



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 987**

51 Int. Cl.:  
**C08G 81/00** (2006.01)  
**A61K 31/706** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07830599 .2**  
96 Fecha de presentación : **19.10.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2077293**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **Copolímero de bloques para conjugados de fármaco y sus composiciones farmacéuticas.**

30 Prioridad: **19.10.2006 JP 2006-285469**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.09.2011**

73 Titular/es: **NANOCARRIER Co., Ltd.**  
**4-19, Kashiwanoha 5-chome**  
**Kashiwa-shi, Chiba 277-0882, JP**

72 Inventor/es: **Bobbe, Iulian;**  
**Shibata, Naoya;**  
**Saito, Hiroyuki y**  
**Harada, Mitsunori**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 987 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Copolímero de bloques para conjugados de fármaco y sus composiciones farmacéuticas

**Campo técnico**

5 La presente invención proporciona un copolímero de bloques para un conjugado farmacéutico que permite una excelente retención del conjugado en la sangre.

**Técnica anterior**

10 Cuando se administra un fármaco por vía sistémica a un individuo por vía oral o por inyección intravenosa o similar pueden reconocerse efectos secundarios en tejidos normales distintos a los de las lesiones localizadas a las que se dirige, lo cual puede forzar la modificación y/o suspensión de la pauta de tratamiento terapéutico. Además, para algunos fármacos, puede resultar difícil mantener la concentración efectiva de fármaco, o algunos pueden metabolizarse antes de ser liberados en el sitio diana.

15 Con el fin de resolver estos problemas, la investigación activa está en la actualidad se centra en tecnologías que introducirán procedimientos y conceptos farmacéuticos avanzados en los que el control de la farmacocinética o la liberación selectiva de un fármaco en el cuerpo conduzca a un patrón de concentración/tiempo del fármaco deseado en el sitio de acción de interés con el fin de optimizar el efecto terapéutico. A estas tecnologías y conceptos se hace referencia como Sistema de Liberación de Fármaco (DSS) (del inglés Drug Delivery System) y en los últimos años se ha reconocido un importante crecimiento en estos que permita la liberación más segura y más eficaz de fármacos contra el cáncer, ADN, péptidos y similares, en lesiones patológicas tales como los sitios tumorales y los sitios inflamatorios.

20 Como medio específico de los DDS, se ha desarrollado un procedimiento que emplea liposomas, emulsiones o nanopartículas como vehículos para el fármaco, un procedimiento en el que los fármacos se incorporan en vehículos poliméricos tales como micelas poliméricas, un procedimiento en el que los fármacos están unidos covalentemente a polímeros sintéticos o a polisacáridos de origen natural y similares. En los intentos de llevar estos sistemas al uso práctico, hay diversos problemas que solucionar y, entre ellos, la forma de evitar el mecanismo biológico de reconocimiento de objetos extraños, la contención de un fármaco a una alta concentración en un vehículo para el fármaco en el DDS y el control de la velocidad de liberación de un fármaco son importantes retos planteados.

30 En lo que se refiere a la forma de evitar el mecanismo biológico de reconocimiento de objetos extraños, está siendo posible evitar la captura en el sistema reticuloendotelial (RES) del hígado, el bazo, etc., potenciando la estabilidad del fármaco en la sangre mediante revestimiento de la superficie de un vehículo farmacéutico tal como liposomas con un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol, evitando de este modo la adhesión de proteínas séricas, proteínas opsonina y similares. Como resultado, se puede obtener la elevada retención de liposomas y micelas poliméricas en la circulación sanguínea después de la administración intravenosa y estos se han acumulado de forma pasiva en tejidos tales como los tejidos tumorales y los sitios inflamatorios en los que se ha potenciado la permeabilidad vascular, conduciendo de este modo a un tratamiento eficaz.

35 Por otro lado, con referencia al contenido de un fármaco en vehículos para fármacos en DDS, un elevado contenido en fármaco puede reducir la cantidad de vehículo requerido para liberar el fármaco deseado, lo que es ventajoso tanto en términos terapéuticos como de diseño del fármaco [J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002)]. No obstante, con respecto a los liposomas y micelas poliméricas, el contenido de fármacos está limitado debido a una baja estabilidad de los mismos, y con respecto a los tipos de polímeros conjugados, aumentos en el contenido de fármaco pueden afectar a las proteínas de los polímeros solubles en agua, reduciendo de este modo la solubilidad en agua. Como resultado, su interacción con componentes plasmáticos ya no puede ser controlada, la retención del conjugado en la circulación sanguínea se vuelve imposible y, en la mayoría de los casos el contenido de fármaco en la misma es de tan solo varios puntos porcentuales [CRIPS 5(2): 2-8 (2004)]. Así, es imposible en la actualidad obtener un elevado contenido de fármaco y una excelente retención en la sangre al mismo tiempo.

45 Por ejemplo, la publicación de patente japonesa sin examinar (Kokai) N° 2003-34653 divulga un compuesto para DDS que se ha optimizado y cuyo campo terapéutico se ha ampliado sustancialmente por un medio específico para optimizar DDS, y describe que se pueden generar compuestos para DDS que hacen uso de características de cada fármaco contra el cáncer seleccionando la secuencia de un engarce peptídico para conjugar el fármaco y un vehículo y la estructura del vehículo. No obstante, el contenido de fármacos contra el cáncer es tan solo de aproximadamente 1 a 10% respecto al peso total del compuesto para DDS.

Con respecto a la liberación de un fármaco, un sistema ideal en términos de efectos secundarios reducidos y efectos terapéuticos potenciados es uno tal que el fármaco esté encapsulado de forma estable en el vehículo, o unido al vehículo y, después de alcanzar el tejido lesionado, el fármaco se libere rápidamente.

55 Por ejemplo, la patente japonesa n° 3270592, la publicación de patente japonesa sin examinar (Kokai) n° 7-69900 y el documento WO97/12895 divulgan preparaciones farmacéuticas de copolímero de bloques-fármaco anticanceroso de antraciclina. El fármaco se ha encapsulado por unión fisicoquímica o un enlace amida utilizando el grupo

aminoácido del fármaco y el grupo carboxílico del copolímero de bloques. Así, el fármaco se ha unido al vehículo y se ha estabilizado, pero apenas es factible que se libere rápidamente después de llegar al tejido patológico.

5 Con el fin de alcanzar un elevado control de liberación del fármaco, están siendo investigados diversos vehículos que son sensibles al entorno, es decir, vehículos farmacéuticos cuyas propiedades cambian como respuesta a cambios en el entorno que se producen a causa de enfermedades, o a diferencias en el entorno del tejido normal y las lesiones localizadas.

10 Por ejemplo, se ha descrito copolímero de HPMA-doxorrubicina (PK1) en el que la doxorrubicina se ha unido a un polímero de HPMA con un peso molecular de aproximadamente 30.000 dalton por medio de un separador GFLG. En PK1, el fármaco se libera por captepsina B que está más expresada en sitios tumorales, y el contenido de fármaco es 8,5%, es decir, no se ha conseguido un alto contenido en fármaco.

Por otro lado, se están llevando a cabo investigaciones para conseguir la liberación de fármacos como respuesta a cambios en el entorno debidos a cambios en el pH en lesiones patológicas tales como sitios tumorales y sitios inflamatorios utilizando el hecho de que el pH local en estas regiones afectadas es menor que en los tejidos normales [Adv. Drug Delivery Rev. 56: 1023-1050 (2004), Biochim. Biophys. Acta. 1329(2): 291-301 (1997)].

15 Se ha descrito un conjugado sensible al entorno de pH bajo intracelular [J. Controlled Release 87: 33-47 (2003)] y micelas poliméricas [Bioconjugate Chem. 16: 122-130 (2005); Angew. Chem. Int. Ed. 42:4640-4643 (2003)] que liberan hidrocloreto de doxorrubicina de forma precisa como respuesta a un entorno de pH bajo en el endosoma después de que se haya incorporado el fármaco en células cancerosas individuales en tumores localizados a través de la vía de la endocitosis. Para estas micelas poliméricas, se han obtenido de forma específica, la dependencia del pH de la liberación del fármaco y un contenido de fármaco relativamente alto.

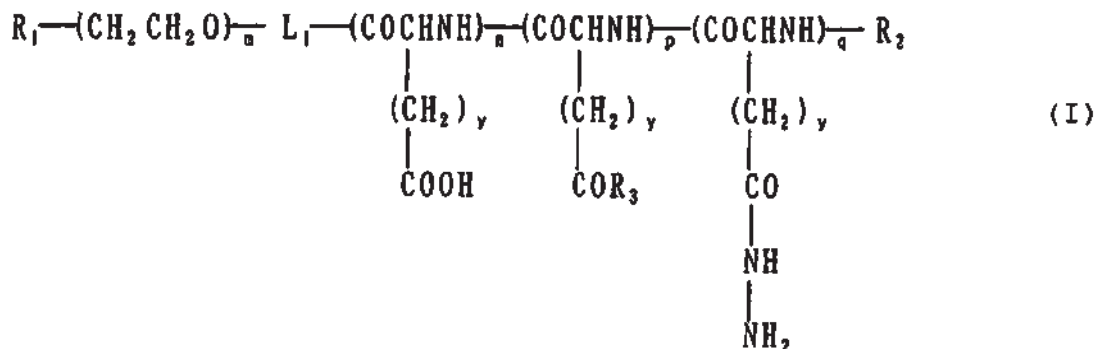
Los autores de la presente invención han encontrado, no obstante, que el aumento en la cantidad de fármaco en dichas micelas poliméricas conduce a una reducida retención del fármaco en sangre y, por ello, después de una intensa y amplia investigación, los autores de la presente invención han conseguido un elevado contenido de fármaco y han logrado con éxito potenciar la retención en la sangre.

25 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un copolímero de bloques para un conjugado de fármaco que puede resolver los problemas anteriores. El conjugado de dicho copolímero de bloques y un fármaco permite una excelente retención en la sangre cuando se compara con el compuesto principal no conjugado y, por tanto, puede aumentar las aplicaciones terapéuticas.

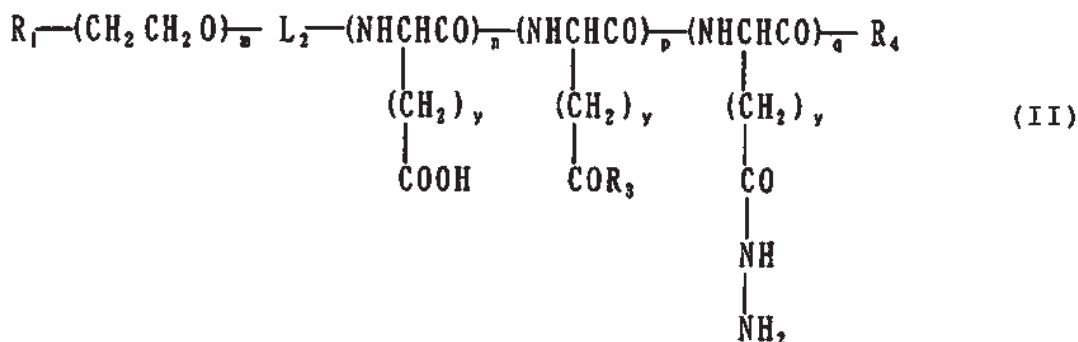
30 La presente invención comprende las siguientes realizaciones:

[1] Un copolímero de bloques para un conjugado de fármaco, comprendiendo dicho copolímero una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido que tiene un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo en la cadena lateral, comprendiendo el copolímero de bloques la siguiente estructura:



35

o



en la que

5 R<sub>1</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

R<sub>3</sub> representa -O-R<sub>5</sub> o -NH-R<sub>5</sub> en el que R<sub>5</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo,

10 y R<sub>4</sub> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquilo,

L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> independientemente uno de otro representan un enlazador,

m representa un número entero de 5-1000,

n representa un número entero de 0-1000,

15 p representa un número entero de 1-1000, y

q representa un número entero de 1-1000,

20 con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y

y representa un número entero de 1 ó 2.

25 [2] El copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con [1] en el que las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyen 25% o más hasta 75% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques.

30 [3] El copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con [2] en el que R<sub>5</sub> es un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo C<sub>4</sub>-fenilo y un grupo alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>.

[4] Un copolímero de bloques conjugado a un fármaco en el que un fármaco que tiene una estructura cetónica se ha unido al grupo hidrazida del copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con cualquiera de [1] a [3].

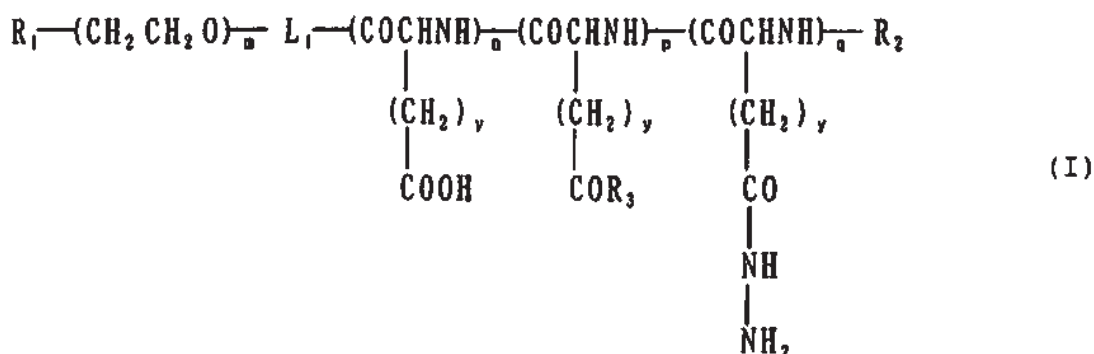
35 [5] El copolímero de bloques conjugado a un fármaco de acuerdo con [4] en el que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.

[6] El copolímero de bloques conjugado a un fármaco de acuerdo con [5] en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 50% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.

[6] El copolímero de bloques conjugado a un fármaco de acuerdo con [5] en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 40% o menos de la unidades totales de los poliaminoácidos.

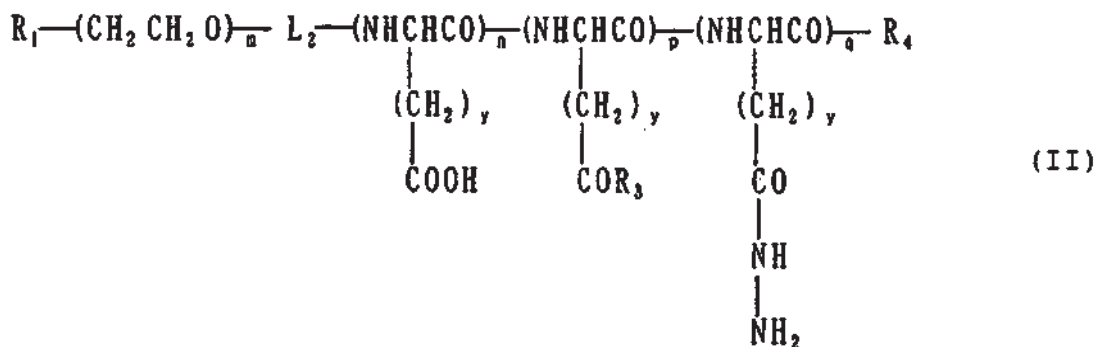
5 [8] El copolímero de bloques conjugado a un fármaco de acuerdo con [7] en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de doxorubicina, hidrocloreuro de daunorubicina, hidrocloreuro de epirubicina, pirarrubicina, hidrocloreuro de idarrubicina, hidrocloreuro de amrubicina, nemorubicina y PNU-159682.

10 [9] Una composición farmacéutica de micelas poliméricas que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol como cubierta externa y una región hidrófoba global que consiste en poliaminoácidos y/o derivados de los mismos como cubierta interna, teniendo dicha región hidrófoba global un fármaco unido a un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo, en el que dicho fármaco unido a un grupo hidrazida y el grupo hidrófobo pueden estar presentes en la región hidrófoba global en el mismo copolímero de bloques, o en la región hidrófoba global en un copolímero de bloques distinto, estando unido el fármaco al grupo hidrazida en el copolímero de bloques de la fórmula siguiente:



15

o



en la que

20  $R_1$ , que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo  $C_{1-12}$  lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

$R_2$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático  $C_{1-30}$  saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

25  $R_3$  representa  $-O-R_5$  o  $-NH-R_5$  en el que  $R_5$ , que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo,

$R_4$  representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático  $C_{1-30}$  saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquilo,

$L_1$  y  $L_2$  independientemente un de otro representan un enlazador,

$m$  representa un número entero de 5-1000,

n representa un número entero de 0-1000,

p representa un número entero de 1-1000, y

q representa un número entero de 1-1000,

5 con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y

10 y representa un número entero de 1 ó 2.

[10] La composición farmacéutica de acuerdo con [9] en la que las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyen 25% o más hasta 75% o menos de las unidades totales de poliaminoácidos en el copolímero de bloques.

15 [11] La composición farmacéutica de acuerdo con [9] en la que R<sub>5</sub> es un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo C<sub>4</sub>-fenilo y un grupo alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>.

[12] La composición farmacéutica de acuerdo con [9] en la que un fármaco que tiene una estructura cetónica se ha unido al grupo hidrazida del copolímero de bloques anterior.

20 [13] La composición farmacéutica de acuerdo con [12] en la que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.

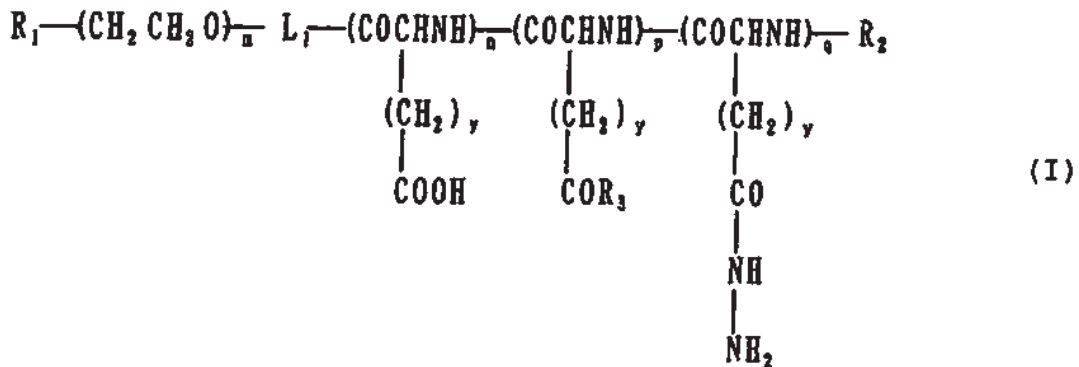
[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [13] en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 50% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.

[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [14] en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 40% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.

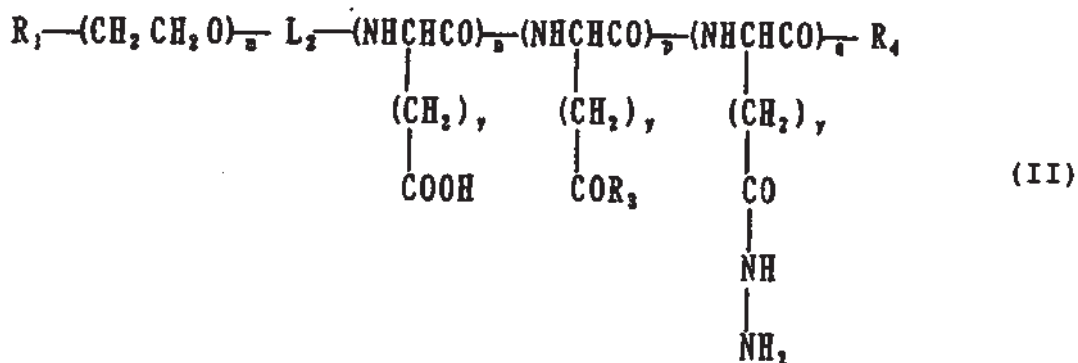
25 [16] La composición farmacéutica de acuerdo con [15] en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de doxorubicina, hidrocloreuro de daunorrubicina, hidrocloreuro de epirubicina, pirarrubicina, hidrocloreuro de idarrubicina, hidrocloreuro de amrubicina, nemorrubicina y PNU-159682.

[17] La composición farmacéutica que comprende:

30 (1) un copolímero de bloques en el que el fármaco está unido al grupo hidrazida de la fórmula siguiente:



o



en la que

R<sub>1</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

R<sub>3</sub> representa -O-R<sub>5</sub> o -NH-R<sub>5</sub> en el que R<sub>5</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo, y R<sub>4</sub> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquilo,

L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> independientemente un de otro representan un enlazador,

m representa un número entero de 5-1000,

n representa un número entero de 0-1000,

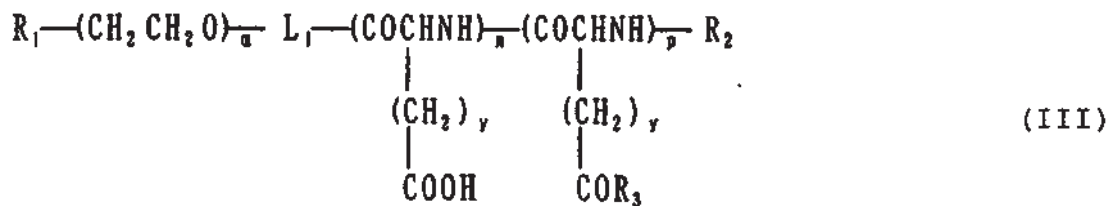
p representa un número entero de 1-1000,

q representa un número entero de 1-1000, y

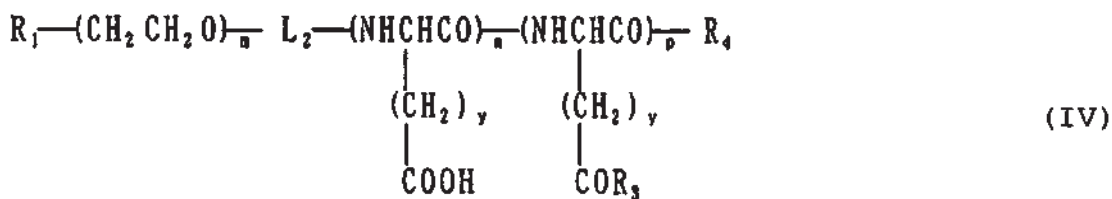
y representa un número entero de 1 ó 2,

y

(2) el siguiente copolímero de bloques:



o



en el que

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, m, n, p e y son como se definen en las fórmulas (I) y (II), con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan de 50% a 100% de las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral más las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda región de poliaminoácido o en los bloques.

[18] La composición farmacéutica de acuerdo con [17] en la que el fármaco tiene una estructura cetónica.

[19] La composición farmacéutica de acuerdo con [18] en la que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.

[20] La composición farmacéutica de acuerdo con [19] en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de doxorubicina, hidrocloreto de daunorrubicina, hidrocloreto de epirubicina, pirarrubicina, hidrocloreto de idarrubicina, hidrocloreto de amrubicina, nemorrubicina y PNU-159682.

De forma sorprendente, se encontró que permitiendo que el copolímero de bloques para un conjugado de fármaco asumiera una construcción que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido que tiene un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo en la cadena lateral, la retención del fármaco en la circulación sanguínea puede potenciarse de forma notable.

#### Breve explicación de los dibujos

Fig. 1 muestra cursos del tiempo de la concentración total de DOX en el plasma después de la administración intravenosa de un conjugado DOX-polímero (Ejemplos 5 y 8) en la vena caudal de ratas macho a 1 mg/kg en términos de la cantidad de DOX (n = 3, media ± DT).

Fig. 2 muestra cursos del tiempo de la concentración total de DOX en el plasma después de la administración intravenosa de un conjugado DOX-polímero (Ejemplos 5 y 6) en la vena caudal de ratas macho Wistar a 1 mg/kg en términos de la cantidad de DOX (n = 3, media ± DT).

Fig. 3 muestra cursos del tiempo de la concentración total de DOX en plasma de la rata después de la administración intravenosa de una preparación de DOX (n = 3, media ± DT).

Fig. 4 representa la velocidad de liberación del fármaco desde el conjugado 13DOX-polímero (Ejemplo 5).

Fig. 5 representa los cambios con el tiempo del volumen de tumor del ratón atímico PC-3 con xenoinjerto después de la administración de cada preparación de DOX (n = 8, mean ± SE). La flecha indica el momento de la administración.

Fig. 6 representa los cambios con el tiempo del peso corporal del ratón atímico PC-3 con xenoinjerto después de la administración de cada preparación de DOX (n = 8, mean ± SE). La flecha indica el momento de la administración.

Fig. 7 muestra cursos del tiempo de la concentración total de fármaco en el plasma después de la administración intravenosa de un conjugado DOX-polímero (Ejemplo 14) y un conjugado EPI-polímero (Ejemplo 15) en la vena caudal de ratas macho a 1 mg/kg en términos de la cantidad de fármaco.

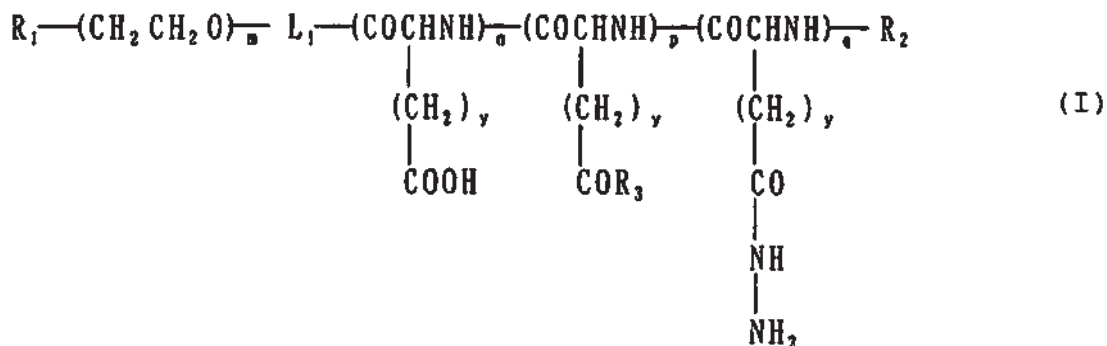
#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

El copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de la presente invención se puede preparar introduciendo un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo en un copolímero de bloques que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido.

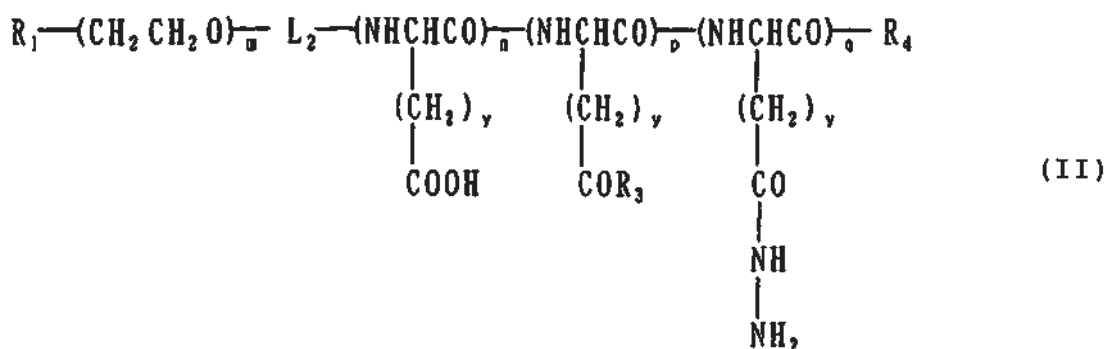
Como región de poliaminoácido, se pueden citar, poli(derivados aminoácido) tales como poli(ácido aspártico) y/o sus derivados, poli(ácido glutámico)y/o sus derivados, por ejemplo poli(β-alquilaspartato-co-ácido aspártico), poli(β-alilaspartato-co-ácido aspártico), poli(β-aralquilaspartato-co-ácido aspártico), poli(γ-alquilglutamato-co-ácido glutámico), poli(γ-aralquilglutamato-co-ácido glutámico), poli(β-alquilaspartamida-co-ácido aspártico), poli(γ-aralquilglutamida-co-ácido glutámico), poli(β-bencil-co-L-aspartato) y poli(γ-bencil-co-L-glutamato).

De forma específica, el copolímero de bloques de la presente invención es fácil de fabricar y tiene la fórmula siguiente:





o



en la que

- 5 R<sub>1</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,
- 10 R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,
- R<sub>3</sub> representa -O-R<sub>5</sub> o -NH-R<sub>5</sub> en el que R<sub>5</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo, y
- R<sub>4</sub> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquiloxi,
- L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> independientemente un de otro representan un enlazador,
- m representa un número entero de 5-1000, preferentemente 40-600
- 15 n representa un número entero de 0-1000, preferentemente 0-100
- p representa un número entero de 0-1000, preferentemente 1-100, y
- q representa un número entero de 0-1000, preferentemente 1-100,
- 20 con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, e y representa un número entero de 1 ó 2.
- 25 El enlazador, que puede variar dependiendo del procedimiento de producción del copolímero de bloques, no queda limitado de forma específica, y L<sub>1</sub> incluye, por ejemplo, -Z-NH-, -CO-Z-NH- y -CO-NH-Z-NH- en los que Z es independientemente un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, y L<sub>2</sub> incluye, por ejemplo, -CO-Z-, -Z-CO-, -CO-Z-CO-, -Z-CO-Z- y -Z-CO-O-Z- en los que Z es independientemente un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

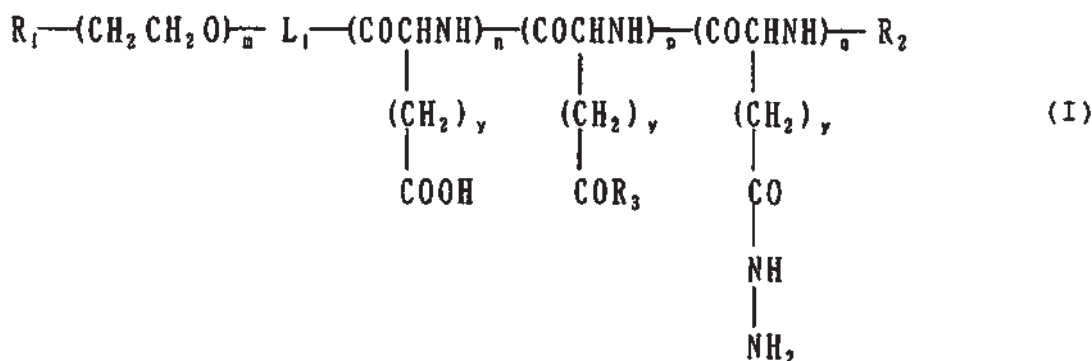
El copolímero de bloques anterior puede sintetizarse haciendo reaccionar hidrazina o un hidrato de hidrazina hasta una MeO-PEG ( $\beta$ -bencil-L-aspartato) conocido convirtiendo de este modo el resto éster bencílico en un grupo hidrazida. La reacción se lleva cabo normalmente en un disolvente deshidratado. Disolventes preferentes son disolventes orgánicos alifáticos u orgánicos y los que pueden disolver cualquier copolímero de bloques e hidrazina y el hidrato de hidrazina. Como disolvente, por ejemplo, se pueden usar preferentemente, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo o una mezcla de estos disolventes. El disolvente usado preferentemente no contiene agua en la medida de lo posible.

La cantidad añadida de hidrazina durante la síntesis puede ser la cantidad que se desee introducir en el resto éster bencílico del copolímero de bloques puesto que la reacción transcurre de una forma casi cuantitativa. Cuando se usa hidrazina, por ejemplo, cuando se va a introducir el 50% en el resto éster bencílico, se añade una cantidad 0,5 veces los equivalentes de hidrazina y cuando se va a introducir el 75% en el resto éster bencílico, se añade una cantidad 0,75 veces los equivalentes de hidrazina. La reacción se lleva a cabo a un intervalo de temperatura de 0°C a 100°C, preferentemente de 20°C a 80°C, y más preferentemente de 25°C a 50°C. La presión es preferentemente presión normal. El tiempo de reacción no queda limitado de forma específica con tal que la reacción transcurra totalmente y normalmente varía de dos horas a dos días.

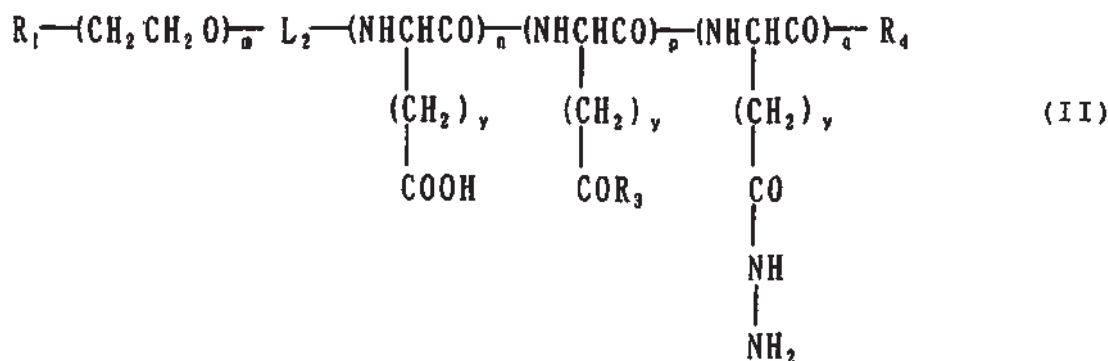
El fármaco que se puede conjugar con el copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de la presente invención no queda limitado de forma específica, siempre que éste pueda formar un enlace covalente al reaccionar con un grupo hidrazida. Ejemplos preferentes de tales fármacos incluyen, por ejemplo, un fármaco que tenga una estructura cetónica, por ejemplo, un fármaco anticanceroso antraciclínico. Ejemplos específicos de fármacos anticancerosos antraciclínicos incluyen, por ejemplo, hidroclicloruro de doxorubicina, hidroclicloruro de daunorubicina, hidroclicloruro de epirubicina, pirarubicina, hidroclicloruro de idarubicina, hidroclicloruro de amrubicina, nemorubicina, PNU-159682 y similares. La cantidad de fármaco que se conjuga con dicho copolímero de bloques no queda limitada de forma específica siempre que se pueda mantener la retención en la sangre y, es 10% o más hasta 50% o menos relativa al número total de unidades de poliaminoácidos en el copolímero de bloques, preferentemente 10% o más hasta 40% o menos, y considerando la eficacia y estabilidad del fármaco, lo más preferentemente, de 15% o menos hasta 35% o menos. Cuando exista una pluralidad de cetonas en los fármacos anticancerosos antraciclínicos anteriores, se unen covalentemente a grupo hidrazida aproximadamente 13 cetonas.

La unión del fármaco anterior al copolímero para un conjugado de fármaco de la presente invención se puede llevar a cabo preferentemente por simple reacción del fármaco con el grupo hidrazida del copolímero de bloques siempre que sea posible en condiciones anhidras. Preferentemente, el copolímero de bloques de la presente invención se puede disolver en un disolvente deshidratado tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo o una mezcla de estos disolventes, al cual se puede añadir el fármaco en la cantidad deseada y hacerse reaccionar a 0,1 a 10 equivalentes, preferentemente 0,1 a 3 equivalentes, respecto al grupo hidrazida. La reacción se puede llevar a cabo a un intervalo de temperatura de 0°C a 50°C, preferentemente de 20°C a 40°C, y más preferentemente de 25°C a 37°C. La presión es preferentemente presión normal. El tiempo de reacción no queda limitado de forma específica con tal que la reacción transcurra totalmente y normalmente variará de dos horas a dos días. La solución después de la reacción se puede verter en un disolvente orgánico hidrófilo apropiado, por ejemplo, un alcohol tal como 2-propanol, y el precipitado formado se puede lavar y recoger. La recogida se puede hacer por un procedimiento de centrifugación. Si fuera necesario, el copolímero conjugado con fármaco se puede someter a purificación por cromatografía de exclusión molecular o ultrafiltración para separar el fármaco no ligado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de micelas poliméricas que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol como cubierta externa y una región hidrófoba global que consiste en poliaminoácidos y/o derivados de los mismos como cubierta interna, teniendo dicha región hidrófoba global un fármaco unido a un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo, en el que dicho fármaco unido a un grupo hidrazida y el grupo hidrófobo pueden estar presentes en la región hidrófoba global en el mismo copolímero de bloques, o en la región hidrófoba global en diferentes copolímeros de bloques, estando unido el fármaco al grupo hidrazida en el copolímero de bloques de la fórmula siguiente:



o



en la que

5  $R_1$ , que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

$R_2$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático  $C_1$ - $C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

10  $R_3$  representa  $-O-R_5$  o  $-NH-R_5$  en el que  $R_5$ , que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo,

$R_4$  representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático  $C_1$ - $C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquiloxi,

$L_1$  y  $L_2$  independientemente uno de otro representan un enlazador,

$m$  representa un número entero de 5-1000,

$n$  representa un número entero de 0-1000,

15  $p$  representa un número entero de 1-1000, y

$q$  representa un número entero de 1-1000,

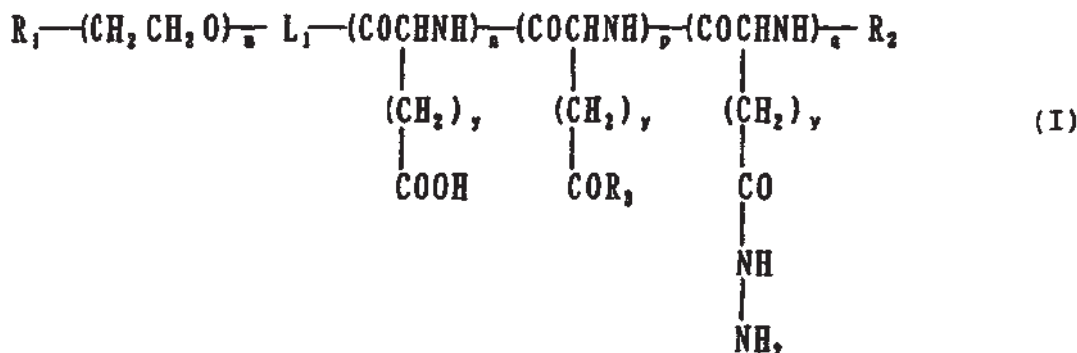
20 con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y

y representa un número entero de 1 ó 2.

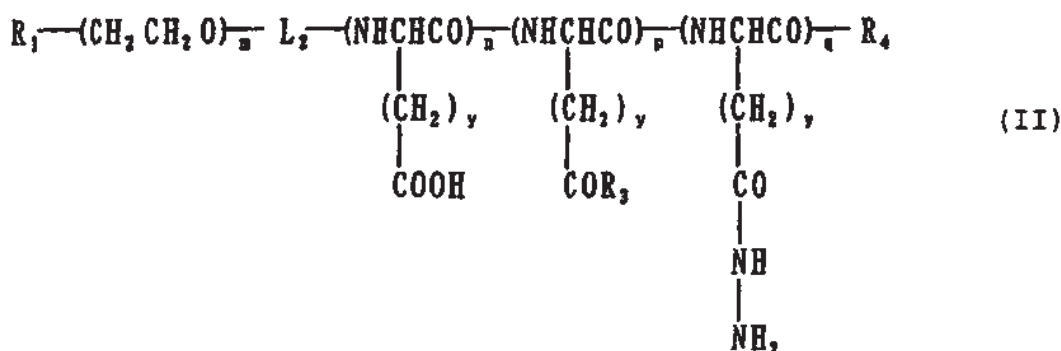
25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región hidrófoba global" se refiere a una región que se ha hecho hidrófoba debido al grupo hidrófobo unido a los poliaminoácidos y/o sus derivados en el copolímero de bloques, por lo que el copolímero de bloques puede formar una micela polimérica que tiene polietilenglicol como cubierta externa en un medio acuoso en dicha región hidrófoba.

30 La micela polimérica en dicha composición farmacéutica puede estar compuesta por un copolímero de bloques para un único conjugado de fármaco de la presente invención en el que el fármaco se conjugó con el grupo hidrazida (es decir, el fármaco conjugado con el grupo hidrazida y el grupo hidrófobo están presentes en la región hidrófoba global en el mismo copolímero de bloques), o de (1) un copolímero de bloques que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido que tiene un grupo hidrazida en la cadena lateral y que opcionalmente tiene un grupo hidrófobo, en el que el fármaco está conjugado con el grupo hidrazida, y de (2) un copolímero de bloques que comprende una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido que tiene un grupo hidrófobo y/o una región derivada del mismo, en el que el fármaco no está conjugado con el grupo hidrazida.

35 Como copolímero de bloques de acuerdo con el punto (1) anterior en la forma en la que el fármaco no está conjugado, por ejemplo, se puede usar la representada por la siguiente fórmula:



o



en la que

5 R<sub>1</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

10 R<sub>3</sub> representa -O-R<sub>5</sub> o -NH-R<sub>5</sub> en el que R<sub>5</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo, y

R<sub>4</sub> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquiloxi,

L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> independientemente uno de otro representan un enlazador, que puede variar dependiendo del procedimiento de producción del copolímero y no queda limitado de forma específica, y L<sub>1</sub> incluye, por ejemplo, -Z-NH-, -CO-Z-NH-, y -CO-NH-Z-NH- en los que Z es independientemente un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, y L<sub>2</sub> incluye, por ejemplo, -Z-CO-, -CO-Z-,  
15 -CO-Z-CO-, -Z-CO-Z- y -Z-CO-O-Z- en los que Z es independientemente un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>,

m representa un número entero de 5-1000, preferentemente 40-600

n representa un número entero de 0-1000, preferentemente 0-100

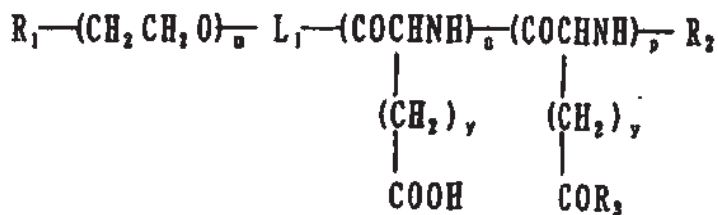
p representa un número entero de 1-1000, preferentemente 1-100, y

q representa un número entero de 1-1000, preferentemente 1-100, y

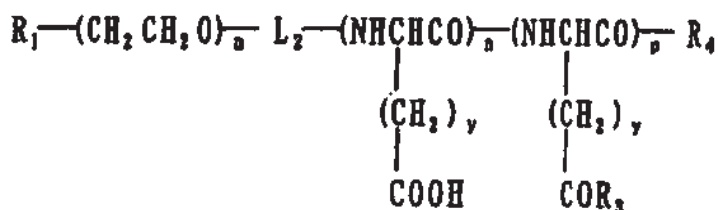
20 y representa un número entero de 1 ó 2.

La introducción de un grupo hidrazida o la unión de un fármaco al copolímero de bloques anterior se puede llevar a cabo de acuerdo con el procedimiento para producir un copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de la presente invención.

25 Como copolímero de bloques de acuerdo con el punto (2) anterior, por ejemplo, se pueden usar los representados por la fórmula siguiente:



o



en la que

- 5  $R_1, R_2, R_3, R_4, L_1, L_2, m, n, p$  e y son como se definen en las fórmulas (I) y (II), con la condición de que cuando  $n$  constituya de 50% a 100% de  $n+p$  y  $n$  esté presente, entonces  $n$  y  $p$  están presentes de forma aleatoria o en bloques. La relación de mezcla del copolímero de bloques del punto (1) anterior en la que el fármaco se conjugó con el copolímero de bloques y el copolímero de bloques del punto (2) anterior no está limitada de forma específica, y se pueden mezclar en una relación en un intervalo de 1:1 a 9:1. En este caso, el porcentaje del grupo hidrófobo con respecto al número de poliaminoácidos totales en el copolímero de bloques mezclado total es igual o superior a 35% hasta menor que 95%, preferentemente, igual o superior a 50% hasta menor que 95%. En este punto, puede estar presente un grupo hidrófobo en cualquiera de los copolímeros de los puntos (1) y (2) anteriores. El porcentaje del fármaco que se conjuga es igual o superior a 5% hasta 65% o menor, preferentemente igual o superior a 5% hasta 50% o menor, y más preferentemente igual o superior a 5% hasta 20% o menor respecto al número de los poliaminoácidos totales en el copolímero de bloques mezclado total.

El procedimiento no queda limitado de forma específica siempre que se forme una micela polimérica, y el copolímero de bloques conjugado con fármaco de la presente invención se puede disolver o dispersar, y luego agitar en un medio acuoso para, de este modo, preparar micelas poliméricas. En este punto, se puede aplicar energía física, tal como una onda ultrasónica, presión, fuerza de cizallamiento o una combinación de las mismas. La micela también se puede preparar disolviendo un copolímero de bloques en un disolvente orgánico volátil, seguido por la evaporación del disolvente orgánico hasta sequedad, luego añadiendo un medio acuoso al mismo, seguido por agitación y seguidamente, aplicando energía física tal como una onda ultrasónica, presión, fuerza de cizallamiento o una combinación de las mismas, o añadiendo un medio acuoso al copolímero de bloques seguido por la aplicación de una fuerza física como se ha descrito antes. El disolvente volátil que se usa en el presente documento se refiere a metanol, etanol, acetona, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, diclorometano y similares, y se pueden elegir como apropiados dependiendo del fármaco que se va a unir. Como medio acuoso que se usa en el presente documento, se pueden citar agua, solución salina fisiológica, un tampón y similares, y puede estar contenida una pequeña cantidad de disolvente orgánico con tal que no afecte de modo adverso a la formación de las micelas poliméricas. Considerando el sitio de unión del fármaco, el pH del tampón varía preferentemente de 6 a 8 y, más preferentemente, es neutro.

30 Cuando un copolímero de bloques conjugado con fármaco y un copolímero de bloques no conjugado con fármaco se mezclan para preparar una micela polimérica, el procedimiento no queda limitado de forma específica y, por ejemplo, después de que ambos copolímeros de bloques se disuelvan en un disolvente orgánico volátil, el disolvente orgánico se evapora hasta sequedad, al que se añade el medio acuoso anterior y se agita, y seguidamente se puede aplicar energía física tal como una onda ultrasónica, presión, fuerza de cizallamiento o una combinación de las mismas, o se añade el medio acuoso a ambos copolímeros de bloques, a los cuales se puede aplicar energía física como antes para preparar la micela. El disolvente volátil que se usa en el presente documento se refiere a metanol, etanol, acetona, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, diclorometano y similares, y se pueden elegir como apropiados dependiendo del fármaco que se va a unir.

40 Para la micela polimérica así formada, el tamaño de partículas no queda limitado de forma específica siempre que éste permita la administración a un cuerpo vivo, y es preferentemente igual o inferior a  $10 \mu\text{m}$  y, más preferentemente igual o inferior a  $5 \mu\text{m}$ . De forma específica, cuando se administra por vía intravenosa, es preferentemente igual o inferior a  $200 \text{nm}$  y, más preferentemente, igual o inferior a  $100 \text{nm}$ . Si fuera necesario, la solución acuosa que contiene la composición farmacéutica de micela polimérica se puede filtrar con un filtro hidrófilo que tenga el tamaño de poro deseado. Además, cuando sea necesario, se puede añadir un agente tamponante, un agente de isotonicidad, un

estabilizador o similar, a la composición farmacéutica que contiene la micela polimérica.

5 Cuando se administra a un cuerpo vivo una composición farmacéutica de copolímero de bloques conjugado con fármaco o de micela polimérica de la presente invención, la vía de administración no queda limitada de forma específica, y se pueden citar la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intraocular y similares. La cantidad administrada se puede elegir según sea apropiado dependiendo del tipo de enfermedad, la edad, el peso corporal, el sexo y factores similares del paciente.

## EJEMPLOS

La presente invención se explicará a continuación con referencia a ejemplos específicos.

### Ejemplo 1

#### 10 Síntesis de MeO-PEG-PBLA

En atmósfera de argón, se añadieron a 61,64 g (5,14 mmol) de polietilenglicol que tenía metoxi en un extremo y aminopropilo en el otro extremo (MeO -PEG-NH<sub>2</sub>, peso molecular medio: 12.000), 400 ml de dimetil sulfóxido deshidratado (DMSO) y 200 ml de N,N-dimetilformamida deshidratada (DMF) y se disolvió, a lo cual se añadieron 15 67,21 g (269,68 mmol) de anhídrido del ácido 3-bencil-L-aspartato N-carboxílico (BLA-NCA, MW= 249,22) y se dejó reaccionar durante la noche a 37°C en atmósfera de argón. La solución se añadió entonces gota a gota a 6 l de solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1) precipitando un polímero. Esta se filtró usando papel de filtro Kiriyaama (φ 90 mm, 5B). Al polímero se añadieron 6 litros de una solución nueva de hexano / acetato de etilo (1/1) y se repitió 20 dos veces lavando con un procedimiento similar, y luego se secó a presión reducida obteniendo un polvo del copolímero de bloques de metoxipolietilenglicol-poli((3-bencil-L-aspartato) (MeO -PEG-PBLA). Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés por cromatografía de exclusión molecular (GPC) y RMN de <sup>1</sup>H en las condiciones descritas a continuación. A partir del resultado de la GPC, el peso molecular del polímero es Mp= 20.778 Da y la distribución de peso molecular del polímero es Mw/Mn = 1,06. El grado de polimerización del polímero poli(P-bencil-L-aspartato) (PBLA) se calcula que es 40 a partir del peso molecular de la cadena de PEG y del espectro de RMN de <sup>1</sup>H. El que tiene un peso molecular de 12.000 y un grado de polimerización de PBLA se abrevia como "12-40".

25 Por razones de conveniencia en los Ejemplos, en el cálculo se usó un peso molecular de MeO-PEG-PBLA de 20.000 Da. El MeO-PEG-PBLA obtenido es un copolímero de bloques que tenía m=272 y n+p+1=40 como valores medios en la fórmula general I y en el que p constituye el 100% del mismo.

A no ser que se indique de otro modo, se usaron las siguientes condiciones en un análisis similar a continuación.

[Dispositivos de medida y condiciones, etc.]

#### 30 (1) Determinación del peso molecular (GPC)

Sistema: Waters 600 GPC System

Columna: Fase móvil: DMF que contiene cloruro de litio 10 mM

Caudal: 0,8 ml/min

Detección: Refractómetro (RI)

#### 35 (2) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN de <sup>1</sup>H)

JEOL AL300 (300 MHz) fabricado por Nippon Denshi, disolvente: DMSO-d<sub>6</sub>, temperatura: temperatura ambiente.

### Ejemplo 2

#### Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn)

40 En atmósfera de argón, se añadieron a 5 g (0,25 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenido en el Ejemplo 1, 50 ml de DMF deshidratado y se disolvió. Se añadió hidrazina anhidra 159 μl (5 mmol, Mw = 32,05), 0,5 veces los equivalentes relativos al éster bencílico (20 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Después de la reacción, se añadieron gota a gota para precipitar un polímero 700 ml de 2-propanol enfriado hasta -20°C. Para recoger el polímero se llevó a cabo centrifugación (8.000 x g, 15 min, 4°C). Se repitió 45 dos veces un lavado con un procedimiento de centrifugación similar con 2-propanol enfriado hasta -20°C. Se repitió dos veces un lavado con un procedimiento de centrifugación similar con 700 ml de solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1). Después de filtración usando papel de filtro Kiriyaama (φ 45 mm, 5B), se secó a presión reducida obteniendo un polímero en polvo (MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn)). Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés por acetilación del grupo hidrazida con anhídrido acético seguido por RMN de <sup>1</sup>H en las condiciones descritas antes. A partir de los resultados de la RMN de <sup>1</sup>H, la cadena lateral de poli(ácido aspártico) por 50 molécula de polímero tenía 19 grupos hidrazida (q), 13 grupos éster bencílico (p) y 8 COOH (n).



**Ejemplo 3**

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd, C8)

En atmósfera de argón, se añadieron a 1,5 g (0,075 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenido en el Ejemplo 1, 15 ml de DMF deshidratado y se disolvió. Se añadió n-octilamina, 249  $\mu$ l (1,5 mmol, Mw =129,25), 0,5 veces los equivalentes relativos al éster bencílico (20 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió hidrazina anhidra 47,6  $\mu$ l (1,5 mmol), 0,5 veces los equivalentes relativos al éster bencílico (20 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente.

Después de la reacción, ésta se purificó en un procedimiento similar al Ejemplo 2 obteniendo un polímero en polvo (MeO-PEG-pAsp (Hyd, C8)). Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés llevando a cabo una acetilación como en el Ejemplo 2 seguida por RMN de  $^1\text{H}$  en las condiciones descritas antes. A partir de los resultados de la RMN de  $^1\text{H}$ , la cadena lateral de poli(ácido aspártico) por molécula de polímero tenía 20 grupos hidrazida (q), 11 grupos octilo (p) y 9 COOH (n).

**Ejemplo 4**

15 Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd, C4-Fenilo)

En atmósfera de argón, se añadieron a 1,5 g (0,075 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenido en el Ejemplo 1, 15 ml de DMF deshidratado y se disolvió. Se añadió hidrazina anhidra 47,6  $\mu$ l (1,5 mmol), 0,5 veces los equivalentes relativos al éster bencílico (20 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 4-fenilbutilamina, 711  $\mu$ l (4,5 mmol, Mw = 149,23), 1,5 veces los equivalentes relativos al éster bencílico (60 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Después de la reacción, ésta se purificó del mismo modo que en el Ejemplo 2 obteniendo un polímero en polvo (MeO-PEG-pAsp (Hyd, C4-Fenilo)). Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés llevando a cabo la acetilación como en Ejemplo 2 seguida por RMN de  $^1\text{H}$ . La cadena lateral de poli(ácido aspártico) por molécula de polímero tenía 20 grupos hidrazida (q), 13 grupos fenilbutilo (p) y 7 COOH (n).

**Ejemplo 5**

a. Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn) (en lo sucesivo, puede hacerse referencia a hidrocloreto de doxorubicina como DOX)

Se disolvieron 250 mg de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn) obtenido en el Ejemplo 2, en 0,5 ml de DMSO deshidratado, al que se añadió hidrocloreto de doxorubicina (DOX, Mw = 580), 1,5 veces los equivalentes relativos al grupo hidrazida (30 equivalentes relativos al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 3 días. Después de la reacción, la solución se vertió en 80 ml de 2-propanol enfriado hasta  $-20^\circ\text{C}$  para precipitar un polímero. El polímero se recogió por centrifugación ( $2.380 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Se repitió cuatro veces lavando con un procedimiento de centrifugación similar con 90 ml de 2-propanol limpio enfriado hasta  $-20^\circ\text{C}$ . A continuación se disolvió el polímero en 50 ml de metanol (MeOH) y se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna rellena con Sephadex LH-20 hinchada con MeOH (fabricada por GE Healthcare Bioscience) para separar la DOX no ligada. A la solución de polímero recogida, se añadieron 80 ml de DMF, luego se concentró por evaporación hasta aproximadamente 30 ml y se repitió la purificación con cromatografía de exclusión molecular. A la solución de polímero recogida se añadieron 8 ml de DMF y se separó el MeOH por evaporación. A continuación, se añadió la solución de polipéptido gota a gota a 80 ml de una solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1) para precipitar un polímero. El polímero se recogió por un procedimiento de centrifugación ( $2.380 \times g$ , 10 min,  $10^\circ\text{C}$ ). A continuación, se repitió dos veces lavando con un procedimiento de centrifugación similar con 90 ml de solución mixta de nueva hexano / acetato de etilo (1/1). Después de filtrar usando papel de filtro Kiriyaama ( $\phi 21$  mm, 58), se secó a presión reducida obteniendo un conjugado en polvo de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn)). El resultado de la medida por HPLC descrito a continuación indicó que la cantidad de hidrocloreto de doxorubicina unido por molécula de conjugado polimérico fue 13, o 32,5% de las unidades totales de poliaminoácidos.

b. En un procedimiento de acuerdo con el descrito antes en el punto a., se preparó un conjugado de hidrocloreto de doxorubicina-polímero en el que había 8 moléculas de hidrocloreto de doxorubicina ligadas a una molécula de polímero.

La cantidad ligada de hidrocloreto de doxorubicina en una molécula de conjugado de polímero se calculó a partir de los valores medidos por HPLC de las concentraciones de ácido aspártico y de hidrocloreto de doxorubicina en el polímero hidrolizado, suponiendo que una molécula de polímero contiene 40 moléculas de ácido aspártico. La concentración de ácido aspártico se determinó de acuerdo con las instrucciones (Nihon Waters) para el análisis de aminoácidos por Waters AccQ/Tag<sup>TM</sup>. Por otro lado, se determinó la concentración de DOX por HPLC en la que se dispersó el conjugado DOX-polímero en tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4) hasta una concentración de 1 mg/ml, se añadió a una porción del mismo la misma cantidad de HCl 0,2 N y se dejó reposar a la concentración final de HCl 0,1 N durante

1 hora a temperatura ambiente, seguido por determinación por HPLC. Las condiciones de la HPLC son las siguientes. A no ser que se indique de otro modo, todas las determinaciones por HPLC de DOX se llevaron a cabo en las mismas condiciones.

Sistema: Waters Alliance System

5 Columna: Tosoh TSK-gel ODS-80™ (4-6φ x 150 mm) (40°C)

Fase móvil: formiato amónico 25 mM (pH 3,0)/acetonitrilo = 7/3

Caudal: 1 ml/min

Detección: Fluorescencia (Ex: 488 nm, Em: 560 nm)

Volumen de inyección: 10 µl

## 10 Ejemplo 6

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C8)

Usando MeO-PEG-pAsp (Hyd, C8) obtenido en el Ejemplo 3, se obtuvo un conjugado de hidrocóloro de doxorubicina-polímero MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C8) con el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 5. El resultado de la determinación por HPLC indicó que la cantidad de hidrocóloro de doxorubicina por molécula del polímero obtenido fue de 12.

## Ejemplo 7

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C4-Fenilo)

Usando MeO-PEG-pAsp (Hyd, C4-Fenilo) obtenido en el Ejemplo 4, se obtuvo un conjugado de hidrocóloro de doxorubicina-polímero MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C4-Fenilo) con el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 5. El resultado de la determinación por HPLC indicó que la cantidad de hidrocóloro de doxorubicina por molécula del polímero obtenido fue de 6.

## Ejemplo 8

Estudio farmacocinético en la rata usando MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn)

1) Preparación de micelas

25 Se usaron dos compuestos, es decir, el conjugado (13 DOX) obtenido en el Ejemplo 5a y MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn) (8 DOX) (Ejemplo 5b) preparado en el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 5a y que tiene una cantidad diferente de DOX ligada. Se pesó con exactitud en un vial de muestra una cantidad de entre 10-20 mg de cada polímero, al que se añadió 1 ml de diclorometano para disolver totalmente el polímero. A continuación, bajo la corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente para preparar el polímero en forma de película. A presión reducida, se secó adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se añadió tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7-4)/glucosa al 5%(p/v) hasta una concentración de polímero de 10 mg/ml para hidratar la película de polímero a 4°C. Después de agitar durante la noche a 4°C, se sometió a tratamiento por ultrasonidos en agua enfriada con hielo durante 10 minutos usando un Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). Seguidamente, se filtró con un filtro de 0,22 µm (Millipore, Millex™ GP PES) para preparar una micela del filtrado, que se usó en el siguiente experimento.

2) Estudio en animales

A ratas macho Wistar (Charles River Laboratories Japan, Inc., 6-7 semanas de edad) anestesiadas, se administraron las dos micelas anteriores en la vena caudal en las siguientes condiciones (n = 3). Se usaron jeringas revestidas de heparina para recoger la sangre y, después de centrifugar la sangre extraída a 4°C, se recogió el plasma y se almacenó a -30°C hasta su uso.

Dosis: 1 mg/kg en términos de la cantidad de DOX

Tiempos de extracción de sangre: 5 minutos, 1, 3, 6, 9, 24, 48 horas después de la administración

Cantidad de sangre extraída: 0,2-0,25 ml cada vez (de la vena yugular)

3) Determinación de la concentración de DOX en el plasma

45 a) Determinación de la concentración total de DOX

A 50 µl de plasma de rata recogido, se añadieron 100 µl de acetonitrilo y 50 µl de HCl 0,4 N en este orden hasta un total



de 200  $\mu$ l. Después de agitar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se centrifugó (Funakoshi, Chibitan, 10.000 rpm, 10 minutos) a temperatura ambiente para recoger 100  $\mu$ l de sobrenadante, al que se añadieron 30  $\mu$ l de NaOH 0,2 N, 20  $\mu$ l de Triton X-100 al 1% y 50  $\mu$ l de 2  $\mu$ g/ml de hidroclicloruro de daunorrubicina (Wako) (patrón interno) / tampón formiato amónico 20 mM (pH 3,0) en este orden hasta un total de 200  $\mu$ l. El líquido de la muestra de tratamiento se llenó en un vial de muestra de HPLC, y se sometió a análisis HPLC para determinar la concentración de DOX en el plasma.

b) Determinación de la concentración libre de DOX

A 50  $\mu$ l de plasma de rata recogido, se añadieron 100  $\mu$ l de acetonitrilo, se centrifugó (Funakoshi, Chibitan, 10.000 rpm, 10 minutos) a temperatura ambiente para recoger 50  $\mu$ l de sobrenadante, al cual se añadieron 100  $\mu$ l de 2  $\mu$ g/ml de hidroclicloruro de daunorrubicina (Wako) (patrón interno / tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4). El líquido de la muestra de tratamiento se llenó en un vial de muestra de HPLC, y se sometió a análisis HPLC para determinar la concentración de DOX en el plasma.

c) Cálculo de la concentración de DOX conjugado con polímero

Usando los valores de los puntos (a) y (b) anteriores, se calculó la concentración de DOX conjugado con polímero en base a la siguiente ecuación:

$$\text{(Concentración de DOX conjugada con polímero)} = \text{(Concentración total de DOX)} - \text{(Concentración de DOX libre)}$$

4) El resultado de la determinación de la concentración cambia con el tiempo en el plasma

En la Fig. 1 se muestran los intervalos temporales de la concentración total de DOX en el plasma después de la administración intravenosa. Tanto los conjugados de polímero de 8 DOX como de 13 DOX mostraron una concentración persistente en plasma, indicando una excelente retención en la sangre. La concentración de DOX libre fue de aproximadamente 1/100 la concentración total de DOX, y el conjugado DOX-polímero fue estable en la sangre. El AUC como la concentración total de DOX fue 149 y 238  $\mu$ g/ml·h para 8 DOX y 13 DOX, respectivamente. El resultado del AUC se muestra en la Tabla 1.

### Ejemplo 9

Estudio farmacocinético en la rata usando MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C8) y MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C4-Fenilo)

Usando el conjugado de hidroclicloruro de doxorubicina-polímero MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C4-Fenilo) obtenido en el Ejemplo 7 y MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C8) obtenido en el Ejemplo 6, se prepararon micelas de forma similar al Ejemplo 8, y se sometieron a un estudio farmacocinético en la rata.

Como resultado, para MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C4-Fenilo), el AUC cuando 1 mg/ml en términos de la cantidad de DOX que se administró en la vena caudal fue 156  $\mu$ g/ml·h, indicando que este conjugado tenía una excelente retención en la sangre comparable al Ejemplo 8.

Para MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, C8), esta fue 90,7  $\mu$ g/ml·h, indicando que este tenía una retención en la sangre superior al Ejemplo comparativo 7 descrito más adelante.

### Ejemplo comparativo 1

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd)

En atmósfera de argón, se añadieron 6 g (0,3 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenido en el Ejemplo 1, 60 ml de DMF deshidratado y se disolvió. Se añadió hidrazina anhidra 1,14 ml (36 mmol, Mw 32,05), el triple de equivalentes respecto al éster bencílico (120 equivalentes respecto al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. La purificación del mismo modo que en el Ejemplo 2 dio un MeO-PEG-pAsp (Hyd) en polvo. Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés llevando a cabo la acetilación como se describe en Ejemplo 2 seguida por RMN de  $^1$ H. La cadena lateral de poli(ácido aspártico) por molécula de polímero tenía 37 grupos hidrazida (q) y 3 COOH (n).

### Ejemplo comparativo 2

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd, NH<sub>4</sub>)

A 2 g (0,11 mmol) de MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn) obtenido del mismo modo que el Ejemplo 2, se añadieron 30 ml de NaOH 0,1 N, y se hidrolizó a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación, después de dializar frente a 3 litros de solución de amoníaco al 0,25% durante 2 días [corte de peso molecular (MWCO) = 3.500], se cambió cinco veces la solución de amoníaco al 0,25% y frente a 3 litros de agua durante 2 días [corte de peso molecular (MWCO) = 3.500], se cambió el agua destilada 4 veces], ésta se liofilizó. El polvo de polímero obtenido se disolvió en 20 ml de

DMSO y se añadió gota a gota a 500 ml de éter dietílico para precipitar el polímero. Este se filtró usando papel de filtro Kiriyaama ( $\phi$  45 mm, 5B). Después de repetir un lavado similar dos veces con 400 ml de éter dietílico nuevo, éste se secó a presión reducida obteniendo un MeO-PEG-pAsp (Hyd, NH<sub>4</sub>) en polvo. Se confirmó que el compuesto obtenido era el compuesto de interés llevando a cabo la acetilación como se describe en el Ejemplo 2 seguida por RMN de <sup>1</sup>H. La cadena lateral de poli(ácido aspártico) por molécula tenía 18 grupos hidrazida y 22 sales amonio.

### Ejemplo comparativo 3

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (COOH)

A 2 g (0,1 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenido en el Ejemplo 1, se añadieron 16 ml (8 mmol) de NaOH 0,5 N, y se hidrolizó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de ajustar hasta pH 3 con ácido cítrico monohidratado, éste se sometió a ultrafiltración (Millipore, sistema Laboscale TFF System (membrana UF: unido a Pellicon™ XL Biomax5)) seguido por filtración en filtro (Millipore Strivex™ GS, 0,22  $\mu$ m) y luego se liofilizó. A continuación, éste se disolvió en 20 ml de DMF y se añadió gota a gota a 500 ml de solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1) para precipitar el polímero. Seguidamente se filtró con papel de filtro Kiriyaama ( $\phi$  45 mm, 5B). Al polímero se añadieron luego 500 ml de una solución de hexano / acetato de etilo (1/1) nueva, se repitió dos veces un procedimiento similar y luego se secó a presión reducida obteniendo un hidrolizado en polvo (MeO-PEG-pAsp (COOH)).

### Ejemplo comparativo 4

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (amida-DOX)

En una atmósfera de argón, se añadieron a 1 g (0,059 mmol) de MeO-PEG-pAsp (COOH) obtenido en el Ejemplo comparativo 3, 100 ml de DMF deshidratado y se disolvieron, a lo cual se añadieron hidrocloreto de doxorubicina 1,365 g (2,35 mmol), 1 equivalente con respecto al ácido carboxílico (40 equivalentes con respecto al copolímero de bloques), diciclohexilcarbodiimida (DCC, Mw = 206,33) 728 mg (3,53 mmol), 1,5 veces los equivalentes con respecto al ácido carboxílico (60 equivalentes con respecto al copolímero de bloques) y trietilamina (Mw = 101,19) 492  $\mu$ l (3,53 mmol), 1,5 equivalentes con respecto al ácido carboxílico (60 equivalentes con respecto al copolímero de bloques), y se dejó que reaccionaran durante la noche a temperatura ambiente. Después de la reacción, la solución se dializó frente a 3 litros de agua durante 1 día [corte de peso molecular (MWCO) = 3.500], se cambió el agua destilada 5 veces, y se liofilizó. Seguidamente, se disolvió el polímero en 20 de DMF y se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna rellena con DMF-Sephadex LH-20 hinchada (fabricada por GE Healthcare Bioscience). Después de recoger la solución, ésta se dializó frente a 3 litros de agua durante 2 días [corte de peso molecular (MWCO) = 3.500], se cambió el agua destilada 5 veces] y se liofilizó. Seguidamente, se disolvió el polímero en DMF y se purificó por cromatografía de exclusión molecular y se repitió la liofilización obteniendo el polímero en polvo (MeO-PEG-pAsp (amida-DOX)) en el que el grupo amino de DOX está unido al ácido carboxílico del polímero mediante una unión amida. El resultado de la medida por HPLC indicó que la cantidad unida de doxorubicina por molécula de polímero era de 13.

### Ejemplo comparativo 5

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX)

Usando MeO-PEG-pAsp (Hyd) obtenido en el Ejemplo comparativo 1 en un procedimiento igual que el del Ejemplo 5, se obtuvo un conjugado de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX)). El resultado de la medida por HPLC indicó que la cantidad unida de hidrocloreto de doxorubicina por molécula de polímero era de 8.

### Ejemplo comparativo 6

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX)

Usando MeO-PEG-pAsp (Hyd) obtenido en el Ejemplo comparativo 1 en un procedimiento igual que el del Ejemplo 5, se obtuvieron conjugados de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX)) con una cantidad diferente de hidrocloreto de doxorubicina unida. El resultado de la medida por HPLC indicó que la cantidad unida de hidrocloreto de doxorubicina por molécula de polímero era de 15, 20 y 39, respectivamente. Con respecto al conjugado de polímero en el que había 39 DOX unidas, se pensó que también había presente DOX libre.

### Ejemplo comparativo 7

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, NH<sub>4</sub>)

Usando MeO-PEG-pAsp (Hyd, NH<sub>4</sub>) obtenido en el Ejemplo comparativo 2 en un procedimiento igual al del Ejemplo 5, se obtuvo un conjugado de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, NH<sub>4</sub>)). El resultado de la medida por HPLC indicó que la cantidad unida de hidrocloreto de doxorubicina por molécula de polímero era de 12.

### Ejemplo comparativo 8

Estudio farmacocinético en MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX)

## 1) Preparación de micelas poliméricas usando conjugados de DOX obtenidos en los Ejemplos comparativos 5y 6

Se pesó con precisión una cantidad entre 10-20 mg de cada uno de cuatro polímeros diferentes (8, 15, 20 y 39 DOX) en un vial de muestra, al que se añadió 1 ml de diclorometano para disolver totalmente. A continuación, bajo una corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente para preparar el polímero en forma de película. A presión reducida, se secó adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se añadió tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4)/glucosa al 5% (p/v) hasta una concentración de polímero de 10 mg/ml para hidratar la película de polímero a 4°C. Después de agitar durante la noche a 4°C, se sometió a tratamiento por ultrasonidos en agua enfriada con hielo durante 10 minutos usando un Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). Seguidamente, se filtró con un filtro de 0,22 µm (Millipore, Millex™ GP PES) para preparar micelas poliméricas del filtrado, que se usaron en el siguiente experimento.

## 2) Estudio farmacocinético en la rata

A ratas macho Wistar (Charles River Laboratories Japan, Inc., 6-7 semanas), se administraron las micelas anteriores en la vena caudal en las mismas condiciones que en el Ejemplo 8 (1 mg/kg como cantidad de DOX, n = 3). Después de centrifugar la sangre extraída a 4°C, se determinó la concentración de DOX en el plasma en un procedimiento igual que el del Ejemplo 8.

## 3) Resultado de la determinación de los cambios en los niveles de plasma con el tiempo

En la Fig. 2 se muestran los cambios en la concentración total de DOX en el plasma después de la administración intravenosa, y las AUC calculadas en base a los resultados de esta determinación se resumen en la Tabla 1. Mientras que los conjugados de 39 y 20 DOX-polímero desaparecen rápidamente, los conjugados de 15 y 8 DOX-polímero presentan una retención en el plasma relativamente persistente. Las AUC de los conjugados de 39, 20, 15 y 8 DOX-polímero fueron 1,2, 3,1, 7,6 y 19,1 µg/ml·h, respectivamente. Sin embargo, ésta fue igual o inferior a la décima parte cuando se compara con el AUC obtenida en el Ejemplo 1.

**Ejemplo comparativo 9**

## Preparación de micelas de MeO-PEG-pAsp (amida-DOX)

Se pesó con exactitud una cantidad entre 10-20 mg del polímero MeO-PEG-pAsp (amida-DOX) obtenido en el Ejemplo comparativo 4 en un vial de muestra, al cual se añadió 1 ml de diclorometano para disolver totalmente el polímero. A continuación, bajo una corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente para preparar el polímero en forma de película. A presión reducida, se secó adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4)/glucosa al 5% (p/v) hasta una concentración de polímero de 10 mg/ml para hidratar la película de polímero a 4 °C. Después de agitar durante la noche a 4 °C, ésta se sometió a un tratamiento por ultrasonidos en agua enfriada en hielo durante 10 minutos usando el Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). A continuación, se filtró en gel (columna PD-10, GE Healthcare Bioscience, eluyente: tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4)/glucosa al 5% (p/v) para eliminar la DOX libre en la muestra y el polímero recogido se usó como las micelas poliméricas.

**Ejemplo comparativo 10**

## Preparación de liposomas que encapsulan DOX

Usando lecitina de soja refinada H (HPC) [AJINOMOTO HEALTHY SUPPLY, INC.], colesterol (Col) (Wako), conjugado de metoxipolietilenglicol-carbamato de distearoil fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) (NOF CORPORATION, SUNBRIGHT™ DSPE-020CN, peso molecular de la cadena de PEG: 2.000), se prepararon liposomas con una composición a una relación molar de HPC:Col:DSPE-PEG=2:1:0,1. Así, se preparó bajo una corriente de nitrógeno una película de la composición anterior a partir de la solución madre lipídica en cloroformo. Ésta se secó durante la noche a presión reducida y luego se añadió solución acuosa 250 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la misma y se hidrató a 60 °C. Después de radiación por ultrasonidos (5 minutos) a 60 °C, se sometió a un tratamiento con filtro de 0,1 µm con Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) a 60 °C durante 11 veces. Seguidamente, se recogieron los liposomas por ultracentrifugación (65.000 rpm, 1 hora, 20°C, Beckman Coulter, rotor MLA-130) y se suspendieron en una solución acuosa de glucosa al 5%. A los liposomas vacíos recogidos, se les añadió solución de DOX (glucosa al 5% (p/v)) (lípidos: DOX = 1: 0,2 p/p), y se incubó a 65°C durante 2 horas. Seguidamente, con el fin de eliminar la DOX que no quedó encapsulada en los liposomas, se siguió un procedimiento de ultracentrifugación similar (65.000 rpm, una hora, 20°C, Beckman Coulter, rotor MLA-130) para obtener liposomas como precipitado. Adicionalmente, éstos se purificaron (eluyente: glucosa al 5% (p/v)) por exclusión molecular (PD-10, GE Healthcare Bioscience) y la fracción de liposomas recogida se usó como una muestra para administrar a las ratas.

**Ejemplo comparativo 11**

## Preparación de micelas adsorbidas físicamente que encapsulan DOX

## Síntesis de MeO-PEG-PBLA(12-40 Bn 60%)

En atmósfera de argón, se disolvió 1 g (0,059 mmol) de MeO-PEG-pAsp (COOH) obtenido en el Ejemplo comparativo 3 en 20 ml de DMF deshidratado, al que se añadieron 244  $\mu$ l (2,36 mmol) de alcohol bencílico, 1 equivalente con respecto al ácido carboxílico (40 equivalentes con respecto al copolímero de bloques), 288 mg (2,36 mmol) de 4-dimetilamino piridina DMAP, Mw = 122,17), 1 equivalente con respecto al ácido carboxílico (40 equivalentes con respecto al copolímero de bloques) y se añadieron 548  $\mu$ l (3,54 mmol) de diisopropilcarbodiimida (DIPCI, Mw = 126,2, d: 0,815), 1,5 veces los equivalentes con respecto al ácido carboxílico (60 equivalentes con respecto al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Después de la reacción, la solución se añadió gota a gota a 200 ml de solución mixta (1/1) de hexano/acetato de etilo para precipitar un polímero, que seguidamente se filtró con papel de filtro Kiriyama ( $\phi$  45 mm, 5B). Además, el polímero se lavó dos veces con 200 ml de una solución mixta (1/1) de hexano/acetato de etilo nueva para obtener un polvo polimérico.

El polímero obtenido se dispersó en 100 ml de agua y luego se sometió a ultrafiltración (Millipore, sistema Laboscale TFF System (membrana UF: unido a Pellicon™ XL Biomax5)) seguido por filtración en filtro (Millipore Strivex™ GS, 0,22  $\mu$ m) y luego se liofilizó. A continuación, éste se disolvió en 20 ml de DMF y se añadió gota a gota a 200 ml de solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1) para precipitar el polímero. Seguidamente se filtró con papel de filtro Kiriyama ( $\phi$  45 mm, 5B). Seguidamente, el polímero se lavó dos veces con una solución mixta de hexano / acetato de etilo (1/1) nueva y se secó a presión reducida para obtener un polvo de polímero.

El polímero obtenido se confirmó en las mismas condiciones que el Ejemplo 1, y el resultado de la GPC demostró que el polímero tenía un peso molecular  $M_p = 19500$  Da y una distribución de peso molecular  $M_w/M_n = 1,08$ . La introducción de grupos bencilo calculada a partir de RMN de  $^1H$  fue de 25 moléculas y la tasa de introducción calculada a partir de MeO-PEG-PBLA (12-40) obtenida en el Ejemplo 1 fue de 63%.

Se pesaron con precisión aproximadamente 10 mg de hidrocloreto de doxorubicina (Wako), a la que se añadió, DMSO (Wako) a 10 mg/ml y se disolvió. Se añadieron a esto el doble de moles (aproximadamente 5  $\mu$ l) de trietilamina (Sigma-Aldrich) respecto al hidrocloreto de doxorubicina, que se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Por otro lado, como polímero se usó PEG-PBLA (60%Bn) (12-40). Se pesaron con precisión aproximadamente 20 mg del polímero, al que se añadió DMSO (Wako) y se disolvió hasta 10 mg/ml. Se añadieron a la mezcla 0,4 ml de una solución de hidrocloreto de doxorubicina en DMSO preparada como antes (polímero: DOX = 1 : 0,2 p/p), y se colocó esta mezcla en un tubo de membrana de diálisis (Spectra/Por™) con un corte de peso molecular (MWCO) de 3.500, y se dializó durante la noche frente a 300 ml de tampón borato 20 mM (pH 8,0) a 4°C. El contenido del tubo de membrana de diálisis se recogió y se sometió a ultrasonidos en agua enfriada en hielo durante 5 minutos usando el Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). Seguidamente, se filtró con un filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore, Millex™ GP PES) y luego se filtró en gel (columna PD-10, GE Healthcare Bioscience, eluyente: glucosa al 5%(p/v)) para eliminar la DOX libre de la muestra. La fracción recogida eran micelas poliméricas atrapadas físicamente que encapsulaban DOX, y se usaron en el experimento siguiente.

### Ejemplo comparativo 12

Preparación de una solución de DOX

Se pesaron con precisión aproximadamente 10 mg de hidrocloreto de doxorubicina (Wako), a lo que se añadió una solución acuosa al 5% (p/v) de glucosa para disolver totalmente el fármaco hasta una concentración de 2 mg/ml y se usó en el experimento con animales.

### Ejemplo comparativo 13

Estudio farmacocinético de los Ejemplos comparativos

1) Estudio de administración en la rata

A ratas macho Wistar (Charles River Laboratories Japan, Inc., 6-7 semanas) anestesiadas con éter, se administraron las preparaciones de DOX de los Ejemplos comparativos anteriores 7 y 9-12 en la vena caudal a 1 mg/kg (5 mg/kg para el Ejemplo comparativo 12) en términos de cantidad de DOX (n = 3). Después de centrifugar la sangre recogida a 4°C, se recogió el plasma y se almacenó a -3°C hasta su uso.

Dosis: 1 mg/kg en términos de la cantidad de DOX (5 mg/kg para el Ejemplo comparativo 12)

Tiempos de extracción de sangre: 5 minutos, 1, 3, 6, 9, 24, 48 horas después de la administración

Cantidad de sangre extraída: 0,2-0,25 ml cada vez (de la vena yugular)

La sangre recogida se centrifugó a 4°C para recoger el plasma, que se almacenó a -30°C hasta su uso.

2) Determinación de la concentración de DOX

Para el Ejemplo comparativo 7, la concentración de DOX en plasma se determinó como en el Ejemplo 8, y para el resto de Ejemplos comparativos, se usó el siguiente procedimiento.

(1) En el caso de liposomas

A 40 µl de plasma de rata recogido, se añadieron 40 µl de acetonitrilo y se agitó, a lo cual se añadió 40 µl de una solución acuosa al 1% de Triton X-100. Después de centrifugar (Funakoshi, Tibitan, 10,000 rpm, 10 minutos) a temperatura ambiente, se recogieron 80 µl del sobrenadante, al que se añadieron 20 µl de 10 µg/ml de hidroclicloruro de daunorrubicina (Wako) que se usa como patrón interno / tampón formiato amónico 25 mM (pH 3,0). La concentración de DOX se determinó usando un sistema Waters Alliance System en las condiciones descritas en el Ejemplo 8.

(2) En el caso de MeO-PEG-pAsp (Amida-DOX)

A 50 µl de plasma de rata recogido se añadieron 50 µl de HCl 1N hasta un total de 100 µl, y después de agitar, se calentó hasta 85°C durante 2 minutos. En un experimento preliminar, sin embargo, se había confirmado que se podía convertir en compuestos relacionados el 100% de doxorubicina. Después de enfriar la muestra hasta temperatura ambiente, se añadieron secuencialmente 100 µl de acetonitrilo, 50 µl de hidroclicloruro de doxorubicina que se usa como patrón interno / tampón borato 1 M (pH 8,0) y 50 µl de NaOH 1N y se agitó. A continuación, se centrifugó (Funakoshi, Chibitan, 10.000 rpm, 10 minutos) a temperatura ambiente para recoger 100 µl del sobrenadante que se filtró con un filtro de 0,22 µm (Millipore, Millex™ GP PES) y se analizó el filtrado por HPLC. Usando una curva de calibración generada tratando una solución acuosa de DOX de una forma similar, se determinó la concentración de DOX en el plasma.

(3) En el caso de la solución de DOX

Se determinó de acuerdo con el procedimiento de determinación de la concentración de DOX descrito en el Ejemplo 8.

3) Resultado de la determinación de los cambios con el tiempo en los niveles plasmáticos

El resultado de cursos del tiempo de la concentración de cada preparación de DOX en el plasma se muestra en la Fig. 3, y el AUC calculada en base al resultado de esta determinación se resume en la Tabla 1. Comparado con el resultado de la solución, el aumento en el AUC debido a las micelas poliméricas físicamente atrapadas fue de siete veces superior. Por otro lado, en el conjugado de DOX (Ejemplo comparativo 7) que tiene una sal de amonio y un conjugado de DOX-polímero (Ejemplo comparativo 9) que usa la unión amida, el AUC aumentó aproximadamente en 500 veces, que sin embargo fue una cuarta parte del Ejemplo 5. En los liposomas (Ejemplo comparativo 10), el aumento fue de aproximadamente 2000 veces, dando un AUC casi comparable al Ejemplo 5.

Tabla 1 AUC de cada preparación de DOX después de la administración intravenosa en ratas (1 mg/kg) (media de n = 3)

Preparación de DOX	AUC (µg/ml·h)
8DOX (Ej. Comp. 5)	19,1
15DOX (Ej. Comp. 6)	7,6
20DOX (Ej. Comp. 6)	3,1
39DOX (Ej. Comp. 6)	1,2
12DOX (Ej. Comp. 7)	69,5
8DOX (Ejemplo 5b)	149
13DOX (Ejemplo 5a)	238
6DOX (Ejemplo 7)	156
12DOX (Ejemplo 3)	90,7
13DOX (Amida) (Ej. Comp. 9)	57,9
DOX liposoma (Ej. Comp. 10)	267
Micelas que adsorben físicamente DOX (Ej. Comp. 11)	0,84
Solución de DOX (Ej. Comp. 12)	0,12

Para el Ejemplo comparativo 12, la dosis se ha corregido dividiendo el AUC obtenida para 5 mg/kg por 5.

**Ejemplo 10**

Efecto de la adición de un polímero que tiene un grupo hidrófobo

1) Preparación de micelas mixtas

Se usó MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX) (Ejemplo comparativo 6) que contenía 39 moléculas de DOX en un polímero. Se pesó en un vial de muestra de forma precisa una cantidad de entre 10-20 mg de cada uno de este conjugado y PEG-



PBLA (60% Bn) (12-40) que tiene un grupo hidrófobo preparado en el Ejemplo comparativo 11 para dar una relación en peso de 1:1, y luego se añadió 1 ml de diclorometano al mismo para disolver totalmente el polímero. A continuación, bajo la corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente para preparar un polímero en forma de película. A continuación, se secó a presión reducida a temperatura ambiente durante 1 hora, se añadió tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4)/glucosa al 5% (p/v) hasta una concentración de polímero de 10 mg/ml para hidratar la película de polímero a 4°C. Después de agitar durante la noche a 4°C, se sometió a tratamiento por ultrasonidos en agua enfriada con hielo durante 10 minutos usando un Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). Seguidamente, se filtró con un filtro de 0,22 µm (Millipore, Millex™ GP PES) para preparar micelas del filtrado, que se usaron en el siguiente experimento.

## 10 2) Estudio farmacocinético de la rata y el resultado

En un procedimiento similar al del Ejemplo 8, se administraron por vía intravenosa las micelas anteriores en una dosis de 1 mg/kg en términos de la cantidad de DOX. Determinando cambios en la concentración en plasma, se calculó que el AUC era 12,4 µg/ml·h, indicando una mejora del AUC de aproximadamente 10 veces al compararla con la que se obtiene cuando se usa únicamente conjugado DOX-polímero en la preparación (descrito en el Ejemplo comparativo 13). El resultado de muestra que añadiendo un copolímero de bloques que tiene un grupo hidrófobo, se puede mejorar la estabilidad de micelas de conjugado DOX-polímero en la sangre.

### Ejemplo 11

Estudio sobre la dependencia del pH de la liberación de fármaco

Se pesaron con exactitud aproximadamente 10 mg del polímero obtenido en el Ejemplo 5 en un vial de muestra, al que se añadió 1 ml de diclorometano para disolver totalmente el polímero. A continuación, bajo una corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente para preparar el polímero en forma de película. A presión reducida, se secó adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se añadió tampón fosfato sódico 20 mM (pH 7,4) hasta una concentración de polímero de 10 mg/ml para hidratar la película de polímero a 4°C. Después de agitar durante la noche a 4°C, se sometió a tratamiento por ultrasonidos en agua enfriada con hielo durante 10 minutos usando un Biodisruptor (Nihonseiki Kaisha Ltd., Unidad de Alta Potencia). Seguidamente, se filtró con un filtro de 0,22 µm (Millipore, Millex™ GP PES) para preparar micelas del filtrado, que se usaron en el siguiente experimento.

A 950 µl de tampón formiato amónico 20 mM (pH 3), tampón acetato sódico (pH 5) o tampón fosfato sódico (pH 7,4) previamente calentado hasta 37°C, se añadieron 50 µl de las micelas poliméricas preparadas en el procedimiento anterior para iniciar un experimento de liberación de fármaco. A intervalos de tiempo predeterminados, se recogieron 50 µl de la muestra y en lugar de la cantidad de líquido, se repuso con el mismo tampón. La concentración libre de DOX en la muestra recogida se determinó por HPLC de acuerdo con el procedimiento antes citado.

El resultado se muestra en la Fig. 4. Mientras que la DOX se liberó rápidamente a pH 3, la velocidad de liberación disminuyó cuando el pH del líquido se hacía neutro hasta pH 5 a 7,4, confirmando de este modo la dependencia del pH.

### 35 Ejemplo 12

Estudio de la eficacia del fármaco

Se usaron células PC-3 de cáncer de próstata humano subcutáneas transplantadas a ratones atímicos macho como modelo para evaluar la eficacia del fármaco.

Se adquirieron ratones atómicos macho (Balb nu/nu, 5 semanas) de Charles River Laboratories Japan, Inc., y se adquirieron células PC-3 de cáncer de próstata humano de Human Health Sciences Foundation Resources Bank. Las células PC-3 que se habían subcultivado en un incubador de CO<sub>2</sub> se suspendieron en solución salina para inyección (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) y se inyectaron subcutáneamente en el lomo de los ratones atímicos hasta un recuento celular de  $2 \times 10^6$  / 50 µl por animal. A continuación, después de mantener el ratón atímico durante aproximadamente 2 semanas, se inició la administración del fármaco cuando el volumen medio del tumor alcanzaba aproximadamente 50 mm<sup>3</sup>. Los conjugados de DOX-polímero (dos pautas de tratamiento: Ejemplo 5 y Ejemplo comparativo 6) se administraron en la vena caudal (cada 4 días durante un total de 3 veces) y se valoró el efecto antitumoral a partir del volumen del tumor, y los efectos secundarios a partir de los cambios en el peso corporal (8 animales por grupo). A efectos de comparación, se usaron la solución de DOX (Ejemplo comparativo) y los liposomas que encapsulan DOX (Ejemplo comparativo 10). La cantidad administrada de cada preparación fue la MTD (Ejemplos comparativos 6, 10, 12) determinada previamente usando ratones sanos normales o 2/3 de la cantidad (Ejemplo 5).

En las Fig. 5 y Fig. 6 se muestran los cambios en el volumen del tumor y en el peso corporal. En el caso de la solución de DOX (Ejemplo comparativo 12), el peso corporal disminuyó hasta un máximo de 17% en la MTD de 5 mg/kg y el efecto de la inhibición del crecimiento del tumor fue T/C = 0,4 en el máximo [T/C: la relación del volumen de tumor del grupo de administración de fármaco (T) respecto a la del grupo control (C)]. En el caso de liposomas (Ejemplo comparativo 10), persistía hasta la finalización del experimento una reducción en el peso corporal del 20% o superior en la MTD de 5 mg/kg y la inhibición del tumor creció hasta T/C = 0,43. En el caso de conjugado de DOX-polímero

- (Ejemplo comparativo 6), el peso corporal disminuyó en un máximo de 13% en 15 mg/kg, y la inhibición del tumor hasta T/C = 0,42. En el Ejemplo 5, el peso corporal se redujo un máximo de 15% en MTD x 2/3 de 11 mg/kg, mientras que cambió y comenzó a aumentar el día 16 después de la administración y a continuación y presentó el efecto de inhibición del crecimiento del tumor hasta T/C = 0,32. Los resultados anteriores indican que el conjugado de DOX-polímero (Ejemplo 5) tiene un excelente efecto antitumoral cuando se compara con la solución de DOX o con los liposomas que encapsulan DOX.

### Ejemplo 13

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn)

- Salvo porque se cambió la relación de equivalentes de la hidrazina anhidra, el polímero se sintetizó en base al procedimiento de síntesis descrito en el Ejemplo 2. De forma específica, se añadieron 79,3  $\mu$ l (2,5 mmol, Mw = 32,05) de hidrazina anhidra, 0,25 veces los equivalentes respecto al éster bencílico (10 equivalentes con respecto al copolímero de bloques) en 5 g (0,25 mmol) de MeO-PEG-PBLA (12-40) para obtener un polímero en polvo (MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn)). El compuesto obtenido se confirmó que era el compuesto de interés llevando a cabo la acetilación del grupo hidrazida igual que en el Ejemplo 2, seguido por RMN de  $^1$ H. La cadena lateral de poli(ácido aspártico) por molécula de polímero tenía 10 grupos hidrazida (q), 26 grupos éster bencílico (p) y 4 COOH (n).

### Ejemplo 14

Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn)

- Se disolvieron 500 mg de MeO-PEG-pAsp (Hyd, Bn) obtenido en el Ejemplo 13 en 5 ml de DMSO deshidratado, al que se añadieron el doble de equivalentes de hidrocloreto de doxorubicina (DOX, MW = 580) con respecto al grupo hidrazida (20 equivalentes respecto al copolímero de bloques) y se dejó reaccionar a 37°C en la oscuridad durante 3 días. Después de la reacción, se purificó del mismo modo que en el Ejemplo 5 para obtener un conjugado de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn)). El resultado de la HPLC indicó que la cantidad de hidrocloreto de doxorubicina por molécula del conjugado de polímero era de 9.

### Ejemplo 15

- 25 Síntesis de MeO-PEG-pAsp (Hyd-EPI, Bn)

- Salvo porque se reemplazó hidrocloreto de doxorubicina por hidrocloreto de epirubicina, se siguió un procedimiento similar al del Ejemplo 14 en el que se añadieron el doble de equivalentes de hidrocloreto de epirubicina (en lo sucesivo denominada EPI, MW = 580) con respecto al grupo hidrazida (20 equivalentes con respecto al copolímero de bloques), y se dejó reaccionar durante 3 días para obtener un conjugado de hidrocloreto de epirubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd -EPI, Bn)). El resultado de la HPLC indicó que la cantidad de hidrocloreto de epirubicina por molécula del conjugado de polímero era de 9.

### Ejemplo 16

Estudio farmacocinético en la rata usando MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn) y MeO-PEG-pAsp (Hyd-EPI, Bn)

- 35 Usando el conjugado de hidrocloreto de doxorubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn)) obtenido en el Ejemplo

14 y el conjugado de hidrocloreto de epirubicina-polímero (MeO-PEG-pAsp (Hyd-EPI, Bn)) obtenido en el Ejemplo 15, se prepararon micelas de igual modo que en el Ejemplo 8, y se sometieron a un estudio farmacocinético en la rata. La medida de la concentración plasmática de EPI se llevó a cabo del mismo modo que la medida de la concentración de DOX descrita en el Ejemplo 8.

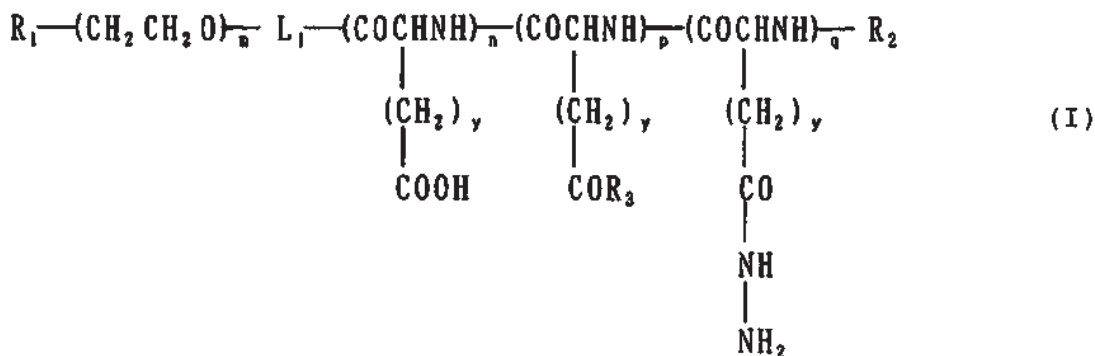
- 40 Como resultado, para MeO-PEG-pAsp (Hyd-DOX, Bn), cuando se administró en la vena caudal 1 mg/ml en términos de la cantidad de DOX, el AUC fue 142  $\mu$ g/ml·h, indicando que esta conjugado tenía una excelente retención en la sangre cuando se compara con el Ejemplo 8. Igualmente para MeO-PEG-pAsp (Hyd-EPI, Bn), cuando se administró en la vena caudal 1 mg/ml en términos de la cantidad de EPI, el AUC fue 132  $\mu$ g/ml·h, indicando también que este tenía una excelente retención en la sangre.

- 45 Por otro lado, cuando se pesan de forma precisa 10 mg de hidrocloreto de epirubicina (Shandong Newtime Pharmaceuticals) al que se añadió una solución de glucosa al 5%(p/v) y se disolvió totalmente, y se administró 1 mg/kg de éste en la vena caudal, el AUC fue de 0,04  $\mu$ g/ml·h.

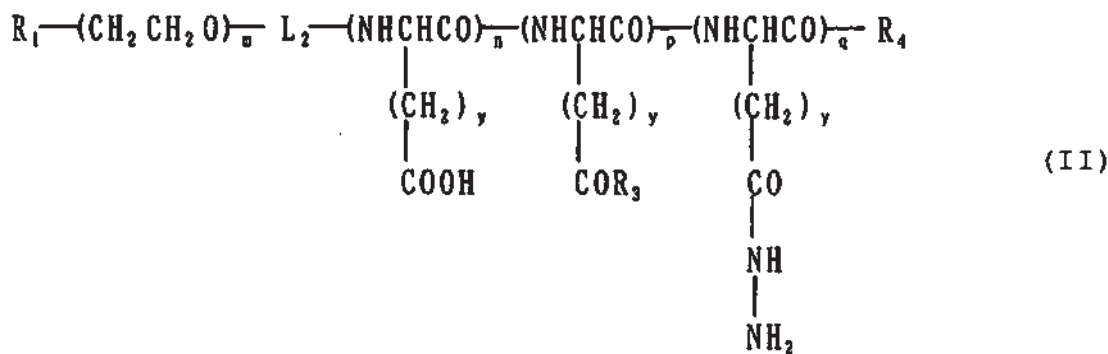
- 50 Estos intervalos temporales de concentración de fármaco en el plasma después de administración intravenosa se muestran en la Fig. 7. Cuando se compara con la solución de hidrocloreto de epirubicina, tanto el conjugado de polímero de DOX y de EPI presentaron concentraciones persistentes en plasma, indicando que éstos tenían una excelente retención en la sangre al compararlos con los Ejemplos comparativos.

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero de bloques para un conjugado de fármaco, comprendiendo dicho copolímero una región de polímero soluble en agua que consiste en polietilenglicol y una región de poliaminoácido que tiene un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo en la cadena lateral, comprendiendo el copolímero de bloques la siguiente estructura:



5  
o



en la que

10 R<sub>1</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo, o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal, ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

15 R<sub>3</sub> representa -O-R<sub>5</sub> o -NH-R<sub>5</sub> en el que R<sub>5</sub>, que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo, y

R<sub>4</sub> representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquiloxi,

L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> independientemente uno de otro representan un enlazador,

m representa un número entero de 5-1000,

n representa un número entero de 0-1000,

20 p representa un número entero de 1-1000, y

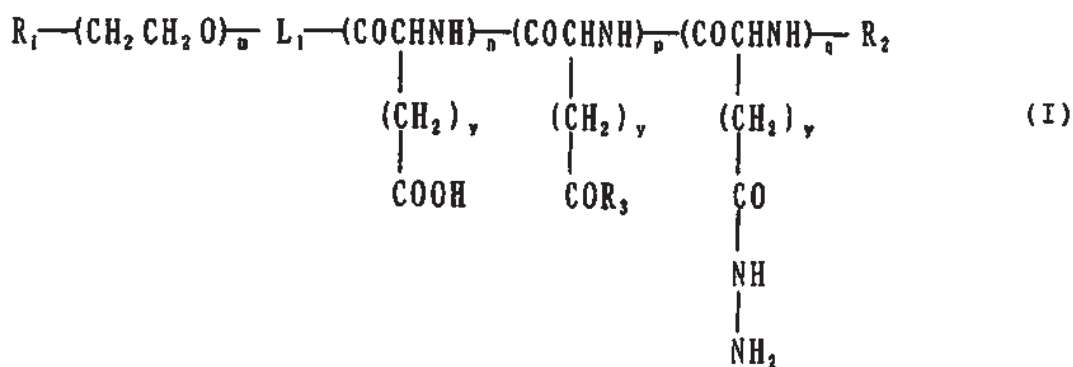
q representa un número entero de 1-1000,

25 con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región de poliaminoácido, y



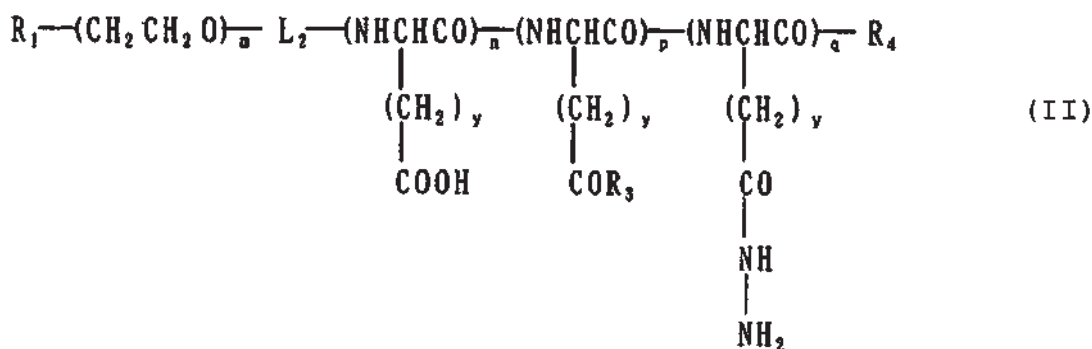
y representa un número entero de 1 ó 2.

2. El copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyen 25% o más hasta 75% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques.
- 5 3. El copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R<sub>5</sub> es un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo C<sub>4</sub>-fenilo y un grupo alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>.
- 10 4. Un copolímero de bloques conjugado con un fármaco en el que un fármaco que tiene una estructura cetónica se ha unido al grupo hidrazida del copolímero de bloques para un conjugado de fármaco de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. El copolímero de bloques conjugado con un fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.
- 15 6. El copolímero de bloques conjugado con un fármaco de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 50% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.
7. El copolímero de bloques conjugado con un fármaco de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 40% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.
- 20 8. El copolímero de bloques conjugado con un fármaco de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocóloruro de doxorubicina, hidrocóloruro de daunorubicina, hidrocóloruro de epirubicina, pirarrubicina, hidrocóloruro de idarrubicina, hidrocóloruro de amrubicina, nemorubicina y PNU-159682.
- 25 9. Una composición farmacéutica de micelas poliméricas que comprende una región polimérica soluble en agua que consiste en polietilenglicol como cubierta externa y una región hidrófoba global que consiste en poliaminoácidos y/o derivados de los mismos como cubierta interna, teniendo dicha región hidrófoba global un fármaco unido a un grupo hidrazida y un grupo hidrófobo, en el que dicho fármaco unido a un grupo hidrazida y el grupo hidrófobo pueden estar presentes en la región hidrófoba global en el mismo copolímero de bloques, o en la región hidrófoba global en un copolímero de bloques distinto, estando unido el fármaco al grupo hidrazida en el copolímero de bloques de la fórmula siguiente:



30

o



en la que

5  $R_1$ , que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo  $C_{1-C_{12}}$  lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

$R_2$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

$R_3$  representa  $-O-R_5$  o  $-NH-R_5$  en el que  $R_5$ , que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo,

10  $R_4$  representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquilo,

$L_1$  y  $L_2$  independientemente uno de otro representa un enlazador,

$m$  representa un número entero de 5-1000,

$n$  representa un número entero de 0-1000,

$p$  representa un número entero de 1-1000, y

15  $q$  representa un número entero de 1-1000,

con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan 20% o más hasta menos de 90% de las unidades totales de los poliaminoácidos en el copolímero de bloques y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región poliaminoácido, y cuando no haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrazida en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda la región poliaminoácido, e

20

y representa un número entero de 1 ó 2.

25 **10.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyen 25% o más hasta 75% o menos de las unidades totales de poliaminoácidos en el copolímero de bloques.

**11.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que  $R_5$  es un grupo hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en un grupo bencilo, un grupo fenilo, un grupo  $C_4$ -fenilo y un grupo alquilo  $C_6-C_{16}$ .

30 **12.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que al grupo hidrazida del copolímero de bloques anterior se ha unido un fármaco que tiene una estructura cetónica.

**13.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.

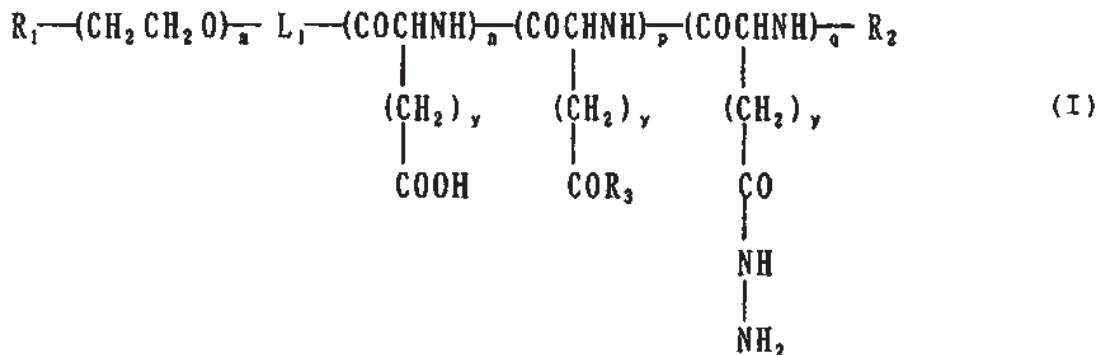
35 **14.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 50% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.

**15.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico está unido a un número igual a 10% o más hasta 40% o menos de las unidades totales de los poliaminoácidos.

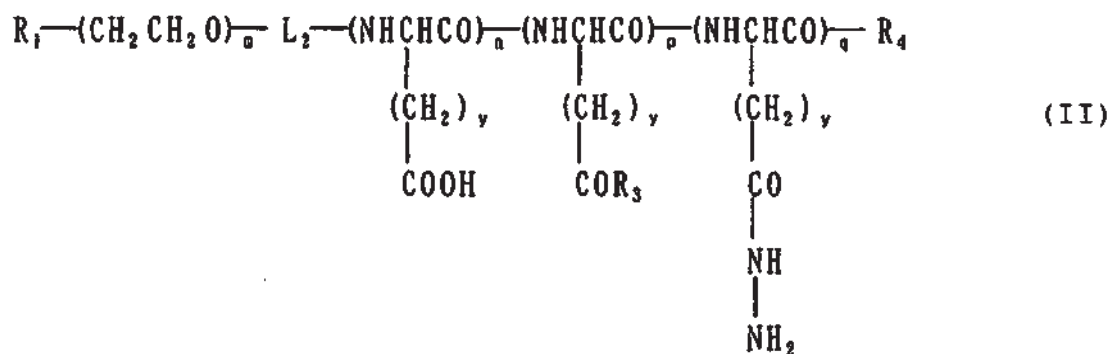
16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocóloruro de doxorubicina, hidrocóloruro de daunorubicina, hidrocóloruro de epirubicina, pirarubicina, hidrocóloruro de idarrubicina, hidrocóloruro de amrubicina, nemorubicina y PNU-159682.

5 17. La composición farmacéutica que comprende:

(1) un copolímero de bloques en el que el fármaco está unido al grupo hidrazida de la fórmula siguiente:



o



10

en la que

15  $R_1$ , que puede ser igual o distinto, representa un átomo de hidrógeno, un grupo metoxi, un grupo metilo o un grupo alquilo  $C_1-C_{12}$  lineal o ramificado o cíclico sustituido, en el que el sustituyente representa un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo maleimida, un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo hidroxilo y un grupo éster activo que puede estar protegido,

$R_2$  representa un átomo de hidrógeno, un grupo carbonilo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo arilcarbonilo,

$R_3$  representa  $-O-R_5$  o  $-NH-R_5$  en el que  $R_5$ , que puede ser igual o distinto, representa un grupo hidrófobo, y  $R_4$  representa un grupo hidroxilo, un grupo oxo alifático  $C_1-C_{30}$  saturado o no saturado o un grupo aril inferior alquilo,

$L_1$  y  $L_2$  independientemente uno de otro representa un enlazador,

20 m representa un número entero de 5-1000,

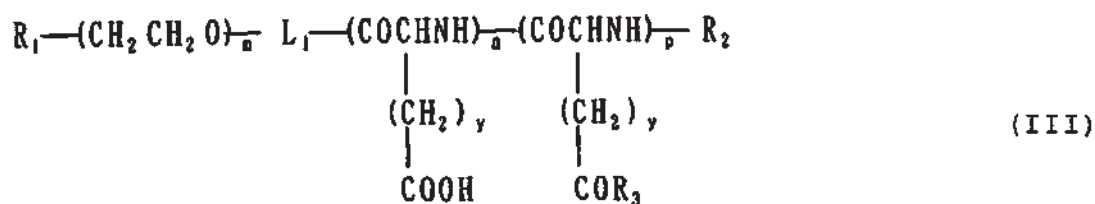
n representa un número entero de 0-1000,

p representa un número entero de 1-1000,

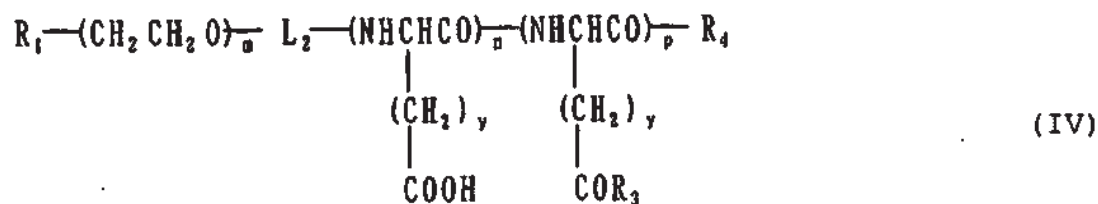
q representa un número entero de 1-1000, y

y representa un número entero de 1 ó 2, y

25 (2) el siguiente copolímero de bloques:



o



5 en el que

10  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $p$  e  $y$  son como se definen en las fórmulas (I) y (II), con la condición de que cuando las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral constituyan de 50% a 100% de las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral más las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral y haya presentes unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, entonces las unidades que tienen un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral y las unidades que tienen un grupo hidrófobo en la cadena lateral están distribuidas al azar en toda región poliaminoácido o en los bloques.

18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que el fármaco tiene una estructura cetónica.

15 19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el fármaco que tiene una estructura cetónica es un fármaco anticanceroso antraciclínico.

20. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el fármaco anticanceroso antraciclínico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de doxorubicina, hidrocloreuro de daunorubicina, hidrocloreuro de epirubicina, pirarrubicina, hidrocloreuro de idarrubicina, hidrocloreuro de amrubicina, nemorrubicina y PNU-159682.

Fig.1

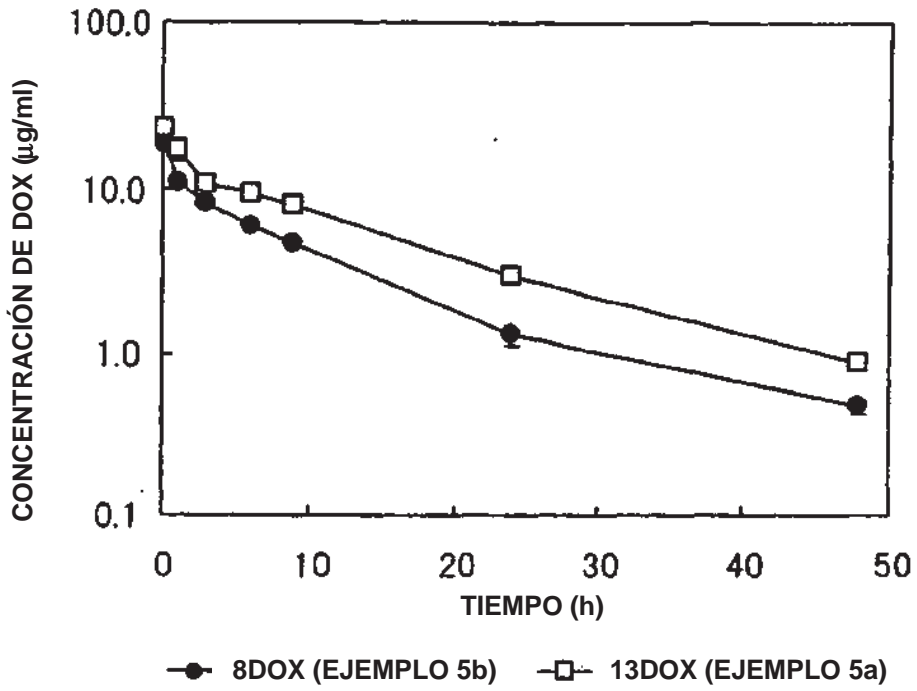


Fig.2

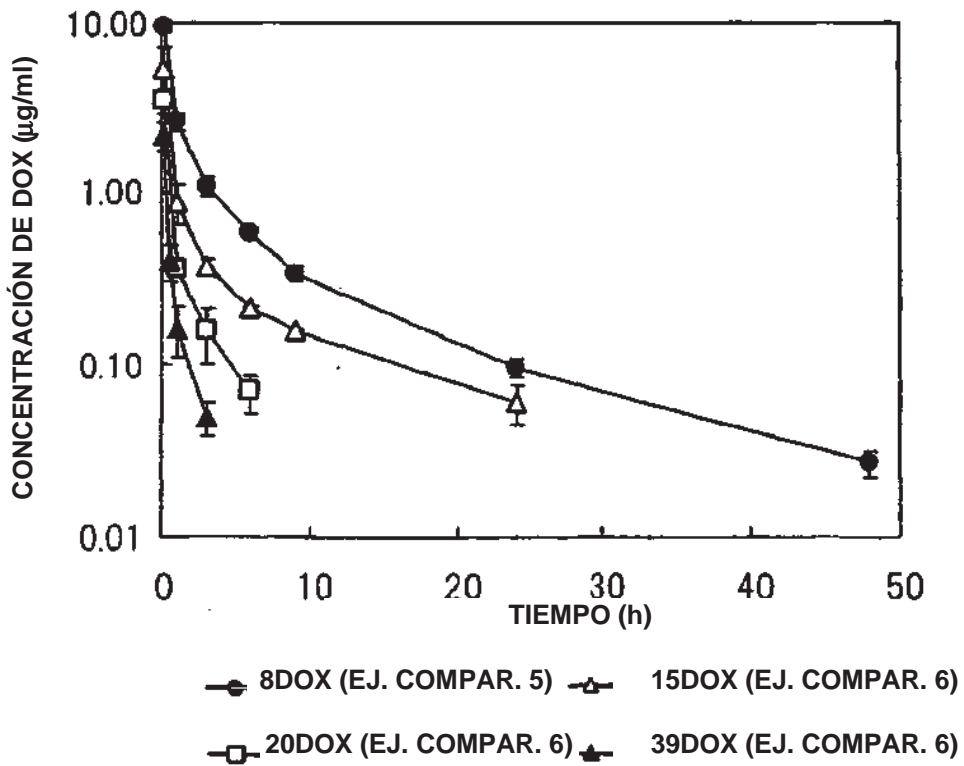
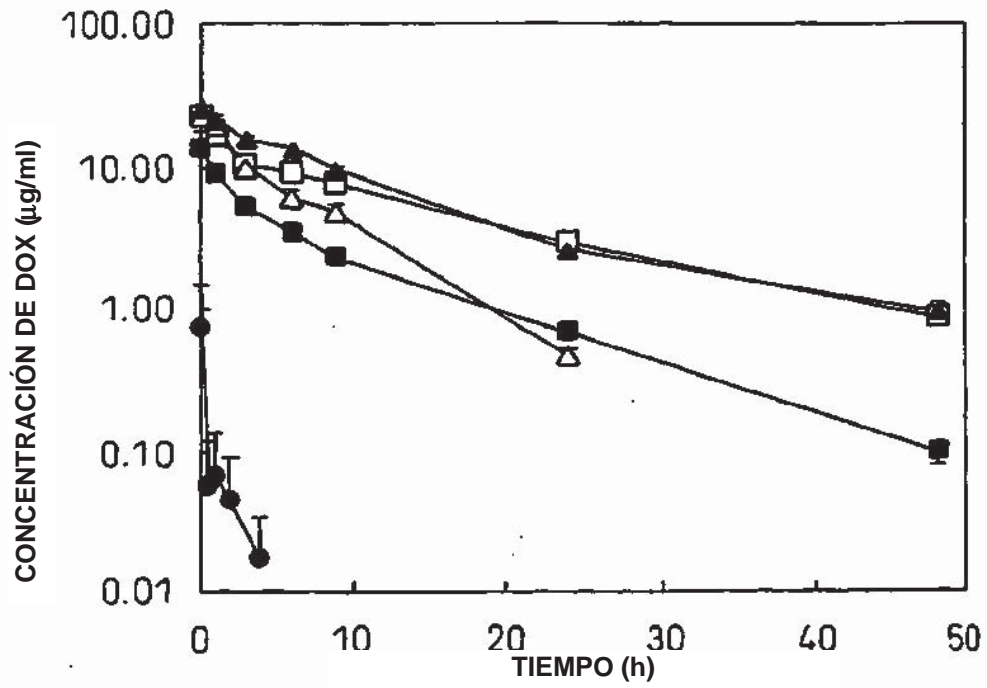


Fig.3



- 
-

Fig.4

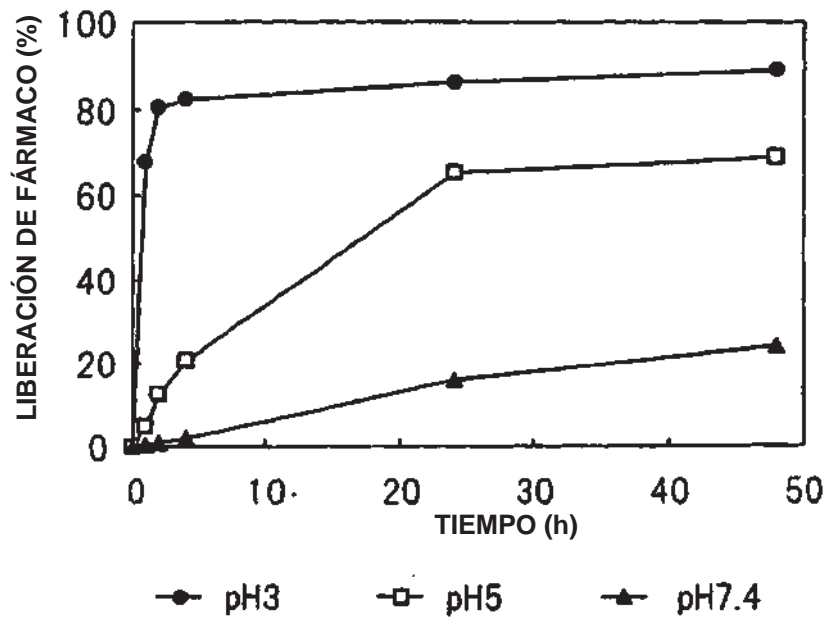


Fig.5

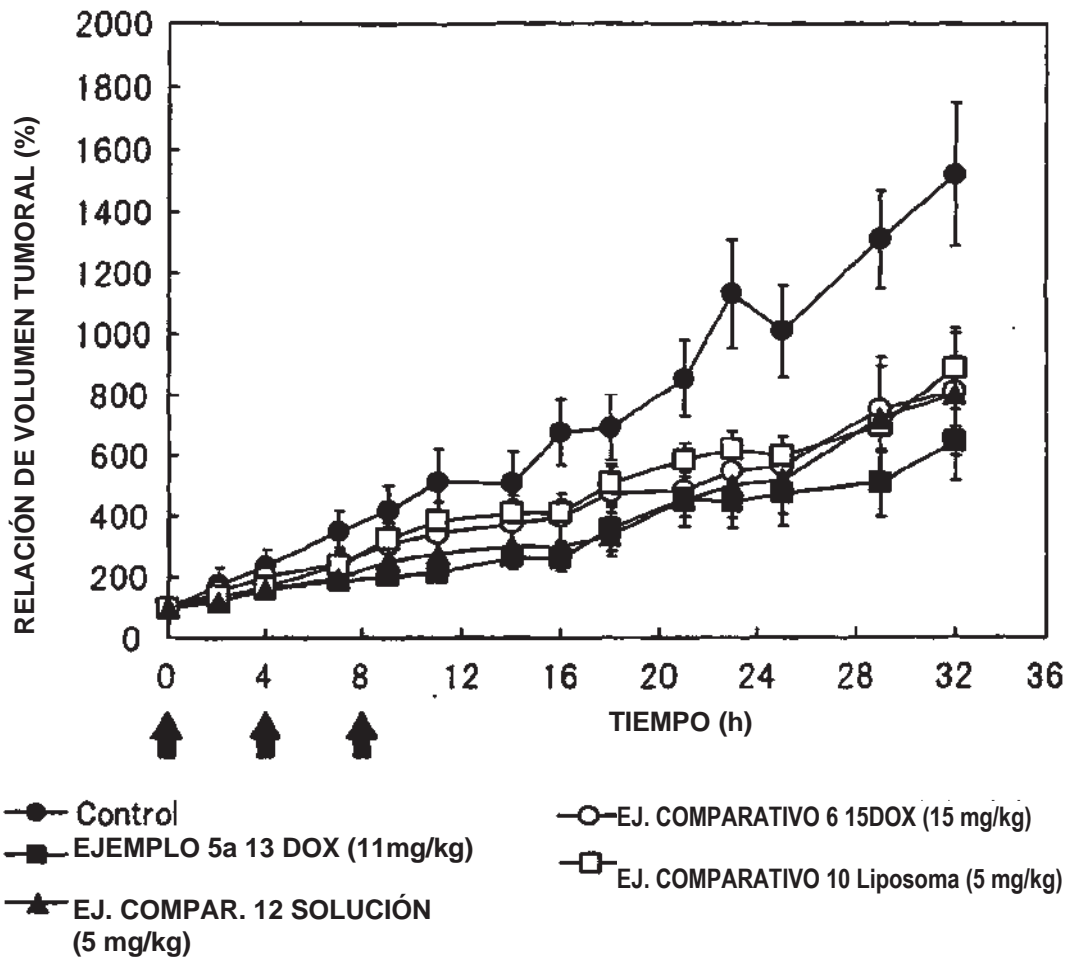
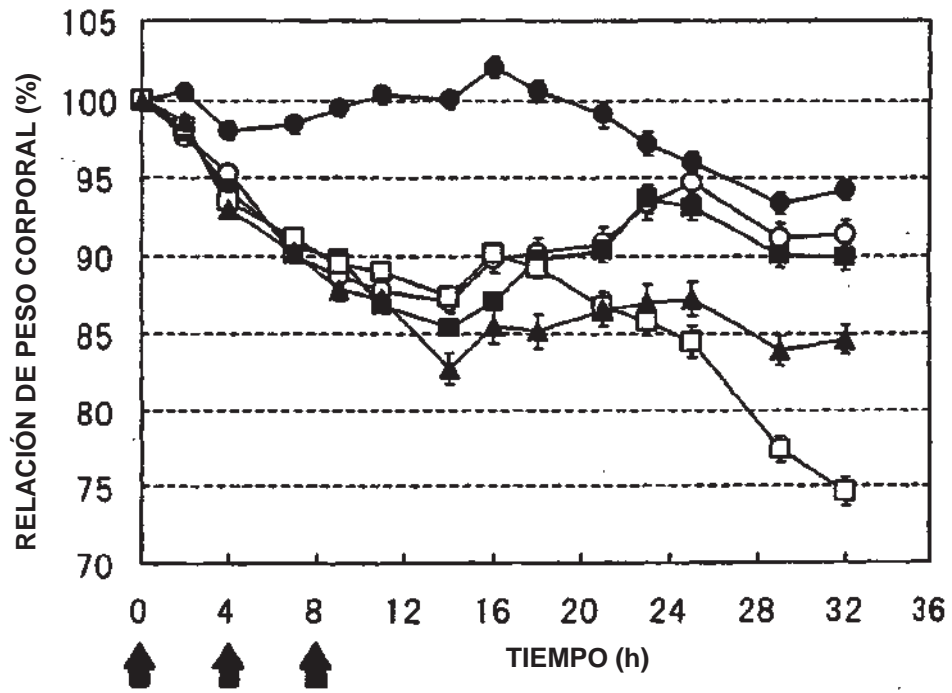




Fig.6



- Control
- EJEMPLO 5a 13 DOX (11 mg/kg)
- ▲ EJ. COMPAR. 12 SOLUCIÓN (5 mg/kg)
- EJ. COMPARATIVO 6 15DOX (15 mg/kg)
- EJ. COMPARATIVO 10 Liposoma (5 mg/kg)

Fig.7

