreo. Se examinó el ojo de los conejos en busca de complicaciones por la inyección (por ejemplo, hemorragia, desprendimiento de retina o una lesión en el cristalino) y luego el procedimiento se repitió en el otro ojo. Se aplicó ungüento antibiótico a ambos ojos para todos los estudios. A los 32 días después de la inyección inicial del conjugado de hidrogel-fármaco, se inyectaron 400 ng de hVEGF recombinante en el vítreo de los ojos de los conejos. El VEGF humano (Peprotech; cat AF 100-20, lote 0508AF10) se diluyó en solución salina estéril al 0,9%. Después de 48 horas desde la inyección intravítrea de desafío con VEGF, la vasculatura retiniana del conejo fue fotografiada según se describe a continuación.

Los cambios en los vasos retinianos inducidos por VEGF humano se cuantificaron mediante la adquisición de imágenes de los mismos después de la administración intravenosa de colorante fluorescente. Las imágenes adquiridas después de la administración de fluoresceína se utilizaron para determinar la permeabilidad de los vasos. La generación de valores cuantitativos de fuga de fluoresceína también requirió la obtención de imágenes de un colorante fluorescente seleccionado para marcar los vasos (dextrano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)). Las imágenes oculares fueron adquiridas 48 horas después de VEGF. Las imágenes fueron un

promedio de hasta 40 imágenes de oftalmoscopio láser de barrido (SLO) registradas tomadas con una lente de 30 grados en el rayo medular nasal adyacente al nervio óptico. Se utilizó el canal de fluoresceína de un Spectralis® de 6 modos (Heidelberg Engineering) para todas las adquisiciones de imágenes. Antes de la obtención de las imágenes, los conejos recibieron 1–2 gotas de ciclopentolato al 1% y 1–2 gotas de fenilefrina al 2,5% por vía tópica para la dilatación; también se aplicó proparacaína al 0,5% como anestésico tópico. Los conejos fueron anestesiados posteriormente según se ha descripto. Los vasos se marcaron aproximadamente 5 minutos antes de adquirir la imagen con una inyección intravenosa de 1 ml de una solución de dextrano de 2000 kD conjugado con FITC (SIGMA®) en la vena marginal del oído. La concentración de FITC-dextrano utilizada (35-70 mg/ml) se eligió empíricamente para cada lote en función de la señal de fluorescencia necesaria para generar imágenes de alta calidad. Posteriormente se adquirieron imágenes de la vasculatura retiniana marcada. Luego se evaluó la permeabilidad de los vasos retinianos mediante la inyección de 0,3 ml de una solución de fluoresceína al 10% en la vena marginal del oído. A continuación se tomaron las imágenes 3 minutos después de la inyección IV para un ojo seguida por una imagen transcurridos aproximadamente 4-6 minutos de la inyección IV de fluoresceína para el otro ojo.

Los efectos del VEGF sobre la permeabilidad de los vasos se evaluaron a partir de las imágenes de fluoresceína de 3-6 minutos. El análisis se realizó cuantitativamente con un software diseñado desarrollado a este fin utilizando MATLAB® (Mathworks®). Se hicieron exclusiones antes de desenmascarar en casos de calidad de imagen insuficiente, si se notó inflamación, o en casos donde hubo problemas con las inyecciones.

La fuga de fluoresceína se cuantificó con técnicas de procesamiento de imágenes utilizando el método descripto a continuación.

Primero, las imágenes luego de VEGF FITC-dextrano y fluoresceína se alinearon entre sí utilizando las características de los vasos comunes a ambas imágenes, luego:

1. Las regiones fuera del rayo medular luego se recortaron de las imágenes registradas conjuntamente junto con las áreas localizadas con calidad de imagen insuficiente para el análisis.

2. Se delinearon varias regiones de interés en los vasos retinianos en ambas imágenes y se aumentó la intensidad de una imagen hasta que la señal en la región de interés fue igual en ambas imágenes (normalización).
3. La imagen alineada de FITC-dextrano se sustrajo de la imagen de fuga de fluoresceína produciendo una imagen compuesta de fluoresceína extravasada.
4. La fuga de fluoresceína fue reportada para cada ojo como la intensidad promedio de los píxeles contenidos en la región recortada de interés en la imagen teñida extravasada.

La inhibición de la fuga de fluoresceína en cada grupo se calculó frente al grupo de control negativo. El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza unidireccional con una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

La señal de fluorescencia medida es proporcional a la fuga vascular. La eficacia se define como una reducción en la intensidad de la señal de fluorescencia medida con respecto a la señal observada en animales que recibieron inyecciones de solución salina u otro control negativo (como hidrogel solo). Un valor más bajo de la señal de fluorescencia promedio corresponde a una mayor inhibición de la fuga y, por lo tanto, a una mayor eficacia.

Los datos de este estudio que se ilustran en la Figura 7A muestran una fuerte inhibición de la fuga de fluoresceína con ambas dosis (C2b1 y C2b2) del conjugado hidrogel-fármaco C2b, en comparación con el control negativo (hidrogel H1b). También se observa una inhibición fuerte similar para el control positivo (1000 µg/ojo de brolucizumab). Una dosis más baja de brolucizumab (300 µg/ojo) demostró solo un bloqueo parcial de la fuga de fluoresceína, significativamente menor que el conjugado de hidrogel-fármaco (C2b1) o la dosis 10 veces menor del conjugado de hidrogel-fármaco (C2b2).

9-2. Exposición al fármaco en el humor vítreo de conejos

Los conejos del estudio de desafío con VEGF precedente, que habían recibido C2b1 y C2b2, se usaron para evaluar los niveles finales de fármaco en el humor vítreo.

Se recogieron suero y los ojos de los conejos en los puntos terminales en el tiempo. Los ojos de los conejos fueron diseccionados para aislar el humor vítreo. Las muestras se almacenaron a -80°C antes de su posterior procesamiento o análisis. El humor vítreo se separó adicionalmente en fracciones de humor vítreo "líquido" y "gel" de la siguiente manera. El humor vítreo se descongeló y el humor vítreo en gel tipo sólido se separó físicamente del humor vítreo líquido de la muestra usando una punta de pipeta de plástico de 1000 µL. El volumen restante se consideró la fracción "líquida" del humor vítreo, cuyo análisis se ilustra en la Figura 7B.

Placas de ELISA Meso Scale Discovery (MSD) de 384 pocillos (número de catálogo L21XA-4) se recubrieron con 15 µL (1 µg/ml) de un anticuerpo monoclonal de conejo contra el ligante que se une la VH y VL de brolucizumab en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con 80 µL de TBST (solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, Tween 20 al 0,05%) y se bloquearon con 40 µL de tampón de bloqueo (BSA al 5% en PBS). El BSA fue adquirido a Millipore (número de catálogo 820452) o Roche (número de catálogo 03 116 964 001). Los tiempos de incubación para el bloqueo fueron de 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con 80 µl de TBST. Las muestras se mezclaron con diluyente (BSA al 2%, Tween-20 al 0,1%, Triton X-100 al 0,1% en solución salina tamponada con Tris, pH 7,5) y luego se incubaron alícuotas de 15 µL de las muestras en la placa ELISA MSD durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas se lavaron tres veces con TBST. Una alícuota de 15 µl (0,5 µg/ml) del anticuerpo de detección, anticuerpo monoclonal de conejo marcado con sulfo contra el ligante (SEQ ID NO:3) que se une a la VH (SEQ ID NO:2) y VL (SEQ ID NO:1) de brolucizumab, se agregó a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se conjugó una etiqueta sulfo al anticuerpo monoclonal de conejo contra el ligante que se une a la VH y VL de brolucizumab según el protocolo en el kit de marcado MSD (MSD Gold Sulfo-tag NHS-Easter Conjugation Pack 1 catálogo R31AA-1). Luego de una hora, las placas se lavaron tres veces con 80 ml de TBST. El tampón de lectura MSD T (número de catálogo MSD R92TC-2) se diluyó a una concentración de 1 × con agua, y 37,5 µL del tampón de lectura MSD 1 × T se agregaron a cada pocillo. Las placas se leyeron en

un detector Meso Scale Discovery M6000. Para cuantificar los niveles de recuperación de brolucizumab del hidrogel, se utilizó brolucizumab purificado como estándar.

Se generó una curva estándar usando brolucizumab purificado de la siguiente manera. Se generaron curvas estándar de doce puntos diluyendo 2 veces brolucizumab en diluyente ELISA, con una concentración inicial de 500 ng/ml. Se utilizó el software de análisis Meso Scale Discovery (Discovery Workbench versión 4.0) para el análisis de los datos. La señal de electroquimioluminiscencia bruta (ECL) y las concentraciones de brolucizumab se transformaron para generar una curva estándar al trazar el registro de la concentración de brolucizumab en el eje x y el registro de las unidades de ECL sin procesar en el eje y. Las concentraciones finales de brolucizumab se determinaron multiplicando los valores de brolucizumab interpolados de la curva estándar por el factor de dilución apropiado. Solo se usaron los valores de la señal ECL que estuvieron dentro del rango lineal de la curva estándar.

Los resultados en la Figura 7B muestran niveles significativamente más altos de brolucizumab en el humor vítreo líquido de conejos a los que se les administró ambas dosis de conjugado de hidrogel-fármaco C2b (C2b1 y C2b2), en comparación con el control negativo (H1b) y con ambas dosis de solución de brolucizumab. (Téngase en cuenta que a los fines gráficos, se asigna un valor de 0.1 ng/mL para las muestras con cero fármaco detectado).

9-3. Liberación in vivo de D4 del conjugado C13

Evaluación de la liberación in vivo de péptido del conjugado de hidrogel fármaco C13 en un modelo de roedor.

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con los Protocolos de Cuidado y Uso de Animales aprobados por NIBR. Se obtuvieron ratones C57BL/6 (machos, 1–11 semanas de edad) de Envigo. C13 en 1 × PBS, pH 6.5 (contenido de D4 = 10 mg/mL) se transfirió a jeringas de insulina con agujas de calibre 27. Las formulaciones se inyectaron por vía subcutánea en el punto medio dorsal de los ratones a un volumen de dosis de 5 ml/kg (50 mg/kg D4). Se dosificaron dos grupos de animales, n = 3 cada uno. Se tomaron muestras de sangre de 50 µL por transección de la cola después de la dosificación con EDTA como anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4000 × g durante 20 minutos para obtener 20 µL de sobrenadante de plasma.

La concentración de D4 en muestras de plasma se determinó por métodos de LC/MS. 150 µL de solvente de extracción (acetonitrilo: metanol: agua: ácido fórmico; 1: 1: 1: 0.003) se agregan a 20 µL de plasma y se agita en vórtex durante 30 segundos en una placa de pocillos profundos de 96 pocillos. Esto se centrifugó a 4000 × g durante 10 minutos. Se transfirió una alícuota de 150 µL de sobrenadante a una placa de pocillos profundos nueva. Se preparó una curva estándar para D4 mediante dilución en serie de D4 en plasma con EDTA de 10.000 a 0,5 ng/ml de D4 y fue co-extraído con las muestras desconocidas. Se inyectaron muestras de curva estándar y desconocidas (10 µL, automuestreador CTC PAL HTS) en una columna ACE C18 LC (30 × 2.1, 3 µm) en un HPLC Agilent 1290 con una velocidad de flujo de 700 µL/min. La columna se preequilibró con 95% de tampón A (0.1% ácido fórmico en agua), 5% de tampón B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo). D4 se eluyó mediante un gradiente de 5 a 98% de tampón B durante 1,3 minutos. El eluato se inyectó en un Sciex 6500 MS funcionando en modo ESI (450 ° C, CE = 15, DP = 50). Para la cuantificación se controló una transición m/z de 378.0 (padre) a 167.0 (hija). Se determinaron las concentraciones de D4 liberado en plasma en puntos en el tiempo hasta 7 días después de la dosificación. Como es evidente a partir de la Figura 8, se logra una exposición prolongada de D4 cuando se dosifica como un conjugado de fármaco e hidrogel, ejemplificado mediante el uso del ligante que no deja huellas L8 descripto en la presente.

Ejemplo 10

Tolerabilidad tisular comparativa de hidrogeles

Este estudio examinó la capacidad de los ratones C57BL/6 de generar una respuesta inmune granulomatosa cuando se les administraron inyecciones subcutáneas únicas de varios hidrogeles y se examinaron 7 días después. Los productos probados fueron H9 (partículas de hidrogel a base de ácido hialurónico reticuladas por reacción entre ácido hialurónico funcionalizado con tiol y PEG funcionalizado con acrilato), H1f (partículas de hidrogel a base de ácido hialurónico reticuladas por reacción entre ácido hialurónico funcionalizado con azida y PEG modificado con alquino) y solución inyectable a base de ácido hialurónico Synvisc-One® para el tratamiento del dolor de rodilla por osteoartritis (Sanofi).

Preparación de H9

Un ácido hialurónico funcionalizado con tiol **GLYCOSIL™** (comercializado por EsiBio, Alameda, CA) se utilizó para preparar **H9**.

En base a las referencias publicadas (Shu, X.Z. *et al.*, *J Biomed Mater Res A*, 2006, **79**(4):902-12; Shu, X.Z., *et al.*, *Biomaterials*, 2004, **25:**1339-1348), se entiende que GLYCOSIL™ es un polímero de ácido hialurónico funcionalizado con tiol con un peso molecular de 158-187 kDa y 42-45% de funcionalización con el resto que contiene tiol. Para calcular la concentración de grupos reactivos en la reacción de gelificación, se supuso que el grado de sustitución era del 45%. El peso molecular de la unidad repetitiva de dímero de sal de sodio de carboxilato no sustituido es 401.3 Da. El peso molecular de la unidad repetitiva de dímero tiolada con la estructura representada en las publicaciones es 481.5 Da. El MW promedio de unidad de dímero para la forma de sal de sodio de **GLYCOSIL™** con un grado de sustitución supuesto de 45% es de 437.5 Da = ((401.3 × 0.55) + (481.5 × 0.45)).

GLYCOSIL™ (10 mg, 22.9 µmol) fue disuelto en 1 mL de 1XPBS, pH 7.4 a temperatura ambiente durante 40 minutos en el vial de la muestra original. Usando el peso molecular promedio de una unidad de dímero de sal de sodio, el total de moles de la unidad repetitiva de dímero se calculó en 22.9 µmol y el número de moles de la unidad repetitiva de dímero tiolada fue de 10.3 µmol. A esta solución se agregó 1X PBS (0.775

mL) y 100 mg/mL (en PBS) de una solución de polietilen glicol diacrilato, 5kDa (0.125 mL, 12.5 mg, 0.0025 mmol de reactivo, 0.005 mmol de funcionalidad del reactivo, Creative PEGworks. La solución resultante tenía una concentración de 5.3 mg/mL con respecto a **GLYCOSIL™** y 22% de las unidades repetitivas de **GLYCOSIL™** fueron reticuladas por el polietilen glicol diacrilato, 5kDa ((0.005 mmol [polietilen glicol diacrilato, 5kDa funcionalidad del reactivo]/0.0229 mmol [HA-unidades]) × 100 = 22 %).

La mezcla se sometió a vórtice brevemente para mezclar y se transfirió a una jeringa de 3 ml, que se tapó y mantuvo una temperatura ambiente durante la noche para proporcionar H9. La inspección visual (prueba de inversión) mostró una gelificación exitosa.

Las partículas de hidrogel a base de ácido hialurónico de H9 se prepararon según lo descripto para H1a, excepto que un volumen igual de PBS se agregó a las partículas después de la primera extrusión. Esto dio como resultado una suspensión de partículas de hidrogel que fue de 2,65 mg/ml con respecto a GLYCOSIL™. Las partículas de hidrogel de H9 fueron distribuidas para la dosificación en jeringas de insulina de 0,5 ml con agujas 30G retirando el émbolo y rellenando con el volumen deseado de H9. Se eliminaron las burbujas de aire mediante una suave manipulación de la jeringa.

Preparación de H1f

Se prepararon partículas de hidrogel a base de ácido hialurónico de H1f según lo descripto para H1a, donde la mitad del PBS se agregó a las partículas después de la primera extrusión. Esto dio como resultado una suspensión de partículas de hidrogel que de 6,7 mg/ml con respecto a [HA-N3] -23% b. Las partículas de hidrogel de H1f fueron distribuidas para la dosificación en jeringas de insulina de 0,5 ml con agujas 30G retirando el émbolo y rellenando con el volumen deseado de H1f. Se eliminaron las burbujas de aire mediante una suave manipulación de la jeringa.

Synvisc-One®

Synvisc-One® fue adquirido y usado tal como fuera recibido.

Implantación subcutánea

Ratones macho C57BL/6 (5 por producto de prueba) recibieron 60 µL de producto de prueba mediante inyección subcutánea (región interescapular) (Tabla 26). Otros 5 ratones ingenuos sirvieron como controles. Se obtuvieron observaciones en vida dos veces el día de la dosificación (antes de la dosis y aproximadamente 4 horas después de la dosis), y al menos una vez al día a partir de entonces hasta la necropsia. Se tomaron los pesos corporales dos veces por semana.

Tabla 26 Diseño del estudio, asignación de animales y dosis de los productos de prueba.

Grupo	Número	Tratamiento	Volumen de dosis (µl)
1	5	Control no inyectado	-
2	5	**H9**	60 µl
3	5	Synvisc-One®	60 µl
4	5	**H1f**	60 µl

Luego de 7 días, los animales fueron sacrificados con CO_2 como la primera forma de eutanasia y se realizó una toracotomía como la segunda forma de eutanasia. La necropsia se realizó mientras se registraban las anormalidades macroscópicas. Se recogieron muestras representativas de los tejidos del protocolo de todos los animales. La fijación y el almacenamiento de las muestras se realizó en formol tamponado neutro al 10%. Los tejidos especificados se procesaron en bloques de parafina y, posteriormente, en secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina para los animales en el control y todos los animales dosificados sobrevivientes.

Observaciones clínicas:

Los sitios de inyección se palparon diariamente y se registraron las observaciones. Todos los ratones que recibieron partículas de hidrogel H9, Synvisc-One® y partículas de hidrogel H1f desarrollaron bultos en el tejido subcutáneo de los sitios de inyección al momento de la inyección. Los ratones que recibieron Synvisc-One® y las partículas de hidrogel H1f experimentaron bultos que retrocedieron al día 4, mientras que todos los ratones que recibieron partículas de hidrogel H9 aún conservaron bultos duros al día 8.

Se observaron costras en la piel sobre los bultos en dos animales que recibieron H9 a partir del día 4 y se observaron hasta el día 6. No hubo otras observaciones clínicas notables. Los pesos corporales no difirieron significativamente entre los grupos.

Observaciones microscópicas

Todos los ratones que recibieron con partículas de hidrogel H9 tenían un granuloma focalmente extenso marcado en el tejido subcutáneo del sitio de inyección. El granuloma se caracterizó por una masa subcutánea bien circunscrita de aproximadamente 4 mm que contenía un núcleo de material hialino mezclado con restos granulares eosinofílicos y neutrófilos degenerados, rodeados por un borde denso de abundantes neutrófilos, conteniendo a su vez una capa de macrófagos y fibroblastos.

Los ratones que recibieron Synvisc-One® o las partículas de hidrogel H1f tenían células mixtas focales mínimas a leves y/o quistes pequeños de pared delgada en el tejido subcutáneo de los sitios de inyección (Tabla 27).

Tabla 27. Incidencia y gravedad de los cambios histopatológicos relacionados con el producto de prueba

Tejido: Descubrimiento				
	1	**2**	**3**	**4**
Número examinado:	5	5	5	5
Piel: quiste/s				
Mínimo	**0**	0	1	0
Moderado	0	0	1	0
Piel: Granuloma				
Marcado	0	5	0	0
Piel: Infiltración				
Mínimo	0	0	4	3
Moderado	0	0	0	0

Conclusiones

Los descubrimientos microscópicos en ratones que reciben inyecciones subcutáneas de hidrogeles a base de ácido hialurónico difieren según la composición del

hidrogel dosificado. Los ratones que recibieron Synvisc-One® o H1f experimentaron ya sea una ausencia de hallazgos microscópicos o infiltrados focales de células mixtas y/o quistes pequeños de pared delgada en el tejido subcutáneo de los sitios de inyección, mientras que H9 provocó una marcada respuesta inmune granulomatosa.

FIGURA 1

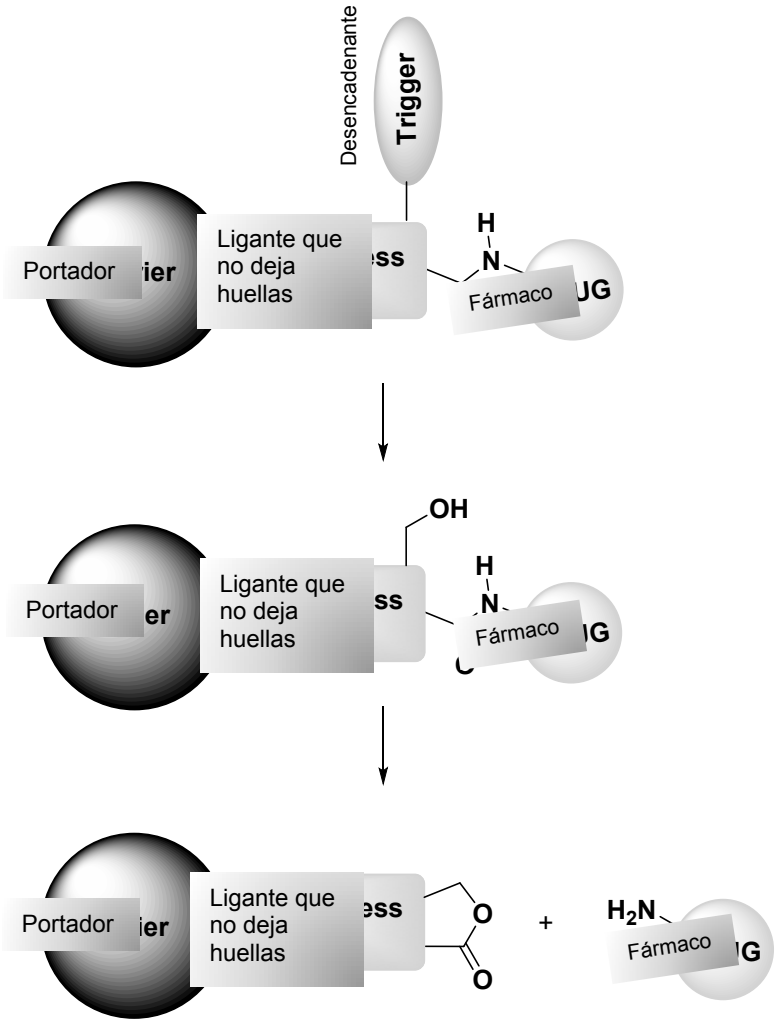

Desencadenante
Trigger
Portador
Ligante que no deja huellas
Fármaco
OH
Portador
Ligante que no deja huellas
Fármaco
Portador
Ligante que no deja huellas
O
O
+
H_2N
Fármaco

FIGURA 2

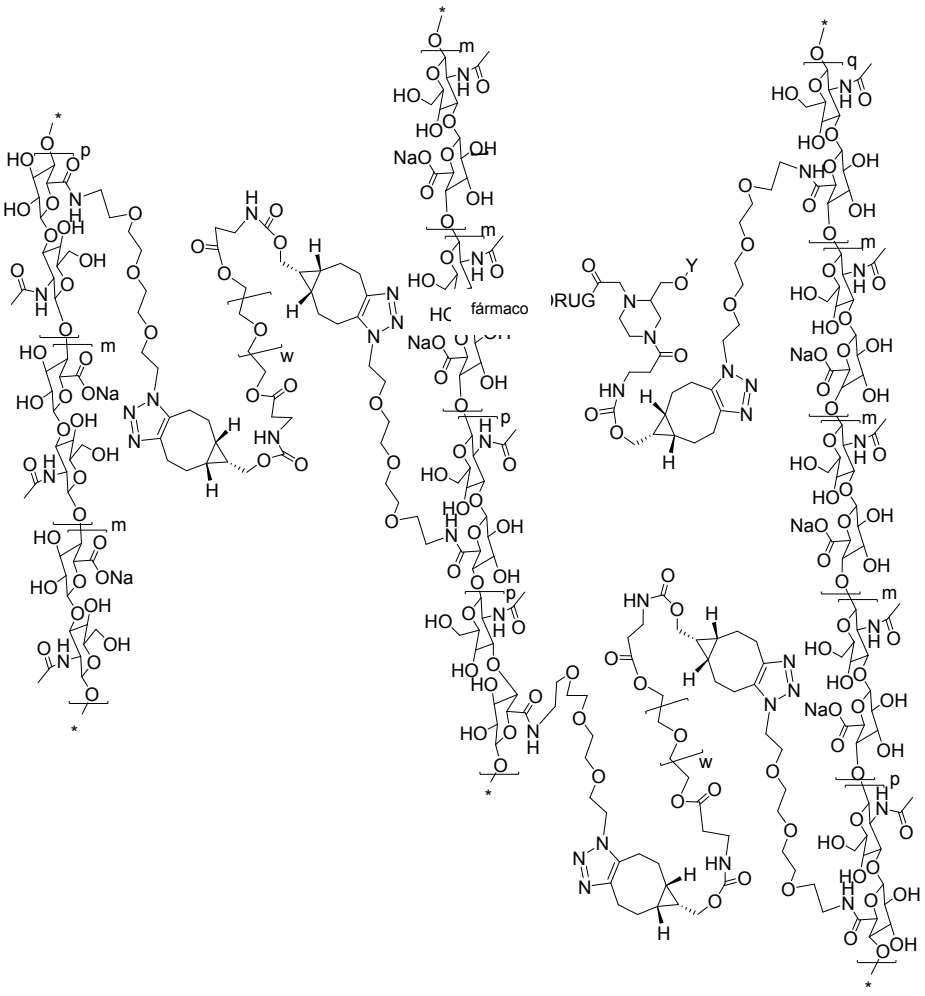
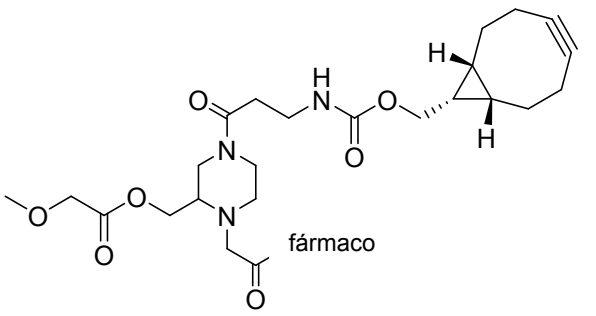
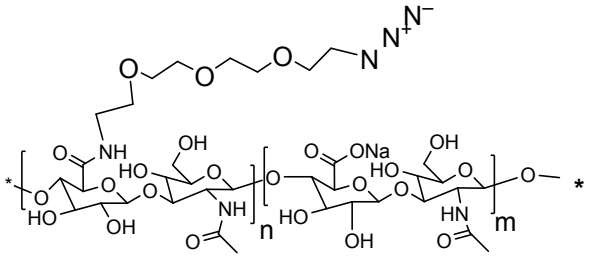


FIGURA 3A



+



Ácido hialurónico funcionalizado
Polímero soluble

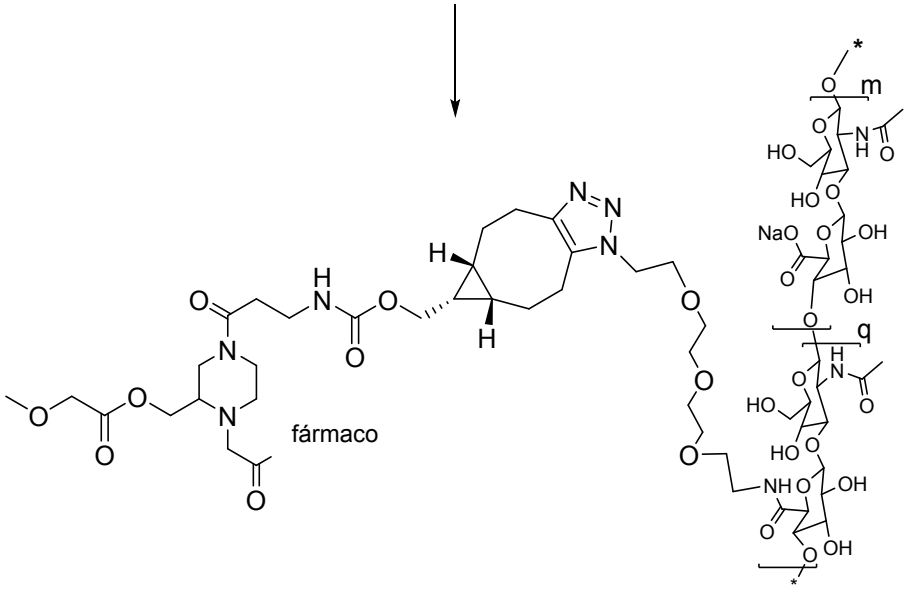


FIGURA 3B

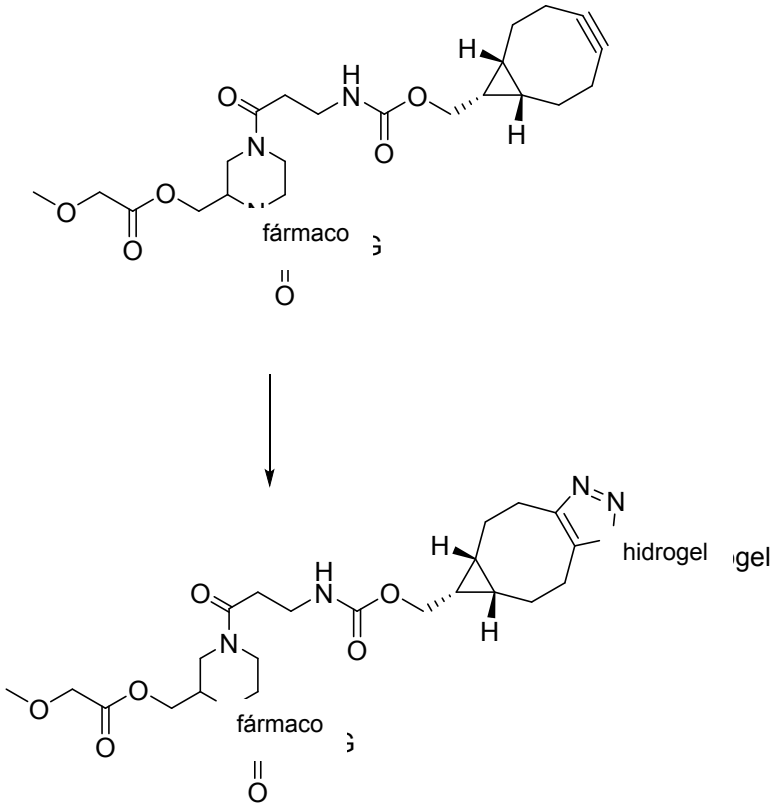


FIGURA 4A

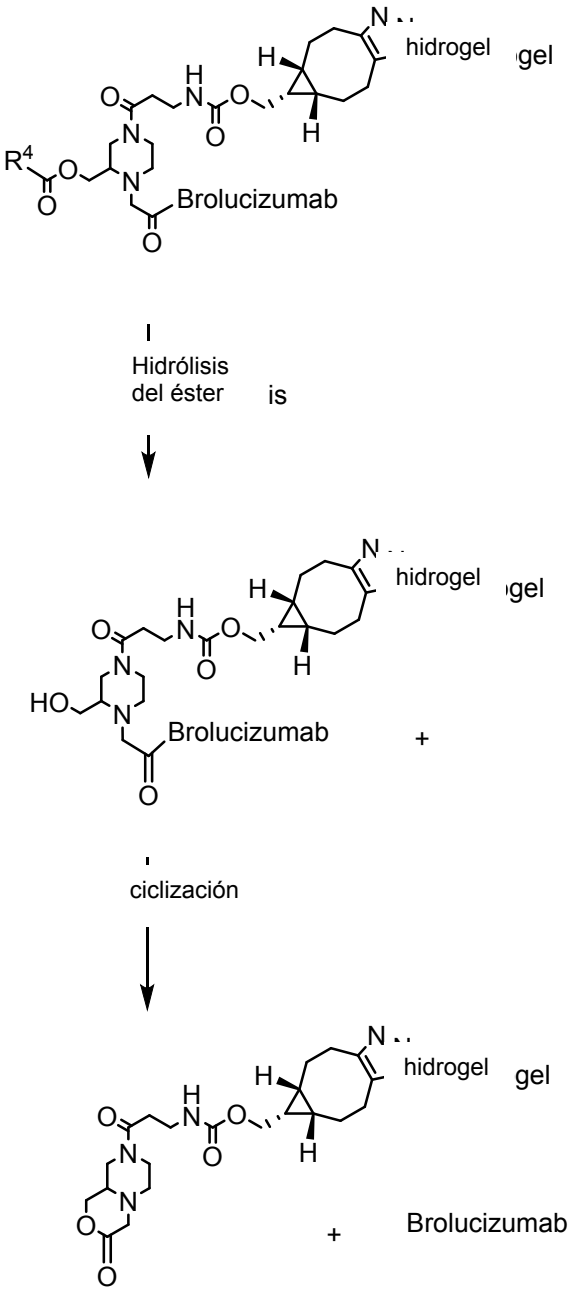

hidrogel
Brolucizumab
Hidrólisis del éster
hidrogel
Brolucizumab
+
ciclización
hidrogel
Brolucizumab

FIGURA 4B

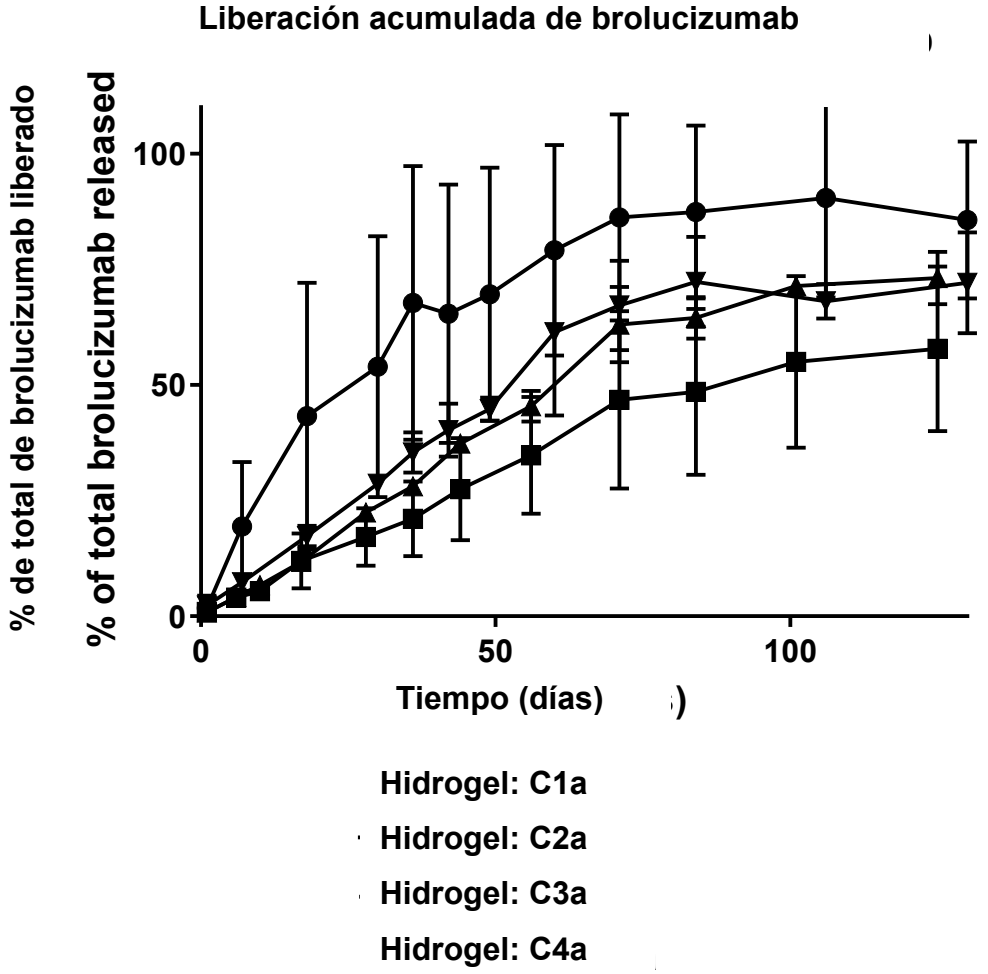

Liberación acumulada de brolucizumab
% de total de brolucizumab liberado
% of total brolucizumab released
100
50
0
0
50
100
Tiempo (días)
Hidrogel: C1a
Hidrogel: C2a
Hidrogel: C3a
Hidrogel: C4a

FIGURA 5A

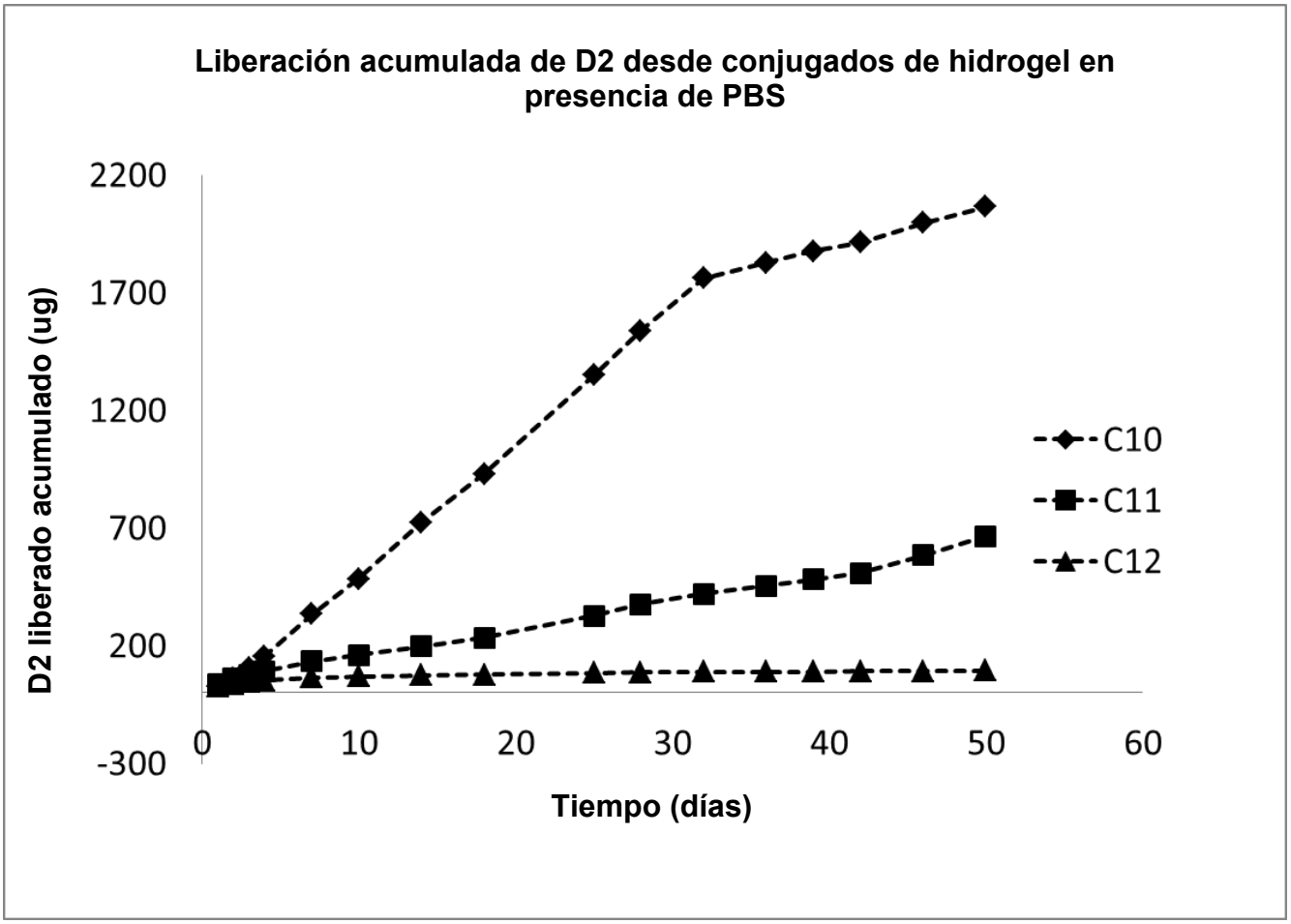

Liberación acumulada de D2 desde conjugados de hidrogel en presencia de PBS
D2 liberado acumulado (ug)
2200
1700
1200
700
200
-300
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo (días)
C10
C11
C12

FIGURA 5B

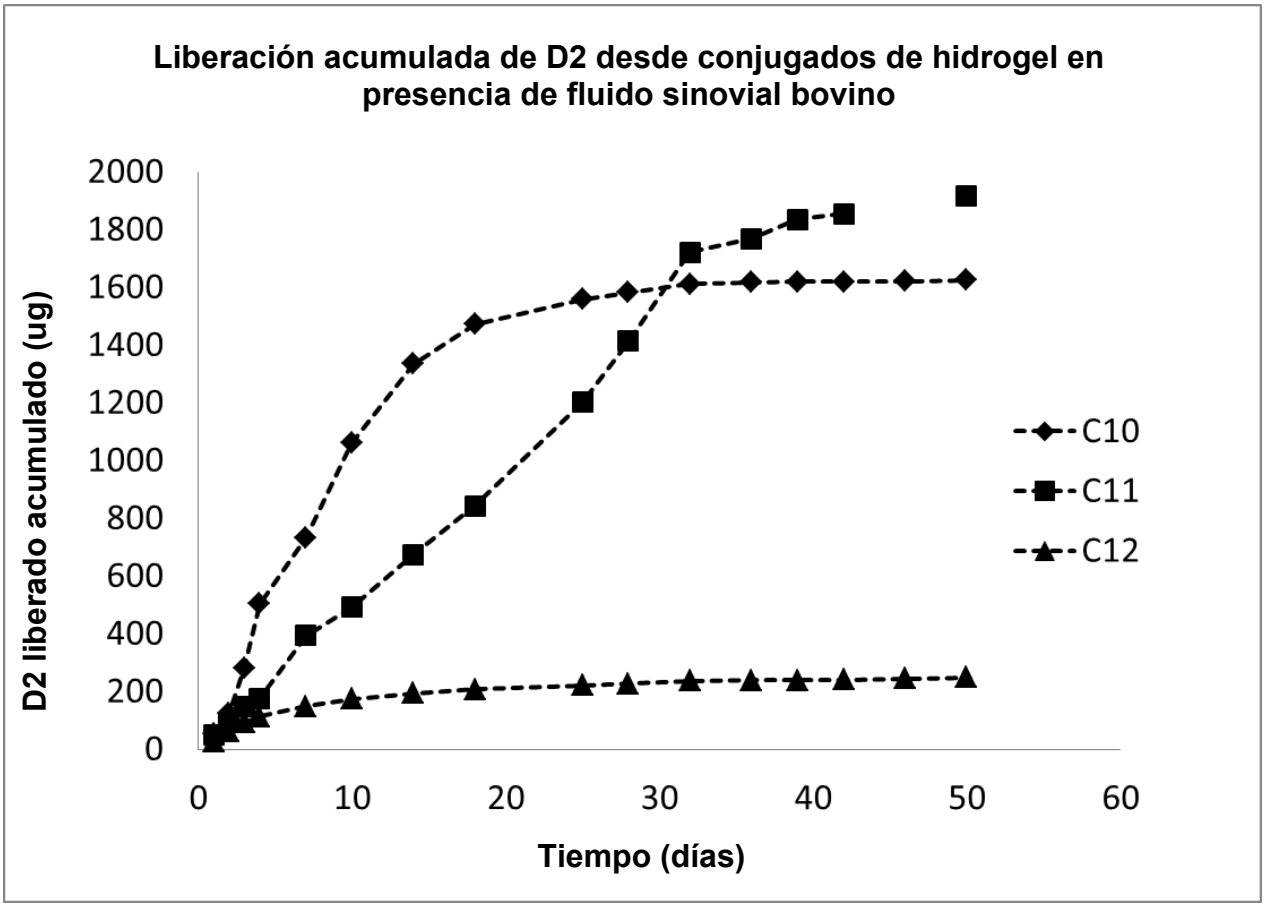
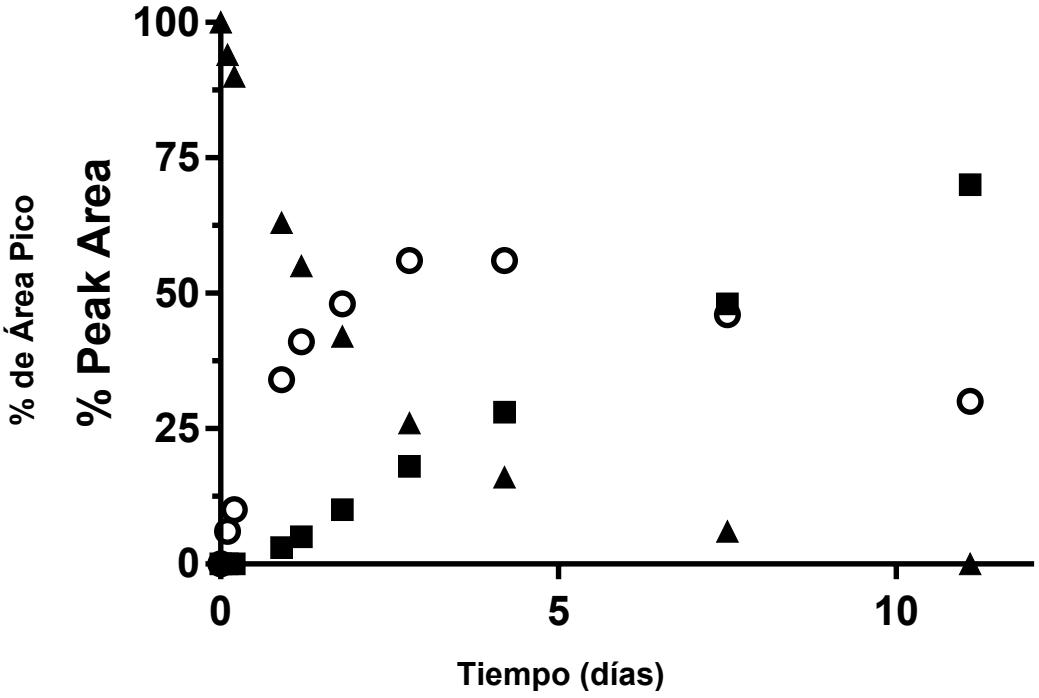

Liberación acumulada de D2 desde conjugados de hidrogel en presencia de fluido sinovial bovino
D2 liberado acumulado (ug)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo (días)
C10
C11
C12

FIGURA 6


% de Área Pico
% Peak Area
100
75
50
25
0
0
5
10
Tiempo (días)
% de Parental en Área Pico
% de Intermedio en Área Pico
% de Fármaco en Área Pico

ea

FIGURA 7A

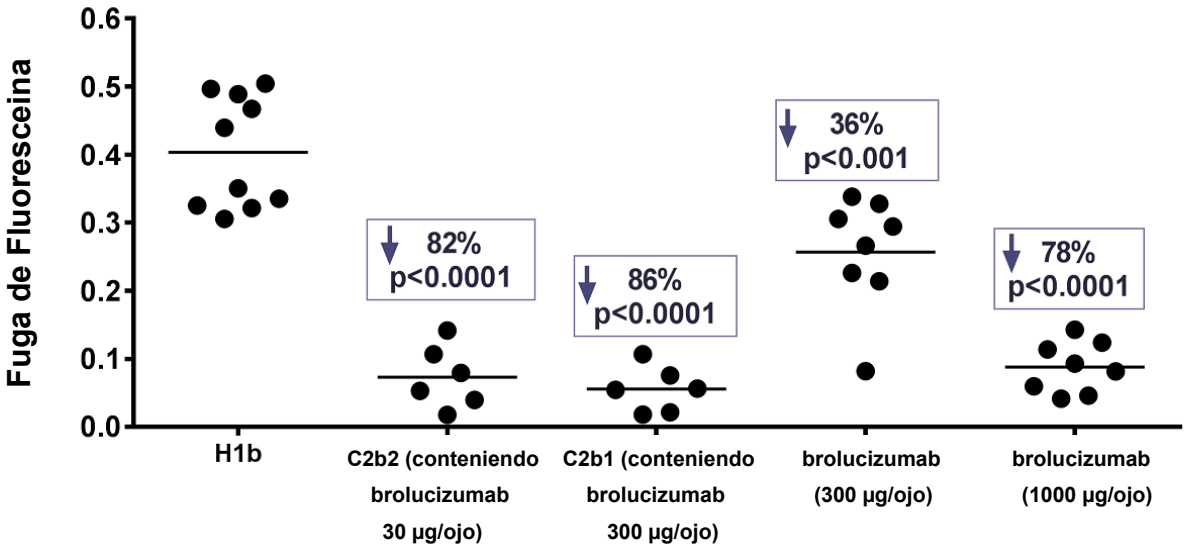

Fuga de Fluoresceina
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
82%
p<0.0001
86%
p<0.0001
36%
p<0.001
78%
p<0.0001
H1b
C2b2 (conteniendo brolucizumab 30 µg/ojo)
C2b1 (conteniendo brolucizumab 300 µg/ojo)
brolucizumab (300 µg/ojo)
brolucizumab (1000 µg/ojo)

FIGURA 7B

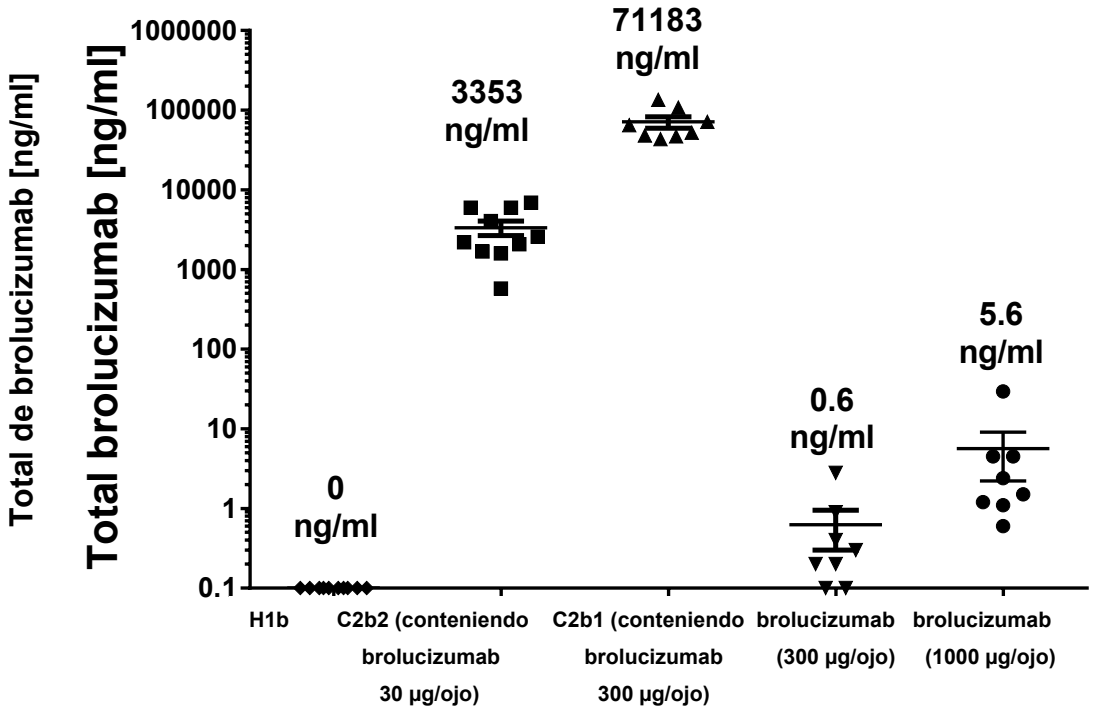

Total de brolucizumab [ng/ml]
Total brolucizumab [ng/ml]
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0 ng/ml
3353 ng/ml
71183 ng/ml
0.6 ng/ml
5.6 ng/ml
H1b
C2b2 (conteniendo brolucizumab 30 µg/ojo)
C2b1 (conteniendo brolucizumab 300 µg/ojo)
brolucizumab (300 µg/ojo)
brolucizumab (1000 µg/ojo)

FIGURA 8

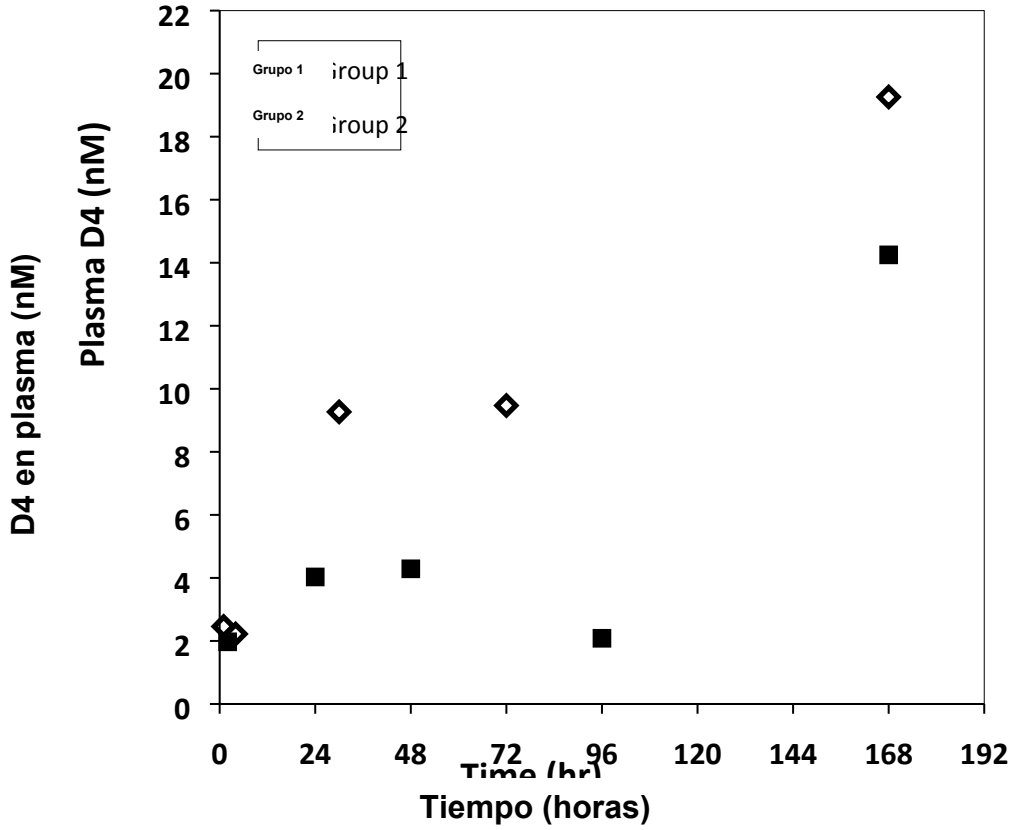
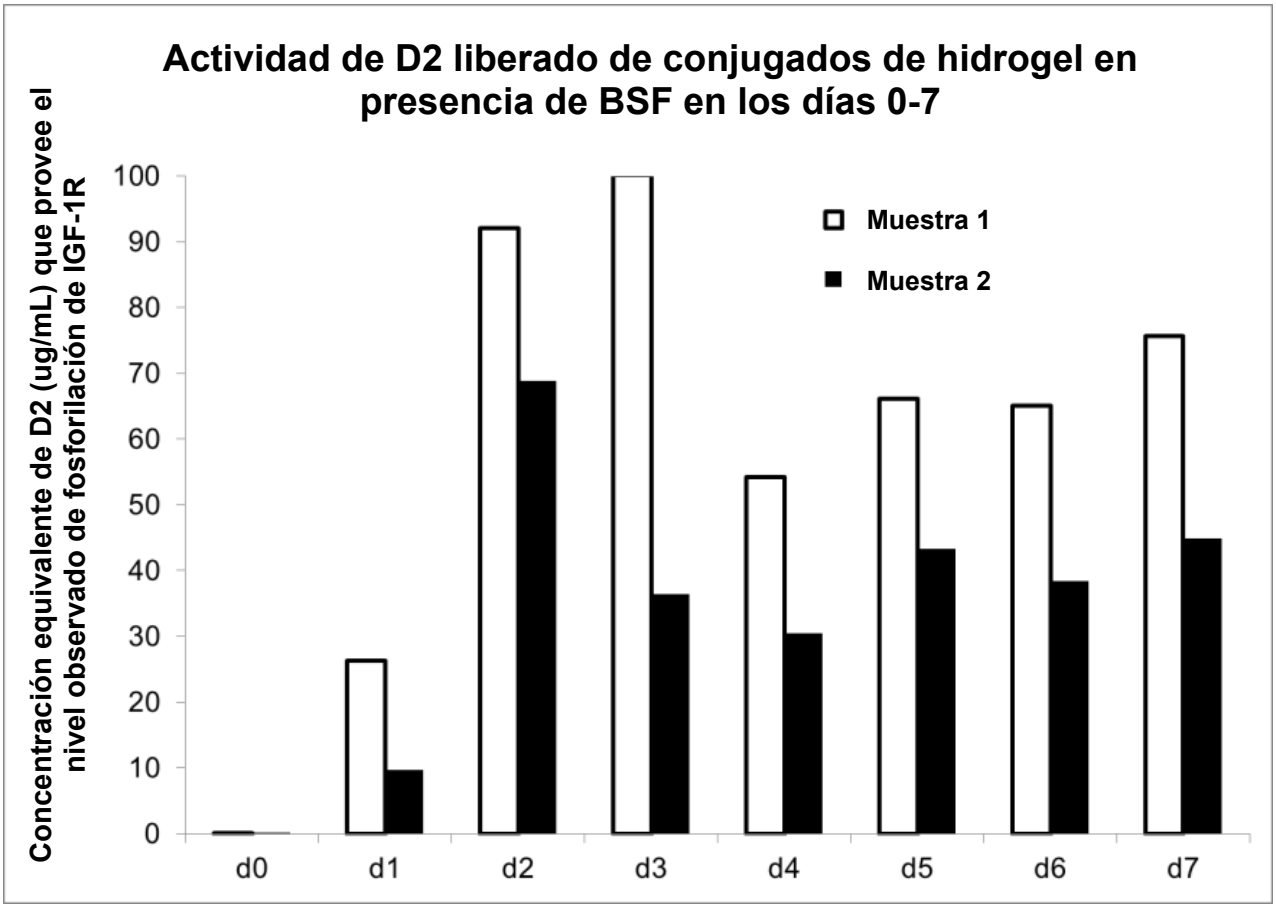

D4 en plasma (nM)
Plasma D4 (nM)
Grupo 1
Grupo 2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
0
24
48
72
96
120
144
168
192
Tiempo (horas)

FIGURA 9


Actividad de D2 liberado de conjugados de hidrogel en presencia de BSF en los días 0-7
Concentración equivalente de D2 (ug/mL) que provee el nivel observado de fosforilación de IGF-1R
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
d0
d1
d2
d3
d4
d5
d6
d7
Muestra 1
Muestra 2