

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 411**

51 Int. Cl.:  
**C07H 19/073** (2006.01)  
**A61K 31/706** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05857322 .1**  
96 Fecha de presentación: **23.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1761551**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS DE DERIVADOS DE LA GEMCITABINA.**

30 Prioridad:  
**30.06.2004 FR 0451365**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.01.2012**

73 Titular/es:  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
3, rue Michel-Ange  
75794 Paris Cedex 16, FR;  
UNIVERSITE PARIS-SUD (PARIS 11) y  
ROCCO, FLAVIO**

72 Inventor/es:  
**ROSILIO, Véronique;  
RENOIR, Jack-Michel;  
COUVREUR, Patrick;  
Rocco, Flavio;  
Cattel, Luigi y  
Stella, Barbara**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

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).

ES 2 371 411 T3

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de derivados de la gemcitabina.

- 5 La presente invención tiene como objetivo proponer nuevos derivados de la 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina (gemcitabina) particularmente interesantes por su aptitud para organizarse en estado de nanopartículas.

10 La gemcitabina es un agente anticancerígeno, análogo a la desoxicitidina, activo contra los tumores sólidos de tipo cáncer de colon, de pulmón, de páncreas, de pecho, de vejiga, de ovarios, etc. (Hertel L.W. *et al.*, Cancer Res., 50; 1990, 4417-4422 y Plunkett W. *et al.*, Anticancer Drugs, 6 (Supl. 6); 1995, 7-13). Su estructura química es similar a la de la citarabina (Ara-C), con la excepción de la presencia de dos átomos de flúor geminales localizados en la posición 2' del azúcar desoxirribosa. Esta diferencia estructural tiene por efecto ventajoso aumentar la lipofilia y la permeación membranaria de la molécula de gemcitabina en comparación con la de la citarabina, y por lo tanto conferirle una toxicidad más elevada (Heinemann V. *et al.*, Cancer Res., 48; 1988, 4024-4031).

15 El mecanismo de acción de la gemcitabina se puede explicar como sigue.

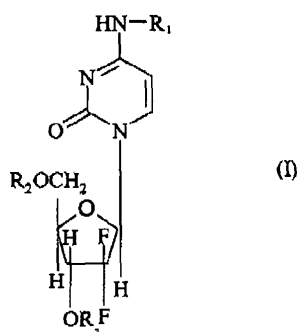
20 La gemcitabina se activa a nivel intracelular mediante fosforilación en la posición 5' por acción de la desoxicitidina-quinasa, y se transforma así en su derivado trifosfato. Éste se incorpora entonces en la cadena del ADN en replicación con, como consecuencia, la parada de la elongación de la cadena y la muerte de la célula (Plunkett W. *et al.*, Semin. Oncol., 22 (4 Supl. 11); 1995, 3-10).

25 Sin embargo, la gemcitabina se metaboliza paralelamente, mediante la acción de la desoxicitidina desaminasa, localizada principalmente en la sangre, el hígado y el riñón, en su derivado uracilo que es totalmente inactivo (Heinemann V. *et al.*, Cancer Res., 52; 1992, 533-539). En consecuencia, cuando la gemcitabina se administra por vía intravenosa, posee una actividad anticancerígena no óptima debido a su semi-vida plasmática significativamente reducida (Storniolo A.M. *et al.*, Semin. Oncol., 24 (2 Supl. 7); 1997, S7-2-S7-7).

30 Para proteger la gemcitabina contra esta desaminación, se ha propuesto acoplar de manera covalente su radical amino en la posición 4 con una cadena acíclica. Esta alternativa se considera en particular en la patente EP 986 570 que describe unos ésteres y amidas de la gemcitabina en los que los grupos 3'- y/o 5'-OH y/o el grupo N4-aminado son derivatizados con unas cadenas saturadas o mono-insaturadas de C<sub>18</sub> a C<sub>20</sub>. Sin embargo, el aumento de la actividad anticancerígena observada con estos derivados lipófilos en comparación con la gemcitabina se obtiene, en este caso, en detrimento de su solubilidad en medio acuoso. En efecto, debido a su carácter tan lipófilo, estos derivados son difícilmente compatibles con una administración intravenosa.

35 La presente invención tiene precisamente por objetivo proponer nuevos derivados de la gemcitabina dotados de una actividad anticancerígena superior a la gemcitabina debido a una estabilidad significativa a la metabolización y de una semi-vida plasmática prolongada y que sean sin embargo compatibles con una administración parenteral y en particular intravenosa.

Más precisamente, la presente invención se refiere según un primer aspecto, a un derivado de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina de fórmula general (I):



45 en la que:

50 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un radical acilo hidrocarbonado por lo menos de C<sub>18</sub> acíclico, no lineal, e insaturado y de tal conformación que es capaz de conferir a dicho compuesto de fórmula general (I), una forma compactada en particular de tipo nanoparticulada, en un medio disolvente polar,

siendo dicho radical hidrocarbonado un radical escualenoilo o un derivado de éste, y siendo uno por lo menos de los

grupos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  diferente de un átomo de hidrógeno.

La presente invención se refiere según otro de sus aspectos, a unas nanopartículas de derivados de gemcitabina de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere según otro de sus aspectos a un procedimiento de preparación de estas nanopartículas, caracterizado porque comprende:

- la solubilización de un derivado de la gemcitabina según la invención en por lo menos un disolvente orgánico a una concentración suficiente para obtener, durante la adición de la mezcla resultante, bajo agitación, en una fase acuosa, la formación instantánea de nanopartículas de dicho derivado en suspensión en dicha fase acuosa y, llegado el caso,
- el aislamiento de dichas nanopartículas.

La presente invención se refiere asimismo según otro de sus aspectos a la utilización de estos derivados y nanopartículas para la preparación de una composición farmacéutica dotada de una actividad anticancerígena o antivírica.

Se refiere además a una composición farmacéutica que comprende, a título de materia activa, por lo menos un derivado de acuerdo con la presente invención, en particular en forma de nanopartículas.

De manera inesperada, los inventores han constatado así que el acoplamiento covalente de la gemcitabina con por lo menos una molécula de un radical hidrocarbonado, por lo menos de  $C_{18}$  acíclico, no lineal, e insaturado, permitía, con la condición de que este radical hidrocarbonado posea una conformación apta para organizarse en forma compactada en un medio disolvente polar, acceder a unas nanopartículas a base de gemcitabina, siendo dicho radical hidrocarbonado un radical escualenoilo o un derivado de éste.

Los derivados de gemcitabina son ventajosos por varias razones.

Por su carácter tan hidrófobo e insoluble en agua, son capaces de organizarse espontáneamente en estado de partículas mediante nanoprecipitación.

Teniendo en cuenta el tamaño pequeño de sus partículas, se pueden administrar en forma de una suspensión acuosa por vía intravenosa y por lo tanto son compatibles con la microcirculación vascular.

Los derivados hidrocarbonados de  $C_{18}$  considerados según la invención se fijan generalmente mediante un enlace covalente a nivel de un grupo 3'- y/o 5'-OH y/o del grupo 4-amino de la gemcitabina.

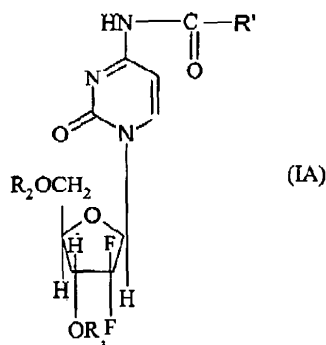
Convienen muy particularmente a la invención los derivados hidrocarbonados acíclicos, no lineales e insaturados, en particular tal como los derivados terpénicos tales como por ejemplo el escualeno y sus derivados.

Ventajosamente, este derivado hidrocarbonado es un ácido carboxílico. En tal caso, este enlace covalente es más particularmente de naturaleza éster en el caso de los grupos 3' o 5'-OH, y amida en el caso del grupo 4-amino.

Evidentemente, los derivados de gemcitabina según la presente invención pueden ser unos derivados que comprenden dos derivatizaciones, incluso tres derivatizaciones, pudiendo ser éstas idénticas o diferentes.

Según una variante particular de la invención, los derivados según la invención poseen por lo menos un derivado acilo hidrocarbonado a nivel del grupo 4-amino. Está entonces representado por el radical  $R_1$ .

Más particularmente, los derivados de gemcitabina de la invención responden a la fórmula general (IA):



en la que  $R_2$  y  $R_3$  son tal como los definidos anteriormente, y  $R'_1$  representa un radical escualenoilo o un derivado de éste.

En el sentido de la invención, el término derivado de escualenoilo entiende abarcar los derivados de sustitución del radical escualenoilo en la medida en la que la presencia de este o de estos sustituyentes no tiene incidencia significativa sobre la conformación de origen del radical. En otras palabras, el radical debe de conservar su aptitud para compactarse o también para provocar una disminución significativa de la tensión superficial o también de la caída rápida de la tensión superficial, cuando se pone en presencia, a partir de una cierta concentración, con un disolvente polar. Este fenómeno se ilustra en particular en las figuras 1 ó 2.

Más particularmente,  $R_2$  y  $R_3$  pueden representar entonces un átomo de hidrógeno.

La presente invención se refiere muy particularmente al derivado 4-(N)-escualenoilgemcitabina (SQgem).

De manera inesperada, los inventores han constatado así que los derivados de acuerdo con la presente invención y que comprenden, a título de radical hidrocarbonado, un radical escualenoilo, resultaban particularmente sensibles a la polaridad de los disolventes, tal como el escualeno. Han constatado así que la puesta en presencia de estos derivados de gemcitabina con un disolvente polar tal como el agua por ejemplo, conducía a la formación espontánea de partículas a escala del nanómetro y por lo tanto, ventajosamente, compatibles con una administración intravenosa.

Las nanopartículas de los derivados de gemcitabina según la presente invención son accesibles con la ayuda de la tecnología clásica de nanoprecipitación tal como la descrita en Fessi H. *et al.*, Int. J. Pharm., 55; 1989, R1-R4.

Más precisamente, las nanopartículas según la invención se obtienen mediante solubilización de un derivado de acuerdo con la presente invención en un disolvente orgánico tal como la acetona y/o el etanol. La adición de la mezcla, así obtenida, en una fase acuosa bajo agitación conduce instantáneamente a la formación de las nanopartículas esperadas en presencia o no de tensioactivo(s).

De manera ventajosa, el procedimiento no requiere la presencia obligatoria de tensioactivo(s) para obtener unas nanopartículas de acuerdo con la invención. Esta propiedad es particularmente apreciable en la medida en la que un gran número de tensioactivos no son compatibles con una aplicación *in vivo*.

Sin embargo, se entiende que la utilización de tensioactivos, de forma general ventajosamente desprovistos de cualquier toxicidad, se puede prever en el ámbito de la presente invención. Este tipo de tensioactivo puede por otra parte permitir acceder a unos tamaños aún más reducidos durante la formación de las nanopartículas.

A título ilustrativo y no limitativo de este tipo de tensioactivos susceptibles de ser utilizados en la presente invención, se pueden citar en particular unos copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, unos derivados fosfolipídicos y unos derivados lipófilos del polietilenglicol. Como derivado lipófilo del polietilenglicol, se puede mencionar por ejemplo el polietilenglicol colesterol.

Como ejemplo de copolímeros bloques polioxietileno-polioxipropileno, se pueden citar más particularmente los copolímeros tribloques polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno, también denominados Poloxamers<sup>®</sup>, Pluronic<sup>®</sup> o Synperonic<sup>®</sup>, y que son comercializados en particular por la compañía BASF. Emparentados con estas familias de copolímeros, se pueden utilizar asimismo los Poloxamines<sup>®</sup>, que están constituidos por segmentos hidrófobos (a base de polioxipropileno), por segmentos hidrófilos (a base de polioxietileno) y por una parte central que se deriva del motivo etilendiamina.

La suspensión coloidal de partículas se puede conservar tal cual, incluso evaporada de manera que se concentran las nanopartículas según la invención.

De manera general, las nanopartículas así obtenidas poseen un tamaño medio en peso comprendido entre 30 y 500 nm, y particularmente entre 50 y 250 nm, en particular entre 70 y 200 nm, e incluso entre 100 y 175 nm, medida mediante difusión de la luz con la ayuda del nanosizer Coulter<sup>®</sup> N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA.

Esta aptitud de los derivados según la invención para conducir a la formación de nanopartículas es, claramente, el resultado de un comportamiento específico de estos derivados en medio acuoso. Así, como se desprende de los ejemplos que aparecen a continuación, un derivado 4-(N)-escualenoilgemcitabina posee un comportamiento muy diferente de la gemcitabina o de un derivado 4-(N)-estearoilgemcitabina en medio acuoso. Sólo el derivado según la invención conduce a una disminución significativa de la tensión superficial del agua.

Los inventores han constatado además que era posible controlar el tamaño de estas partículas a través de la cantidad de derivado de gemcitabina utilizada para la nanoprecipitación. En efecto, el aumento de la concentración de la 4-(N)-escualenoilgemcitabina provoca generalmente un aumento del tamaño, y a la inversa, tal como se

desprende del ejemplo 2 siguiente. Además, y tal como se ha mencionado anteriormente, este tamaño se puede controlar asimismo conduciendo la formación de las nanopartículas en presencia de tensioactivo(s).

Los derivados de acuerdo con la invención están por otro lado dotados de una actividad antitumoral muy superior a la de la gemcitabina. Así, los resultados presentados a continuación muestran claramente que las nanopartículas de 4-(N)-escualenolgemcitabina son cinco a siete veces más tóxicas que la molécula de gemcitabina.

Tal como se ha precisado anteriormente, los compuestos según la invención resultan por lo tanto ventajosos por varias razones, en primer lugar la funcionalización de la gemcitabina en posición 4-amino permite proteger eficazmente la función amina de la acción de la desoxicitidina desaminasa, que es naturalmente responsable de la semivida plasmática reducida de la gemcitabina una vez administrada por vía intravenosa.

Sin embargo, esta protección puede ser en paralelo eficazmente cesada *in vivo* gracias a la acción de las enzimas celulares y conducir a la liberación de la gemcitabina.

Por otra parte, la conjugación de la gemcitabina con un derivado hidrocarbonado de acuerdo con la invención, y más particularmente con el ácido escualénico, confiere a la molécula de la gemcitabina unas características fisicoquímicas suficientes para conferirle una aptitud para formar unas partículas por nanoprecipitación, partículas cuyo tamaño es compatible para una administración parenteral y en particular por vía intravenosa.

Los derivados de acuerdo con la presente invención pueden ser administrados asimismo por todas las vías convencionales. Sin embargo, tal como se ha precisado anteriormente, estas composiciones son particularmente interesantes en particular cuando están en forma nanoparticulada para una administración parenteral.

Otro aspecto de la invención se refiere por lo tanto a una composición farmacéutica que comprende por lo menos, a título de materia activa, un compuesto de acuerdo con la presente invención, en particular en forma de nanopartículas. Los derivados de acuerdo con la presente invención pueden ser asociados en las mismas con por lo menos un vehículo, farmacéuticamente aceptable.

A título de ejemplos de formulaciones farmacéuticas compatibles con las composiciones según la invención, se pueden citar en particular:

- las inyecciones o perfusiones intravenosas;
- las disoluciones salinas o de agua purificada;
- las composiciones para inhalación;
- las composiciones por vía ocular;
- las cápsulas, grageas y tabletas que incorporan a título de vehículos agua, fosfato de calcio, azúcares, tales como lactosa, dactrosa o manitol, talco, ácido esteárico, almidón, bicarbonato de sodio y/o gelatina.

Cuando los compuestos se utilizan en dispersión en una disolución acuosa, pueden ser asociados a unos excipientes de tipo agente secuestrante o quelante, antioxidante, agentes que modifican el pH y/o agentes tampones.

Las nanopartículas según la invención evidentemente son susceptibles de contener en superficie una multitud de funciones reactivas, tal como las funciones hidroxilos o aminas por ejemplo. Por lo tanto, se puede prever fijar a estas funciones cualquier tipo de molécula, en particular mediante unos enlaces covalentes.

A título ilustrativo y no limitativo de este tipo de moléculas susceptibles de ser asociadas a las nanopartículas, se pueden citar en particular las moléculas de tipo marcador, los compuestos susceptibles de asegurar una función de determinación, así como cualquier compuesto apto para conferirles unas características farmacocinéticas particulares. En lo que se refiere a este último aspecto, se puede así prever fijar en superficie de estas nanopartículas unos derivados lipófilos del polietilenglicol, como por ejemplo el polietilenglicol colesterol o el polietilenglicol-fosfatidiletanolamina. Un revestimiento de superficie a base de dicho compuesto es en efecto ventajoso para conferir una remanencia vascular incrementada debido a una reducción significativa de la captura de las nanopartículas por los macrófagos hepáticos.

Además, es posible prever la asociación por vía no covalente de compuestos de acuerdo con la presente invención y/o unas nanopartículas correspondientes con unas moléculas anexas tales como las definidas anteriormente. Esta asociación se puede derivar por ejemplo de fenómenos de adsorción debidos en particular a una afinidad entre los compuestos según la invención y estas otras moléculas.

Así, y tal como se ha ilustrado en el ejemplo 4, el polietilenglicol en forma conjugada con colesterol puede ser

asociado a una molécula de acuerdo con la presente invención. En efecto, teniendo en cuenta la afinidad natural del escualeno por el colesterol, el conjugado polietilenglicol colesterol se asocia, en este caso, con un conjugado escualeno-gemcitabina activa, y conduce así a la formación de nanopartículas revestidas en superficie con polietilenglicol. Por otro lado, y tal como se ha mencionado anteriormente, el conjugado polietilenglicol colesterol actúa ventajosamente, durante el proceso de formación de las nanopartículas de escualeno-gemcitabina como un tensioactivo debido a su comportamiento anfifílico y estabiliza por lo tanto la disolución coloidal que reduce así el tamaño de las nanopartículas formadas.

Además de los compuestos citados, las composiciones farmacéuticas según la invención pueden contener unos agentes de tipo conservantes, unos agentes humectantes, unos agentes solubilizantes, unos agentes de coloración, y los perfumes.

Por razones evidentes, las cantidades en derivados según la invención susceptibles de ser utilizadas en particular con fines anticancerígenos son susceptibles de variar significativamente según el modo de utilización y la vía considerada para su administración.

Por ejemplo, para un tratamiento por vía sistémica, destinado a un paciente de tipo adulto, se puede prever administrar un derivado de acuerdo con la presente invención a una dosis de aproximadamente 0,1 a 150 mg/kg de peso corporal y por día, y más particularmente de 1 a 40 mg/kg por día.

Por el contrario, para una administración tópica, se puede prever formular por lo menos un derivado de acuerdo con la presente invención a razón de 0,1 a 40% en peso, incluso más, con relación al peso total de la formulación farmacéutica considerada.

Es posible asimismo coadministrar por lo menos un derivado de acuerdo con la presente invención con por lo menos otra materia activa susceptible de ser asimismo beneficiosa frente a la patología considerada.

A título representativo de estas materias activas, susceptibles de ser combinadas con los derivados de acuerdo con la presente invención, se pueden citar en particular otras moléculas o macromoléculas anticancerígenas o citostáticas (por ejemplo sales de platino, antraciclinas, venenos del huso mitótico, inhibidores de topoisomerasas, de quinasas o de metaloproteasas), unos agentes antiinflamatorios de tipo corticoide (por ejemplo dexametasona) o no corticoide o también unas moléculas con actividad inmunoadyuvante (por ejemplo anticuerpos con actividad anticancerígena). Se puede prever la asociación con la hipertermia utilizada en algunas quimioterapias. Los derivados de acuerdo con la presente invención pueden ser combinados asimismo a las terapias quirúrgicas y/o a las radiaciones para el tratamiento del cáncer.

Los ejemplos y las figuras presentados a continuación se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo del campo de la invención.

## Figuras

*Figura 1:* Representa la evolución de la tensión superficial ( $\gamma$ ) de disoluciones de gemcitabina (Gem), 4-(*N*)-estearoilgemcitabina (C18gem)) y 4-(*N*)-escualenoilgemcitabina (SQgem) en función de la concentración de las disoluciones.

*Figura 2:* Representa la evolución de la tensión superficial ( $\gamma$ ) de una suspensión de nanopartículas de SQgem (NP SQgem) en función de la concentración.

*Figura 3:* Representa la viabilidad celular en función del tiempo después de la incubación de nanopartículas de SQgem 100  $\mu$ m en dos líneas celulares en presencia y en ausencia de insertos (ensayo MTT) ( $n=3$ ).

## Ejemplo 1: Preparación de la 4-(*N*)-escualenoilgemcitabina (SQgem)

### a) *Síntesis del ácido escualénico (SQCOOH)*

A 11 ml de agua destilada se añaden 1,16 ml de ácido sulfúrico; a continuación, se añaden 0,615 g (2,06 mmoles) de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  suavemente con el fin de obtener el ácido crómico. Se diluyen 0,794 g (2,06 mmol) de aldehído escualénico (SQCHO) (Ceruti M. *et al.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1; 2002, 1477-1486) en 16 ml de éter dietílico bajo agitación magnética, y se enfría el matraz después hasta 0°C. Después, a la disolución de SQCHO se añade el ácido crómico gota a gota. La reacción se mantiene bajo agitación magnética a 0°C durante dos horas. El producto en bruto se purifica después mediante lavado de la fase orgánica con agua y después mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con éter de petróleo/éter 95:5 como eluyente. Rendimiento: 35% (0,286 g, 0,714 mmoles).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{COCH}_3$  99,5% 300 MHz)  $\delta$ : 5,11 (5H, m, CH vinílicos), 2,38 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 2,26 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 2,13-1,86. (16H, m,  $\text{CH}_2$  alílicos), 1,65-1,59 (15H, m,  $\text{CH}_3$  alílicos), 1,26 (3H, s,  $\text{CH}_3$  alílicos). CIMS (isobutano)  $m/z$  401(100).

5 EIMS  $m/z$  400 (5), 357 (3), 331 (5), 289 (3), 208 (6), 136 (3), 81 (100).

b) Síntesis de la 4-(N)-escualenoilgemcitabina

10 En un matraz de tres bocas provisto de un fluxómetro, se añaden 0,209 g (0,522 mmoles) de SQCOOH obtenidos en a) disueltos en 1 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro y a continuación 0,053 g (0,522 mmoles) de trietilamina (TEA) disueltos en 0,5 ml de THF anhidro bajo agitación magnética y con un flujo de argón. El matraz se enfría después hasta  $-15^\circ\text{C}$ . A la mezcla de reacción, se añaden gota a gota 0,057 g (0,522 mmoles) de etilcloroformiato, disueltos en 2,15 ml de THF anhidro. Después de 20 minutos a  $-15^\circ\text{C}$ , se añaden 0,137 g (0,522 mmoles) de gemcitabina disueltos en 2,72 ml de dimetilformamida (DMF) y se sube la temperatura hasta  $+5^\circ\text{C}$  y por último hasta temperatura ambiente. La reacción se vigila mediante cromatografía sobre capa delgada (diclorometano/acetona 50:50) y se guarda bajo agitación magnética durante varios días hasta la formación de la amida. El producto en bruto se purifica a continuación mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con una mezcla de diclorometano/acetona 95:5 como eluyente. Rendimiento: 55% (0,185 g, 0,287 mmoles).

20 RMN  $^1\text{H}$  (piridina- $d_5$  99,5% 300 MHz)  $\delta$ : 12,05 (1H, s, NHCO), 8,77 (1H, d, CH-6), 7,74 (1H, d, CH-5), 6,99 (1H, t, CH-1'), 5,30-5,02 (1H, m, CH-3' y 5H, m, CH vinílicos), 4,47-4,31 (3H, m, CH-4' y  $\text{CH}_2$ -5'), 2,81 (2H, t,  $\text{NHCOCH}_2$ ), 2,53 (2H, t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,18-2,00 (16H, m,  $\text{CH}_2$  alílicos), 1,68-1,55 (18H, m,  $\text{CH}_3$  alílicos). CIMS (isobutano)  $m/z$  646 (100).

25 EIMS  $m/z$  645 (10), 577 (8), 523 (7), 509 (18), 494 (10), 454 (15), 429 (24), 372(100).

c) Preparación de las nanopartículas constituidas por 4-(N)-escualenoilgemcitabina

30 Las partículas constituidas por SQgem se obtienen según la técnica de nanoprecipitación descrita en Fessi H. *et al.*, Int. J. Pharm., 55; 1989, R1-R4. Una muestra de una disolución a 10 mg/ml de SQgem en etanol se extrae y se añade a acetona según la concentración deseada y de tal manera que se obtenga un total de 2 ml de fase orgánica. Esta disolución de SQgem en la mezcla etanol/acetona se añade después a 4 ml de agua MilliQ<sup>®</sup> bajo agitación magnética. Las partículas se forman instantáneamente. Después de la evaporación al vacío de los disolventes orgánicos, se obtiene una suspensión de partículas coloidales estables de SQgem. La suspensión se debe conservar a  $+4^\circ\text{C}$ .

**Ejemplo 2: Caracterización fisicoquímica de las partículas**

a) Determinación del tamaño de las nanopartículas

40 El control del tamaño de las partículas coloidales obtenidas en el ejemplo 1 se lleva a cabo mediante difusión casi elástica de la luz con un nanosizer (Coulter<sup>®</sup> N4MD, Coulter Electronics, Hialeah, USA).

45 Las suspensiones coloidales se diluyen en agua MilliQ<sup>®</sup> con el fin de que el número de partículas por ml se adapte al aparato de medición.

El tamaño de las nanopartículas esta comprendido entre 100 y 200 nm. Se controla mediante diferentes concentraciones en SQgem utilizadas en el procedimiento de nanoprecipitación descrito en el ejemplo 1. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla I siguiente.

50

Tabla I

| Concentración de SQgem en la suspensión final (mg/ml) | Diámetro hidrodinámico medio (nm) | Desviación estándar | Índice de polidispersidad |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1                                                     | 126,2                             | 43,5                | 0,26                      |
| 2                                                     | 150,4                             | 37,7                | 0,09                      |
| 4                                                     | 171,3                             | 40,8                | 0,08                      |

b) Medición de la tensión superficial de disoluciones de 4-(N)-escualenoilgemcitabina y estudio de su estabilidad

55

La tensión superficial de una disolución acuosa de SQgem a diferentes concentraciones se mide, con superficie constante, con la ayuda de un tensiómetro de lámina de Wilhemly y se compara con la de una disolución de gemcitabina (Gem) y de 4-(N)-stearoilgemcitabina (C18gem) (Myhren F. *et al.*, Gemcitabine derivatives, patente US nº 2002/0042391).

60

Para preparar las diferentes diluciones de SQgem y de C18gem es necesario partir de una disolución etanólica; el

porcentaje de etanol en la disolución final es de 10% (la presencia de etanol rebaja la tensión superficial del agua de 72 mN/ a aproximadamente 50 mN/m). Los resultados se presentan en la figura 1.

Se observa que sólo la SQgem disminuye la tensión superficial a una concentración de  $4 \times 10^{-6}$  M, lo cual corresponde exactamente a la formación de las nanopartículas.

La estabilidad de las partículas de SQgem en la dilución ha sido evaluada asimismo mediante la medición de la tensión superficial con área constante de diferentes diluciones de una suspensión de partículas de SQgem. Se ilustra en la figura 2.

### Ejemplo 3: Determinación de la actividad antitumoral de las partículas de 4-(N)-escualenoilgemcitabina

La actividad citotóxica de la SQgem se evalúa en dos líneas celulares tumorales humanas (KB3-1, cáncer de nasofaringe y MCF-7, cáncer de pecho) mediante exposición a la SQgem durante 72 horas y se compara con la actividad de la gemcitabina.

Las líneas se mantienen en medio DMEM con 10% de suero de ternera fetal, glutamina 2 mM, antibióticos 50 mg/l, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad. Las células son inoculadas en una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$ /pocillo; después de 24 horas, se añaden diferentes diluciones de gemcitabina y de partículas de SQgem y se incuban durante 72 horas. La viabilidad celular se determina a continuación mediante el ensayo MIT. Los resultados están expresados en CI<sub>50</sub>, que es la concentración de molécula a la cual están vivas el 50% de las células.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla II siguiente. Muestran claramente que las nanopartículas de SQgem son 5 a 7 veces más citotóxicas que la molécula de gemcitabina.

Tabla II

|             | CI <sub>50</sub> (μM) después de 72 h |             |
|-------------|---------------------------------------|-------------|
|             | KB3-1                                 | MCF-7       |
| Gemcitabina | 50,8 ± 49,8                           | 29,0 ± 13,9 |
| SQgem       | 8,8 ± 4,1                             | 4,8 ± 3,9   |

La actividad citotóxica de la SQgem a tiempos diferentes ha sido evaluada asimismo mediante incubación de nanopartículas de SQgem 100 μM en dos líneas celulares en presencia y en ausencia de insertos (0,02 μm) (ensayo MTT) (n=3).

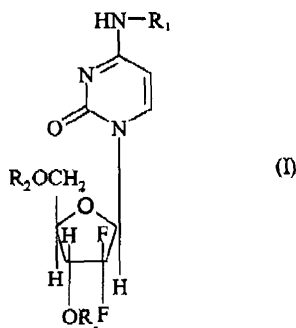
Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3. Se observa que la actividad anticancerígena de la SQgem no ha disminuido con respecto a los ensayos de citotoxicidad en ausencia de inserto.

### Ejemplo 4: Preparación de nanopartículas de 4-(N)-escualenoilgemcitabina pegiladas

Se disuelven en 1 ml de acetona 2 mg de 4-(N)-escualenoilgemcitabina y 1,4 mg de colesterol acoplado al polietilenglicol (Chol-PEG CHOLESTEROL PEGYLE, SUNBRIGHT CS-020). Esta fase orgánica se añade a 2 ml de agua MilliQ® bajo agitación magnética. Después de la evaporación al vacío de la acetona, se obtiene una suspensión de nanopartículas estables. El tamaño de las nanopartículas, evaluado según el protocolo descrito en el ejemplo 2, es de aproximadamente 75 nm y el potencial zeta es de -32,7 mV.

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas de un derivado de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina de fórmula general (I):

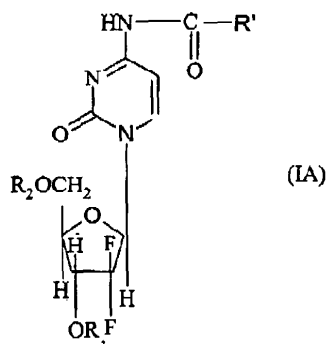


en la que:  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un radical acilo hidrocarbonado por lo menos de  $C_{18}$  acíclico, no lineal, insaturado y de tal conformación que es capaz de conferir a dicho compuesto de fórmula general (I), una forma compactada en un medio disolvente polar, siendo dicho radical hidrocarbonado un radical escualenoilo o un derivado de éste, y siendo uno por lo menos de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  diferente de un átomo de hidrógeno.

2. Nanopartículas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dicho radical acilo hidrocarbonado es un radical escualenoilo.

3. Nanopartículas según la reivindicación 1 ó 2, caracterizadas porque dicho derivado comprende un derivado hidrocarbonado a título de radical  $R_1$ .

4. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque dicho derivado responde a la fórmula general (IA):



en la que  $R_2$  y  $R_3$  son tales como los definidos en la reivindicación 1, y  $R'_1$  representa un radical escualenoilo o un derivado de éste.

5. Nanopartículas según la reivindicación 3, caracterizadas porque  $R_2$  y  $R_3$  representan ambos un átomo de hidrógeno.

6. Nanopartículas de 4-(N)-escualenoilgemcitabina.

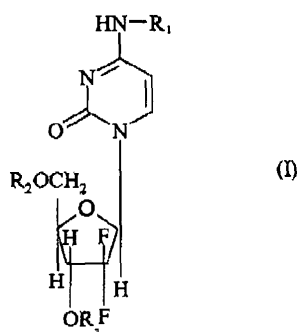
7. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas porque poseen un tamaño medio comprendido entre 30 y 500 nm.

8. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizadas porque están asociadas a por lo menos un derivado lipófilo del polietilenglicol.

9. Nanopartículas según la reivindicación 8, caracterizadas porque dicho derivado lipófilo del polietilenglicol es el polietilenglicol colesterol.

10. Procedimiento de preparación de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende por lo menos:

la solubilización de por lo menos un derivado de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina de fórmula general (I):



en la que: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, idénticos o diferentes, representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un radical acilo hidrocarbonado por lo menos de C<sub>18</sub> acíclico, no lineal, insaturado y de conformación tal que es capaz de conferir a dicho compuesto de fórmula general (I), una forma compactada en un medio disolvente polar, siendo dicho radical hidrocarbonado un radical escualenoilo o un derivado de éste, y siendo uno por lo menos de los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> diferente de un átomo de hidrógeno, en por lo menos un disolvente orgánico a una concentración suficiente para obtener, durante la adición de la mezcla correspondiente, bajo agitación, a una fase acuosa, la formación instantánea de nanopartículas en suspensión en dicha fase acuosa y, llegado el caso, el aislamiento de dichas nanopartículas.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho derivado es tal como el definido en las reivindicaciones 2 a 6.

12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque se lleva a cabo en ausencia de tensioactivo.

13. Procedimiento según la reivindicación 10, 11 ó 12, caracterizado porque se lleva a cabo en presencia de un derivado lipófilo del polietilenglicol.

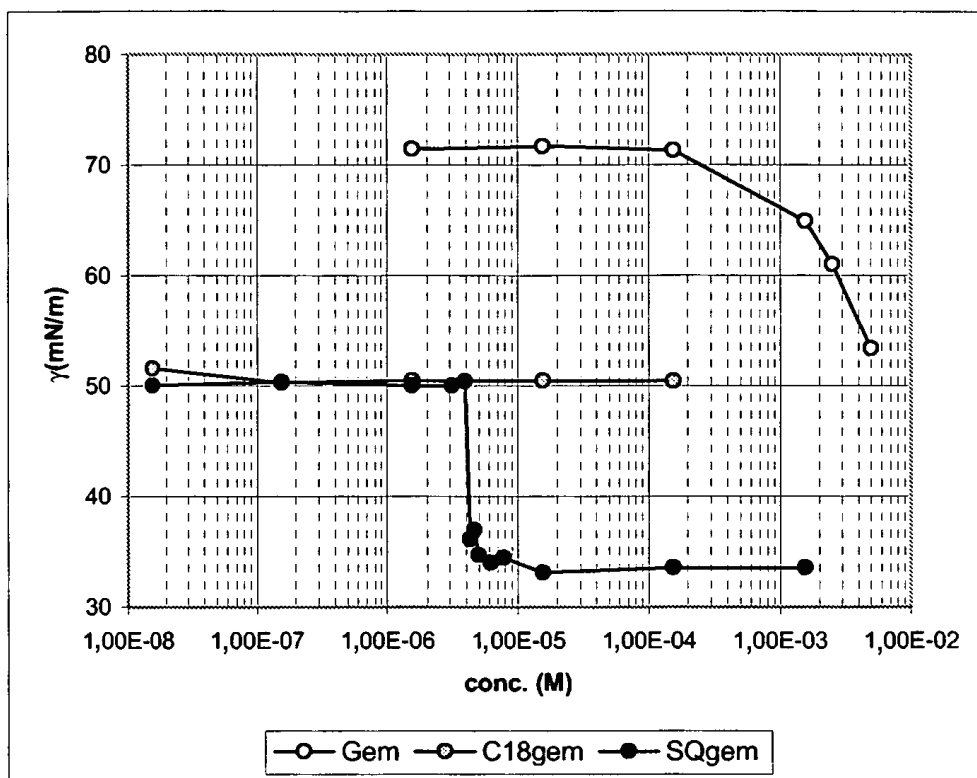
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque dicho derivado lipófilo del polietilenglicol es el polietilenglicol colesterol.

15. Composición farmacéutica que comprende a título de materia activa por lo menos unas nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en asociación con por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

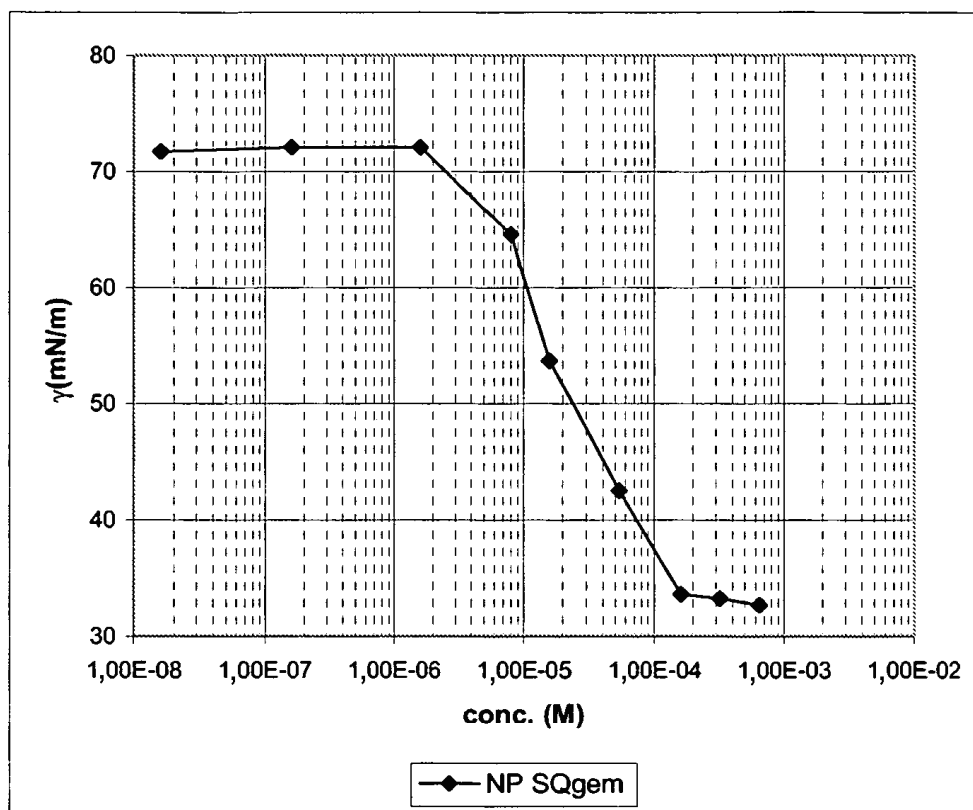
16. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, a título de agentes anticancerígenos.

17. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, a título de agentes antivíricos.

18. Utilización de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de una composición farmacéutica dotada de una actividad anticancerígena o antivírica.



**Figura 1**

**Figura 2**

