

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 217**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07D 305/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08855240 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2222278**

54 Título: **Sistema mejorado de administración de taxano**

30 Prioridad:

**28.11.2007 US 990907 P**

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

**07.05.2015**

73 Titular/es:

**CELATOR PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
200 Princeton South Corporate Center Suite 180  
Ewing, NJ 08628, US**

72 Inventor/es:

**ANSELL, STEVEN M.;  
JOHNSTONE, SHARON;  
TARDI, PAUL y  
MAYER, LAWRENCE**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 535 217 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

Sistema mejorado de administración de taxano

Solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de los Estados Unidos Número de Serie 60/990,907 presentada el 28 de noviembre de 2007 la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Campo técnico

La invención pertenece al campo de la administración de fármacos, específicamente en el área de administración exitosa de taxanos con farmacocinética controlada.

Técnica anterior

10 El paclitaxel es un agente quimioterapéutico utilizado ampliamente para el tratamiento de un cierto rango de carcinomas. El material clínico es formulado en Cremophor® EL/etanol y es diluido con regulador antes de la administración. Hay muchos informes en la literatura que describen intentos de mejorar la formulación del paclitaxel utilizando micelas, liposomas o emulsiones<sup>1, 15, 16, 17</sup>. En casi todos los casos, sin embargo, es claro de los datos farmacocinéticos reportados que mientras que estos vehículos permiten formular el paclitaxel, no actúan como verdaderos vehículos de administración in vivo puesto que el fármaco rápidamente sufre partición fuera del vehículo con vidas medias del orden de minutos. Una excepción parece ser una formulación conocida como NK105.<sup>2</sup> La NK105 es paclitaxel formulado en micelas compuestas de poli (etilenglicol)-poli (ácido aspártico) en el cual los grupos carboxilo están cubiertos con 4-fenilbutanol.

20 Se han hecho muchos intentos para producir profármacos de paclitaxel lipofílicos funcionales para mejorar el comportamiento del paclitaxel o para abordar problemas en las formulaciones asociados con el fármaco. Estos incluyen conjugados con fosfolípidos<sup>3, 4</sup>, colesterol<sup>5</sup>, ácidos grasos  $\alpha$ -bromo<sup>6, 7</sup>, ácido oleico<sup>8, 9</sup>, fulereno<sup>10</sup> y ácido docosahexanoico<sup>11</sup>. Estos profármacos fueron formulados en vehículos lipídicos tales como liposomas<sup>3, 7, 10</sup>, emulsiones oleosas<sup>8, 9</sup> o micelas<sup>5, 6, 11</sup>. Además, la WO2006/014626 divulga conjugados de paclitaxel y otros fármacos con unidades estructurales hidrófobas que pueden existir en forma de partículas. La mayor parte de estos reportes reivindica la eficacia mejorada con respecto al paclitaxel en modelos in vivo; sin embargo, en la mayoría de los casos no proveen información sobre la eliminación del fármaco en plasma ni presentan datos que se focalicen en la fase de eliminación del fármaco terminal más que en la fase de distribución temprana. La información sobre la eliminación del fármaco durante las primeras 24 horas después de la administración es el período de más interés significativo desde la perspectiva de administración a un tumor debido al fenómeno de permeabilidad de retención potenciada (EPR) observado con vehículos en partículas, incluyendo micelas y nanopartículas.

30 La invención es ejemplificada por una serie de profármacos de paclitaxel lipofílicos y formulaciones micelares/en nanopartículas asociadas. Se describen vehículos de administración en partículas con vidas medias de circulación prolongadas en donde la liberación del fármaco es modulada por la manipulación del grado de una hidrofobicidad ancla del lípido y la flexibilidad de los entrecruzadores del profármaco. La eficacia de los profármacos in vivo se demuestra dependiente de la naturaleza del enlace y de la rata de partición relativa del ancla lipídica.

40 Muchos regímenes de tratamiento quimioterapéutico involucran fármacos múltiples. Muchas combinaciones de fármacos actúan de manera sinérgica en relaciones apropiadas, pero de manera antagónica en otras relaciones en estudios basados en células. Cuando estos hallazgos son aplicados a estudios in vivo los diferentes comportamientos farmacocinéticos de los fármacos individuales cuando se administran en un cóctel con base acuosa convencionales alteran la relación administrada. Este problema ha sido resuelto utilizando vehículos para administración en partículas diseñados para coordinar la administración y liberación del fármaco tal como se describe en la publicación PCT W0 03/028696. La presente invención ofrece una mejora que facilita el control en composiciones que incluyen paclitaxel y sus análogos, puesto que uno o más agentes antineoplásicos adicionales pueden ser formulados para imitar la farmacocinética de la composición de taxano.

Divulgación de la invención

50 La presente invención emplea profármacos de un taxano y vehículos de administración micelares o en nanopartículas para facilitar el control farmacocinético. Haciendo el taxano más hidrófobo y

consecuentemente más compatible con sistemas de administración basados en lípidos, la farmacocinética de las composiciones de taxano puede ser controlada. También es posible ajustar las propiedades de la formulación que contienen agentes antineoplásicos adicionales de tal manera que sus ratas de liberación efectivas in vivo son comparables con las del taxano. Los vehículos de micelas o nanopartículas lipofílicas pueden ser utilizados para suspender estos profármacos y otros agentes en un ambiente acuoso.

Como se muestra más adelante, las partículas de profármacos de diglicolato de larga circulación proveen actividad terapéutica potenciada significativamente con respecto al paclitaxel formulado comercialmente en la dosis máxima tolerada; estos tipos de formulaciones son por lo tanto ventajosas per se.

Así, en un aspecto, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas o micelas formadas a partir de un profármaco de un taxano, profármaco que es un conjugado de dicho taxano acoplado a una unidad estructural hidrófoba a través de un enlazante de glicolato en donde dicho profármaco está asociado con un estabilizador lipídico y/o anfifílico.

En otros aspectos, la invención está dirigida a métodos para administrar taxano usando las composiciones de la invención, para combinar las composiciones de la invención con formulaciones de agentes antineoplásicos adicionales y administrar estos y con métodos para preparar estas composiciones y formulaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B son gráficas que muestran la eliminación de los profármacos de pruebas 1 y 2 medidos por HPLC (Figura 1A) o retención relativa del fármaco (Figura 1B).

La Figura 2 muestra la eliminación de los profármacos 1-9 formulados en POPC/2kPS3k.

La Figura 3 muestra la eficacia relativa de los profármacos 1-7 en una formulación similar.

La Figura 4 muestra la eficacia de un profármaco 7 en diversas concentraciones en comparación con Taxol™.

La Figura 5 muestra el cálculo de los equivalentes de paclitaxel del profármaco 7 requeridos para alcanzar paridad con el Taxol™.

Modos de ejecutar la invención

La invención provee composiciones que muestran características de administración mejoradas para un taxano formulado como profármaco acoplado a través de glicolato a una unidad estructural hidrófoba. Debido a que la farmacocinética de la formulación puede ser controlada manipulando la naturaleza de la unidad estructural hidrófoba, así como manipulando los componentes de las micelas o nanopartículas, pueden lograrse características deseadas de administración del fármaco. Esta farmacocinética puede ser hecha para coincidir con la farmacocinética de las formulaciones que contienen otros agentes antineoplásicos, ofreciendo la oportunidad de un sistema mejorado de administración coordinada de fármaco mediante el cual la relación del agente antineoplásico y el fármaco de taxano administrados a un tumor permanece sustancialmente la misma que es administrada. Por lo tanto, una relación sinérgica, determinada in vitro, puede ser mantenida mediante un factor tan pequeño como 1.5 o 2 utilizando la formulación de taxano mejorada en combinación con una formulación compatible de uno o más agentes antineoplásicos adicionales. Estas formulaciones son útiles, desde luego, en el tratamiento de cáncer y otras indicaciones hiperproliferativas. El mantenimiento de esta relación puede ser medido fácilmente determinando los niveles de los agentes en sangre o plasma con el tiempo. Las composiciones coordinadas mantendrán la relación administrada medida en sangre o plasma dentro de los límites anteriores durante al menos 1 hora o 4 horas o incluso 24 horas.

Tal como se anotó anteriormente, los componentes en nanopartículas o micelares en las composiciones de la invención que portan el profármaco de taxano están compuestos de un lípido y/o un estabilizador anfifílico.

Tal como se utiliza aquí, "taxano" se refiere a una clase de fármacos que consiste de paclitaxel y sus análogos. El paclitaxel fue derivado originalmente del árbol de Tejo y sus análogos incluyen docetaxel y otros compuestos de estructura similar. El Taxol™ es una forma disponible comercialmente de paclitaxel formulado con Cremophor™.

La "unidad estructural hidrófoba" que forman una parte del profármaco es generalmente un alcohol, de alto peso molecular que puede ser acoplado así al taxano a través de un enlace glicolato. El alcohol puede ser un

alcohol de cadena recta, ramificada o cíclica de 6 o más carbonos, generalmente de 6-30 carbonos o, en algunas realizaciones, de 6-20 carbonos. También puede ser un esteroide tal como colesterol o un tocoferol, tal como vitamina E y unidades estructurales relacionadas.

5 El lípido que está asociado con el profármaco en las composiciones en nanopartículas de la invención es típicamente un fosfolípido, tal como diesteoilfosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina, dimiristoil fosfocolina, y fosfatidil etanoles, fosfatidil inositoles, fosfatidil gliceroles correspondientes, y similares. Las cadenas de ácidos grasos también pueden ser insaturadas e incluyen, por ejemplo, ácidos oleico y linoleico. Los ácidos grasos no necesitan ser idénticos. Además, la unidad estructural lípido puede ser una esfingosina tal como la esfingomielina o en sí misma un éster de tocoferol tal como succinato de vitamina E o adipato de vitamina E.

10 El estabilizador anfílico es un compuesto polimérico que comprende una porción hidrofílica y una porción hidrófoba. Polímeros hidrófobos típicos incluyen poliestireno y derivados hidrófobos de polimetacrilato tales como derivados de polivinilo. Componentes hidrofílicos típicos incluyen polietilén glicol y derivados hidrofílicos de polímeros hidrófobos, así como dextrano y derivados de dextrano y poliaminoácidos. La lista pretende ser solo de ejemplo y no exhaustiva. En general, el estabilizador anfílico tiene un peso molecular superior a  
15 aproximadamente 500 pero puede tener un peso molecular mayor de 1,000-50,000 g/mol.

En los ejemplos más adelante, se describe una serie de profármacos de paclitaxel diseñados para formulaciones en nanopartículas lipofílicas. La hidrofobicidad del paclitaxel fue incrementada conjugando una serie de anclas lipídicas hidrófobas crecientemente al fármaco utilizando entrecruzadores de succinato o diglicolato. Mientras que el paclitaxel mismo es casi insoluble en agua, posee suficiente solubilidad acuosa de  
20 tal manera que pueda experimentar partición rápidamente desde sistemas de administración basados en lípidos, típicamente con vidas medias del orden de unos pocos minutos. La presente invención controla la farmacocinética del fármaco formulado in vivo a la vez que maximiza la eficacia. Los profármacos fueron formulados en nanopartículas estabilizadas de copolímeros de bloque definidas. Estas nanopartículas demostraron tener una vida media de eliminación de aproximadamente 24 horas in vivo. La rata a la cual el profármaco fue liberado de las nanopartículas podría ser controlada ajustando la hidrofobicidad del ancla lipídica dando como resultado ratas de liberación que varían de 1 a 24 horas.

Las formulaciones en nanopartículas pueden ser almacenadas de manera estable a 4°C durante varios meses.

30 Para evaluar la actividad terapéutica de los diversos profármacos de paclitaxel, las formulaciones en nanopartículas fueron administradas por vía intravenosa en ratones que llevaban tumores por xenoinjerto de colon humano HT29. A medida que la vida media en plasma y el área bajo la curva del profármaco se incrementó, la actividad contra los tumores HT29 también se incrementó. Las nanopartículas de profármaco paclitaxel multiplicaron por más de dos el tiempo en el que los tumores HT29 alcanzan 400 mg con respecto a Taxol® cuando ambos tratamientos fueron administrados a la dosis máxima tolerada (MTD) utilizando el  
35 régimen de tratamiento óptimo para Taxol®.

Las formulaciones en nanopartículas de este tipo son eliminadas más probablemente como resultado de la partición de las cadenas poliméricas individuales desde la partícula con el tiempo in vivo. La pérdida gradual del componente estabilizador desestabiliza la partícula y daría como resultado la eliminación de cualquier carga que aún no haya experimentado partición. Las partículas con una relación fármaco/estabilizador alta son eliminadas rápidamente puesto que la pérdida de cantidades relativamente pequeñas de polímeros  
40 expone el núcleo de la partícula a interacciones proteínicas potenciales. Las partículas con bajas relaciones fármaco/estabilizador tienen una tolerancia mayor a la pérdida de polímero y sobreviven el tiempo suficiente para ser eliminadas a través de otros mecanismos in vivo. Un sistema de administración ideal debería por lo tanto alcanzar el tamaño de una micela con una relación fármaco/polímero relativamente baja, preferiblemente  
45 con un estabilizador que tenga una rata de partición baja.

Los profármacos con anclas lipídicas de diferente hidrofobicidad demuestran diferentes ratas de partición a partir de la misma composición en partículas. En estas nanopartículas, las propiedades fisicoquímicas del fármaco dictan principalmente la liberación del fármaco desde el vehículo, más que la degradación del vehículo mismo. Este comportamiento lleva a una diferencia significativa, por ejemplo, entre el Taxol® y profármacos de paclitaxel en nanopartículas. El paclitaxel experimenta rápidamente la partición desde las micelas de Cremophor por inyección y se distribuye ampliamente a los drenajes lipofílicos que encuentra en el compartimiento sanguíneo. Con el tiempo el fármaco se redistribuye de regreso al compartimiento sanguíneo  
50 antes de ser eliminado. Las nanopartículas de profármaco no exhiben esta fase de distribución temprana, pero más bien están liberando fármaco continuamente durante el tiempo, cuya rata depende de la rata de partición del componente profármaco. Se mostró una rata de partición del profármaco por debajo directamente  
55

correlacionada con la eficacia, y esta rata fue fácilmente ajustable variando el ancla lipídica (y por tanto la hidrofobicidad) del profármaco.

5 La dependencia de la eficacia con respecto a la rata de partición puede ser racionalizada en términos de acumulación de nanopartículas en tumores por liberación gradual del profármaco. Las nanopartículas que liberan su carga rápidamente o son eliminadas rápidamente de la circulación suministrarán menos fármaco al sitio del tumor y consecuentemente se puede esperar que exhiban una eficacia reducida.

10 Las composiciones de la invención pueden contener adicionalmente agentes antineoplásicos adicionales. Puesto que la farmacocinética del profármaco de taxano es fácilmente controlada en las composiciones de la invención, pueden proveerse farmacocinéticas similares para el agente neoplásico adicional bien sea en una composición similar o en formulaciones alternativas y mezcladas con la composición de la invención o administradas simultáneamente al sujeto. Así, el agente antineoplásico adicional puede ser formulado en liposomas, micelas, nanopartículas alternativas, u otras composiciones diseñadas para imitar la farmacocinética del taxano. Agentes antineoplásicos adecuados son de una amplia variedad y bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, las antraciclinas tales como la daunorrubicina y la doxorubicina, fármacos que contienen platino tales como carboplatino y cisplatino, la familia que comprende irinotecan y sus análogos, las fluoropirimidinas y diversos agentes empleados comúnmente tales como metotrexato. La formulación de un agente (o agentes) antineoplásico adicional, diseñado para imitar la farmacocinética de la formulación de taxano puede mezclarse con la formulación de taxano como se anotó más arriba, o administrarse de manera sustancial simultáneamente como una composición separada.

20 En una realización, los profármacos de taxano pueden ser coformulados con análogos del profármaco hidrófobos de agentes solubles en agua tales como doxorubicina y las nanopartículas de fármaco doble mantienen los dos agentes a la relación fármaco inyectado:fármaco en el plasma durante tiempos extendidos después de la inyección. La formulación de profármacos hidrófobos en nanopartículas provee una metodología novedosa para coadministrar combinaciones de fármacos anticáncer con propiedades físicoquímicas ampliamente diferentes y mantener relaciones fármaco:fármaco óptimas in vivo.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta adecuada; se prefiere la administración parenteral. Los sujetos que van a ser tratados incluyen humanos, otros animales superiores y modelos de laboratorio tales como ratones y ratas.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

### 30 Ejemplos

Abreviaturas: VES, succinato de vitamina E; POPC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina; CVIJ, chorros impactantes de volumen confinado; 2kPS3k, poli (etilen glicol)<sub>2000</sub>-b-poliestireno<sub>3000</sub>; 2.5kPS3k, poli (etilen glicol)<sub>2500</sub>-b-poliestireno<sub>3000</sub>; 3H-CHE, colesterol hexadecil éter tritaido; TLC, cromatografía de capa fina; DIPC, diisopropilcarbodiimida; DMAP, N,N-4-dimetilaminopiridina.

35 Materiales. Todos los reactivos a menos que se especifique otra cosa fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Canadá Ltd., Oakville, ON. Los solventes fueron obtenidos de VWR International, Mississauga, ON. El paclitaxel fue comprado en Indena S.p.A., Milán, Italia. <sup>3</sup>H-CHE fue obtenido de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Waltham, MA. El POPC fue obtenido de Northern Lipids, Burnaby, BC. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN fueron registrados en CDCl<sub>3</sub> en un Bruker Advance 400. Las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 fueron obtenidas de ATCC, Manassas, VA. Los ratones Fox1<sup>nu</sup> fueron obtenidos de Harlan, Indianápolis, IN. El mezclador de chorros impactantes de volumen confinado fue construido a pedido en Princenton University. Todos los experimentos animales fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por la University of British Columbia's Animal Care Committee y de acuerdo con las guías actuales establecidas por el Canadian Council of Animal Care.

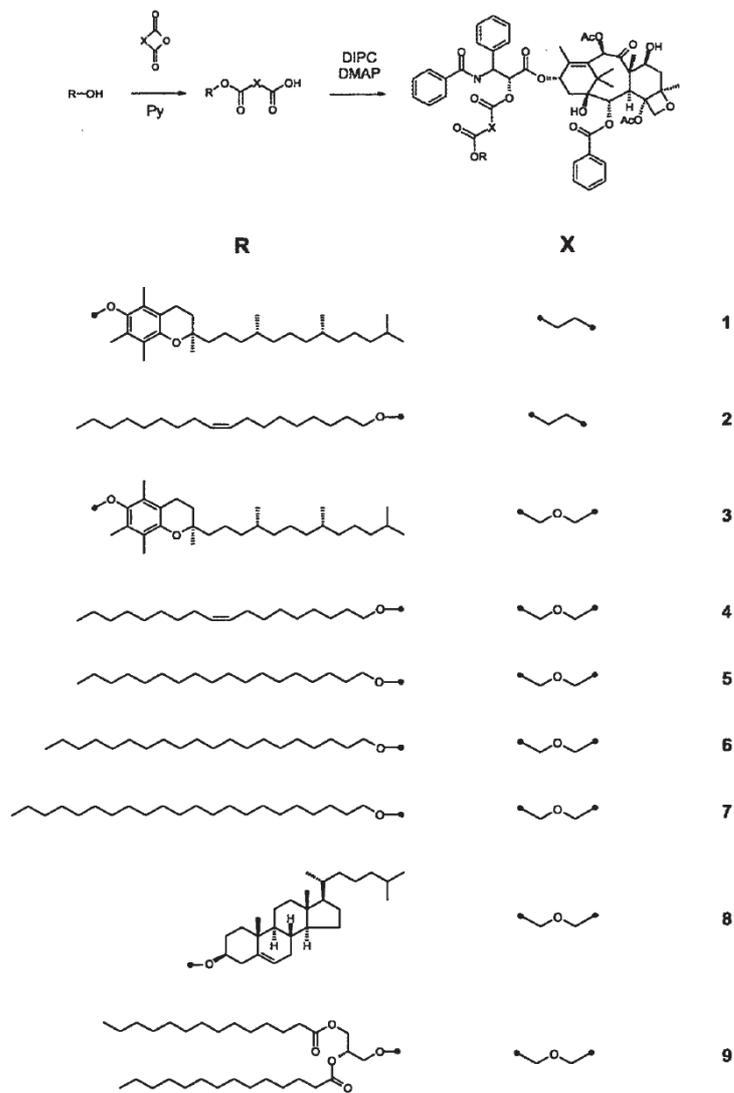
### 45 Ejemplo 1

#### Síntesis de profármacos

50 Se utilizó un rango de alcoholes lipídicos comúnmente disponibles como componente ancla (esquema 1) incluyendo un  $\alpha$ -tocoferol (1 y 3), alcohol oleílico (2 y 4), octadecanol (5), cosanol (6), docosanol (7), colesterol (8) y 1,2-dimiristoil-sn-glicerol (9). Los lípidos fueron conjugados al agente de entrecruzamiento por tratamiento con el correspondiente anhídrido cíclico, seguido por condensación del producto enlazado al ancla con paclitaxel utilizando diisopropilcarbodiimida (DIPC) en presencia de N,N-4-dimetilaminopiridina (DMAP).

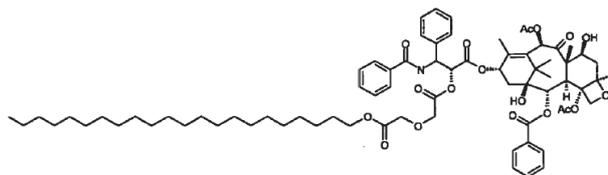
El ácido succínico (1-2) y el ácido diglicólico (3-9) fueron utilizados como agentes de entrecruzamiento. La unidad estructural 3-oxa de este último estaba prevista para incrementar la susceptibilidad del grupo 2'-acilo del agente de entrecruzamiento para la hidrólisis con respecto a los análogos de succinato

Esquema 1. Síntesis de profármacos de paclitaxel lipofílicos



5

Sinopsis TOC



6

Los derivados 2'-acilo de paclitaxel fueron preparados selectivamente explotando la diferencia en las ratas de reacción entre los grupos 2'- y 7-hidroxilo del paclitaxel. Bajo las condiciones de reacción utilizadas aquí, la mayor parte del paclitaxel fue consumida antes de que se generaran niveles significativos del producto 2', 7-diacilo, monitorizado por TLC. La cromatografía de columna fue utilizada para remover el paclitaxel sin reaccionar, el producto 2',7-diacilo y otras impurezas en la mezcla de reacción cruda. La pureza e identidad de los productos finales fueron confirmadas por análisis por HPLC y RMN, respectivamente.

Para la síntesis de las anclas lipídicas, un alcohol lipídico en piridina fue tratado con 3 equivalentes de anhídrido succínico o anhídrido diglicólico a temperatura ambiente durante la noche. El solvente fue retirado sobre un evaporador rotatorio y el residuo fue extraído del ácido clorhídrico diluido con cloruro de metileno. Las fracciones orgánicas fueron secadas sobre sulfato de magnesio anhidro, filtradas y el solvente fue removido. La conversión al ácido apropiado fue monitorizada por TLC, la cual en la mayor parte de los casos fue del 100%. El producto resultante fue secado bajo vacío o bien liofilizado a partir de benceno. Los ácidos lipídicos fueron utilizados en las siguientes etapas sin purificación adicional.

Para la síntesis de conjugados de paclitaxel, se disolvieron paclitaxel (1 equivalente), un ácido lipídico (2 equivalentes) y 4-N,N-dimetilaminopirimidina (3 equivalentes) en cloroformo libre de alcohol. Se agregó entonces diisopropilcarbodiimida (1.3 equivalentes) y la solución fue agitada a temperatura ambiente. La reacción fue monitorizada por TLC hasta que la mayor parte del paclitaxel había sido consumida (típicamente 2-4 horas). La mezcla de reacción fue luego lavada con ácido clorhídrico diluido y secada sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de la remoción del solvente el producto crudo fue pasado a través de una columna de sílica gel utilizando un gradiente de metanol/cloruro de metileno. El profármaco producido fue liofilizado a partir de benceno y almacenado a temperatura ambiente.

Los compuestos preparados son:

2'-O-(4''-O-tocoferilsuccinoil)-paclitaxel 1. Sintetizado a partir de paclitaxel y succinato de tocoferol. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = 7.25 Hz); 4.22 (1H, d, J = 8.60 Hz); 4.33 (1H, d, J = 8.60 Hz); 4.46 (1H, dd, J = 10.88 Hz, J' = 6.58 Hz); 4.99 (1H, d, J = 9.54 Hz); 5.52 (1H, d; J = 3.22 Hz); 5.70 (1H, d, J = 6.98 Hz); 5.98 (1H, dd, J = 9.13 Hz, J' = 3.22 Hz); 6.27 (1H, t, J = 8.6 Hz); 6.97 (1H, d, J = 8.87 Hz).

2'-O-(4''-O-oleilsuccinoil)-paclitaxel 2. Sintetizado a partir de paclitaxel y succinato de oleilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.82 (1H, d, J = 7.0 Hz); 3.96 (2H, t, J = 6.81 Hz); 4.21 (1H, d, J = 8.38 Hz); 4.33 (1H, d, J = 8.38 Hz); 4.46 (1H, br. s); 4.98 (1H, d, J = 8.45 Hz); 5.36 (2H, m); 5.50 (1H, d, J = 2.89 Hz); 5.69 (1H, d, J = 7.00 Hz); 6.00 (1H, dd, J = 9.04 Hz, J' = 2.74 Hz); 6.26 (1H, t, J = 8.91 Hz); 7.08 (1H, d, J = 9.06 Hz).

2'-O-(5''-O-tocoferildiglicoloil)-paclitaxel 3. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de tocoferol. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.84 (1H, d, J = 6.98 Hz); 4.22 (1H, d, J = 8.3 Hz); 4.34 (1H, d, J = 8.6 Hz); 4.99 (1H, d, J = 7.79 Hz); 5.64 (1H, d, J = 2.96 Hz); 5.70 (1H, d, J = 6.98 Hz); 6.06 (1H, dd, J = 9.27 Hz, J' = 2.82 Hz); 6.30 (1H, t); 6.97 (1H, d, J = 9.13 Hz).

2'-O-(5''-O-oleildiglicoloil)-paclitaxel 4. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de oleilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = 7.0 Hz); 4.46 (1H, t, J = 7.96 Hz); 4.99 (1H, d, J = 8.45 Hz); 5.35 (2H, m); 5.60 (1H, d, J = 2.74 Hz); 5.70 (1H, d, J = 7.08 Hz); 6.05 (1H, dd, J = 9.25 Hz, J' = 2.55 Hz); 6.28 (1H, t, J = 8.9 Hz); 7.04 (1H, d, J = 9.29 Hz).

2'-O-(5''-O-octadecildiglicoloil)-paclitaxel 5. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de octadecilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = 7.0 Hz); 4.46 (1H, dd, J = 10.74 Hz, J' = 6.70 Hz); 4.99 (1H, d, J = 8.45 Hz); 5.60 (1H, d, J = 2.82 Hz); 5.70 (1H, d, J = 7.00 Hz); 6.05 (1H, dd, J = 9.25 Hz, J' = 2.55 Hz); 6.28 (1H, t, J = 8.9 Hz); 7.05 (1H, d, J = 9.29 Hz).

2'-O-(5''-O-cosanildiglicoloil)-paclitaxel 6. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de cosanilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = 6.98 Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.46 (1H, dd, J = 10.75 Hz, J' = 6.72); 4.99 (1H, d, J = 9.40 Hz); 5.60 (1H, d, J = 2.96 Hz); 5.70 (1H, d, J = 7.25 Hz); 6.05 (1H, dd, J = 9.27 Hz, J' = 2.82); 6.29 (1H, t, J = 8.3 Hz); 7.05 (1H, d, J = 9.13 Hz).

2'-O-(5''-O-docosanildiglicoloil)-paclitaxel 7. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de docosanilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = 6.98 Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.46 (1H, dd, J = 10.75 Hz, J' = 6.72 Hz); 4.99 (1H, dd, J = 9.40 Hz, J' = 1.61 Hz); 5.60 (1H, d, J = 2.96 Hz); 5.70 (1H, d, J = 6.98 Hz); 6.05 (1H, dd, J = 9.40 Hz, J' = 2.95 Hz); 6.28 (1H, t, J = 8.3 Hz); 7.05 (1H, d, J = 9.40 Hz).

2'-O-(5''-O-colesterildiglicolil)-paclitaxel 8. Sintetizado a partir de paclitaxel y diglicolato de colesterilo. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (1H, d, J = x Hz); 4.0-4.4 (5H, m); 4.47 (1H, dd, J = 10.6 Hz, J' = 6.8 Hz); 4.63 (1H, m); 4.99 (1H, d, J = 7.79 Hz); 5.38 (1H, d, J = 3.76 Hz); 5.61 (1H, d, J = 2.69 Hz); 5.70 (1H, d, J = 7.25 Hz); 6.06 (1H, dd, J = 9.13 Hz, J' = 2.69 Hz); 6.28 (1H, t, J = 8.3 Hz); 7.09 (1H, d, J = 9.40 Hz).

- 5 2'-O-(5''-O-(1''',2''-dimiristoil-sn-glicero)diglicolil)-paclitaxel 9. Sintetizado a partir de paclitaxel y 3-(1,2-dimiristoil-sn-glicero) diglicolato. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) □□3.84 (1H, d, J = 6.98 Hz); 4.47 (1H, dd, J = 10.6 Hz, J' = 6.8 Hz); 4.99 (1H, dd, J = 9.54 Hz, J' = 1.75 Hz); 5.20 (1H, m); 5.61 (1H, d, J = 2.96 Hz); 5.71 (1H, d, J = 7.25 Hz); 6.07 (1H, d, J = 9.27 Hz, J' = 2.82 Hz); 6.31 (1H, t); 7.11 (1H, d, J = 9.40 Hz).

## Ejemplo 2

### 10 Formulación en nanopartículas

El profármaco, el colípido y los polímeros estabilizadores (típicamente en una base 1:1:2 p/p) fueron disueltos en etanol/THF (4:1) a una concentración de 40 mg/ml. El solvente fue diluido rápidamente con agua utilizando un mezclador CVIJ de cuatro puertos<sup>13,14</sup> con ratas de flujo fijadas a 12/12/53/53 ml/minuto (solvente/agua/agua/agua). Las ratas de flujo fueron controladas utilizando las gomas de jeringa Harvard Apparatus PHD2000. La solución resultante fue luego sometida a diálisis contra agua para remover el solvente residual. La concentración final de fármaco fue típicamente alrededor de 0.7 mg/ml. Cuando se requirieron concentraciones más altas la solución dializada fue diluida con volúmenes equivalentes de sacarosa 600 mM y luego concentradas utilizando un cartucho curvo de 100 kD, 0.5 mm de lumen, 60 cm de longitud de recorrido MidGee (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) con una bomba peristáltica. El tamaño de partícula fue determinado utilizando un dimensionador de partículas Malvern Zetasizer Nano-ZS y fue reportado como datos de volumen sopesados.

Las formulaciones estaban compuestas de un profármaco, un colípido y un estabilizador anfifático con una relación en peso de 1:1:2, respectivamente a una concentración de 40 mg por mL de solvente. El uso de concentraciones iniciales más altas (>40 mg/mL) llevó frecuentemente a la generación de partículas grandes que comprometieron el manejo corriente abajo de la preparación. Los colípidos fueron bien succinato de α-tocoferol (VES) o POPC los cuales facilitaron el procesamiento. El VES fue reemplazado por POPC en formulaciones posteriores puesto que el VES precipitó por almacenamiento a largo plazo a 4°C. Se utilizó poli(etilen glicol)-b-poliestireno (2kPS3k o 2.5kPS3k) como estabilizador anfifático. Pueden utilizarse también otros estabilizadores. Utilizando el procedimiento de precipitación instantánea, el diámetro de partícula medio varió de 10-20 nm para las nanopartículas de profármaco/VES/2kPS3k, y de 20-30 nm por nanopartículas de profármaco/POPC/2kPS3k.

La estabilidad de las formulaciones en nanopartículas fue monitorizada por HPLC después de almacenamiento a largo plazo a 4°C.

Las muestras que contenían (50 µL) de nanopartículas fueron mezcladas con 150 µL de diluyentes (metanol:acetonitrilo, 2:1 v/v) mediante sometimiento a vórtex vigoroso seguido por centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante (20 µL) fue inyectado en un HPLC Waters para cuantificación utilizando una columna analítica en fase reversa Phenomenex SynergiFusion monitorizada por detección UV a 227 nm. La cromatografía fue llevada a cabo con una elusión en gradiente de 1 mL/minuto de metanol y regulador de acetato de sodio 10 mM (pH 5.6) como fases móviles a partir de una mezcla inicial de solvente de 70:30 hasta 100:0 respectivamente. La temperatura de columna fue fijada a 30°C. Las muestras fueron mantenidas en el compartimiento del automuestreador a 4°C antes del análisis por HPLC.

El análisis de 4, 5 y 6 formulados con POPC/2kPS3k (1:1:2) en sacarosa 300 mM no regulada mostró menos de 5% de paclitaxel libre presente después de 11 semanas de almacenamiento. El fármaco libre a ese nivel demostró no tener actividad antitumoral en experimentos de eficacia de control (datos no mostrados). De acuerdo con lo anterior, la estabilidad fue considerada adecuada para los experimentos in vivo llevados a cabo en estas investigaciones.

Las formulaciones en nanopartículas almacenadas bien sea en solución de sacarosa o agua a 4°C fueron encontradas como físicamente estables durante tres meses por inspección visual, con la excepción de 8 las cuales formaron precipitados en algunas composiciones de la formulación después de 1-2 semanas de almacenamiento. Las formulaciones utilizando VES como colípido también llevaron a la formación lenta de precipitados coloidales o cristalinos, probablemente debido a la partición de VES a la fase acuosa seguida por la subsecuente precipitación por fuera de la nanopartícula. Las formulaciones de VES fueron por lo tanto

adecuadas solamente para estudios a corto plazo y no para experimentos a largo plazo tales como las evaluaciones de eficacia.

La estabilidad física de las formulaciones fue investigada por el examen de cambios en el tamaño de partículas después de someter a vórtex las nanopartículas de profármaco/colípido/2.5kPS3k (1:1:2) en agua, solución salina 150 mM o sacarosa 300 mM (Tabla 1). Estas formulaciones consistieron principalmente de nanopartículas con diámetros entre 20 y 30 nm. Las partículas que fueron sensibles a tensión mecánica sufrieron agregación o separación de fases cuando se sometieron a estas condiciones, dando como resultado la formación de partículas más grandes en la muestra. El incremento en el tamaño de las partículas fue monitorizado usando dispersión de luz dinámica para medir el valor promedio Z (el tamaño medio pesado de intensidad de la distribución de partículas) para muestras antes y después de sometimiento vigoroso a vórtex. El cambio en el valor  $Z_{ave}$  fue utilizado como lectura subrogada para la formación de agregados o precipitados resultantes de inestabilidad mecánica, en donde un valor más alto de  $\Delta Z_{ave}$  indicó un nivel más alto de agregación o precipitación (Tabla 1). Las nanopartículas con POPC como colípido fueron encontradas como significativamente más estables en la presencia de sal que las preparadas con VES o en la ausencia de un colípido ( $\Delta Z_{ave} = 24, 372$  y  $774$  nm respectivamente para las formulaciones de 5). En la mayor parte de los casos la estabilidad mecánica fue mejorada significativamente en la presencia de sacarosa 300 nM en comparación con agua. Las muestras de sacarosa donde  $\Delta Z_{ave}$  estaba en el rango de 0-40 nm tenían muy poco o ningún material del tamaño de micrones (<2% de la muestra). Algunas formulaciones de profármacos (3 y 9) que generaban niveles más altos de agregación en agua y solución salina bajo estas condiciones ( $\Delta Z_{ave} = 100$ -200 nm) fueron estables en sacarosa ( $\Delta Z_{ave} = 0$ -40 nm). La conclusión del estudio fue que se obtuvo la mejor estabilidad utilizando colípidos POPC en nanopartículas formuladas en sacarosa 300 nM.

Tabla 1

Estabilidad física de formulaciones de profármacos. Todas las formulaciones fueron preparadas como nanopartículas de profármaco/colípido/2.5kPS3k (1:1:2) en agua. El diámetro de las partículas es el volumen promedio sopesado determinado con un dimensionador de tamaño Malvern Nano-ZS. La estabilidad fue establecida midiendo el cambio en el  $Z_{ave}$  ( $\Delta Z_{ave}$ ) de muestras diluidas con volúmenes equivalentes de agua, solución salina 300 mM o sacarosa 600 mM después de someter a vórtex durante 30 segundos.

Profármaco	Colípido	Diámetro (nm)	$\Delta Z_{ave}$ (nm) Agua	$\Delta Z_{ave}$ (nm)	
				Solución salina 150 mM	Sacarosa 300 mM
2	POPC	26	20	43	10
3	POPC	24	125	55	42
4	POPC	22	15	25	5
5	POPC	21	20	24	7
6	POPC	23	21	26	36
7	POPC	23	18	24	0
8	POPC	23	47	42	41
9	POPC	23	167	171	0
5	VES	7	3	372	10
5	-	28	109	774	71

Se obtuvieron resultados similares cuando las muestras fueron sometidas a etapas de procesamiento normales requeridas para preparaciones de muestras grandes. Las nanopartículas formuladas en agua o con VES o sin colípidos no fueron estables cuando se expusieron a tensión mecánica y exhibieron formación significativa de precipitado durante las etapas de concentración utilizando diafiltración. La estabilidad mientras

se concentraban las formulaciones pudo ser mejorada diluyendo la solución de las nanopartículas con sacarosa para una concentración final de 300 mM antes de la concentración. El uso de POPC como colípido proveyó una mejora adicional de la estabilidad física durante el almacenamiento y procesamiento postformación, consistente con los resultados de los estudios de estabilidad anteriores. Todas las muestras concentradas utilizadas en este trabajo estuvieron basadas subsecuentemente en POPC como colípidos y fueron preparadas en sacarosa 300 mM. Bajo estas condiciones la formación de precipitados fue despreciable hasta concentraciones de fármaco de 8 mg/mL.

El enlace diglicolato se encontró más susceptible a la hidrólisis por encima del enlace succinato, como puede ser predicho con base en la fragilidad relativa de los enlaces éster. La reactividad incrementada del enlace diglicolato plantea una dificultad adicional para el análisis exacto de profármacos en muestras biológicas. Metanol:acetonitrilo 1:4 (v:v) fue efectivo en la precipitación casi completa de proteínas de plasma y liberación del profármaco a partir de la nanopartícula. Sin embargo, un estudio de balance de paclitaxel libre con el tiempo fue observado después de procesar muestras de plasma, incluyendo hidrólisis durante la manipulación de la matriz y análisis por HPLC. El profármaco diglicolato 6 fue hidrolizado completamente después de 9 horas mientras que el profármaco 2 succinato fue reducido a aproximadamente 25% después de 68 horas. La hidrólisis no fue observada cuando las muestras fueron reguladas con acetato a pH 4. Las muestras no reguladas del 6/POPC/2kPS3k en la ausencia de plasma no exhibieron esta hidrólisis, indicando que la hidrólisis dependiente del tiempo de profármacos en estas formulaciones será debida más probablemente a la presencia de un componente del plasma no precipitado. Este resultado sugiere que el profármaco es estable cuando está en la partícula, y que la hidrólisis en medio biológico tiene lugar después de la liberación del profármaco.

### Ejemplo 3

#### Actividad in vitro

La línea celular humana tumoral MCF-7 fue adquirida de American Type Collection (Manassas, VA). La línea celular tumoral humana A2780 fue adquirida de la European Collection of Cell cultura (UK).

Las células fueron expuestas en triplicados a una dilución en serie de formulaciones en nanopartículas de profármaco/POPC/2.5kPS3k (1:1:2) durante 72 horas a 16 concentraciones. Las células viables fueron cuantificadas utilizando de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con detección a 570 nm después de la adición de DMSO. La rata de supervivencia después del tratamiento se expresa como un porcentaje medio con respecto a los pozos de control no tratados.

La evaluación de la citotoxicidad del profármaco fue llevada a cabo utilizando células de tumores humanos A2780 y MCF-7 tratados con formulaciones de profármaco/POPC/2.5kPS3k (1:1:2) en agua destilada (Tabla 2). Las formulaciones de control no contenían profármaco confirmado diferente a los componentes de las nanopartículas que no contribuían a la inhibición del crecimiento en las células. Además, 1 fue evaluado utilizando un cierto número de formulaciones en nanopartículas diferentes (1/VES/2kPS3k; 1/2kPS3k y 1/cremóforo) para mostrar que la actividad observada era independiente del tipo de formulación usada.

Tabla 2

Inhibición de líneas celulares tumorales humanas utilizando formulaciones de profármaco/POPC/2kPS3k (1:1:2)

Compuesto	Valores de IC <sub>50</sub> (nM ± SD)	
	A2780	MCF-7
Paclitaxel	2.4 ± 0.3	3.8 ± 0.6
1	192 ± 18	158 ± 72
2	75.1 ± 3.9	67.0 ± 5.9
3	25.3 ± 1.3	13.4 ± 2.4
4	28.4 ± 1.4	15.9 ± 0.7

Compuesto	Valores de IC <sub>50</sub> (nM ± SD)	
	A2780	MCF-7
5	20.9 ± 10.9	1.1 ± 1.5
6	29.0 ± 1.3	16.6 ± 4.5
7	29.5 ± 5.2	23.5 ± 1.3
8	27.0 ± 1.1	24.1 ± 0.6
9	34.7 ± 1.3	32.2 ± 1.3

Se encontró que los profármacos enlazados a succinato (1 y 2) tenían ~1-2 órdenes de magnitud menos potente que el paclitaxel libre contra células A2780 y MCF-7. Esta tendencia fue observada en la mayor parte de las líneas celulares probadas. El descenso en la actividad observada fue probablemente el resultado de la resistencia del grupo succinato a la hidrólisis. Los profármacos subsecuentes (3-9) fueron preparados con la unidad estructural enlazante diglicolato la cual se espera que sea más susceptible a la hidrólisis debido a la presencia del grupo 3-oxa. Los profármacos de diglicolato mostraron todos potencia similar en los ensayos de inhibición de crecimiento (~20 nM) y fueron de un orden de magnitud menos potente que los controles positivos de paclitaxel. Los análogos de succinato fueron siempre menos potentes que los correspondientes profármacos de diglicolato. Por ejemplo, en la línea celular A2780 los valores IC<sub>50</sub> para el profármaco 1 succinato y el profármaco 3 diglicolato fueron 192 nM y 25.3 nM, respectivamente en comparación con 2.4 nM para paclitaxel. De la misma forma el succinato 2 y el diglicolato 4 tenían valores de IC<sub>50</sub> de 75.1 y 28.4 nM respectivamente. Estos resultantes son consistentes con los reportes de la literatura de los compuestos relacionados, en donde los valores de IC<sub>50</sub> en la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 para paclitaxel, 2'-O-hexanodecanoilpaclitaxel y 2'-(2''-bromohexadecanoilo) paclitaxel fueron reportados como <1, 8600 y 70 nM respectivamente.

#### Ejemplo 4

##### Eliminación en plasma de nanopartículas in vivo

Ratones lampiños atímicos (n = 3/punto en el tiempo) fueron inyectados con muestras de prueba (10 µl/g de peso corporal, a un máximo de 250 µl). Se recolectó la sangre en el punto del tiempo designado por la punción cardíaca y colocada en tubos microtituladores recubiertos con EDTA (BD Biosciences). Los tubos fueron centrifugados a 2800 rpm durante 10 minutos. El plasma fue recuperado y se analizaron alícuotas de 50 µl para HPLC en cuanto al contenido de fármaco. Las muestras que contenían <sup>3</sup>H-CHE (50 µl) fueron diluidas con fluido de centelleo PicoFluor 40<sup>TM</sup> (Packard) y contadas sobre un contador de centelleo Beckman-Coulter LS 6500 PicoFluor 40<sup>TM</sup>). El fármaco total (recuentos) por ratón en el compartimiento sanguíneo fue calculado asumiendo un volumen de plasma de 0.04125 mL por gramo de peso corporal.

Las ratas de partición para los fármacos lipofílicos de formulaciones en partículas basadas en lípidos son determinados comúnmente por diálisis del sistema portador del fármaco contra una fase acuosa en volumen. La baja solubilidad acuosa del fármaco bajo estas circunstancias da como resultado una alta probabilidad de partición del fármaco de regreso hacia el sistema portador en vez de eluir hacia la membrana de diálisis, dando como resultado ratas de partición aparentes artificialmente bajas. Tal experimento no refleja con exactitud el comportamiento observado para los fármacos hidrófobos in vivo, en donde el fármaco libre puede experimentar partición rápidamente hacia el actual depósito hidrófobo (por ejemplo, membranas celulares o proteína lipofílica) en vez de regresar hacia el vehículo de administración. Los experimentos de diálisis por lo tanto representan de manera equivocada la verdadera capacidad de administración de estas formulaciones. El medio más exacto para determinar las ratas de partición verdaderas in vivo es hacer un seguimiento tanto del fármaco como de la partícula utilizando un marcador no intercambiable. Consecuentemente fue necesario identificar tal marcador y confirmar que refleja la farmacocinética de la partícula.

Se llevaron a cabo estudios de eliminación para seguir tanto el producto como la partícula para obtener una descripción más adecuada del comportamiento de partición de los profármacos in vivo (Figura 1). La eliminación de profármacos fue seguida por HPLC, mientras que las ratas de eliminación fueron determinadas por nanopartículas de marcación con colesterilhexadecil éter tritido (<sup>3</sup>H-CHE). Este marcado es utilizado

ampliamente para seguir los liposomas in vivo puesto que es visto como un marcador lipídico no intercambiable, no metabolizable en esos sistemas. Se esperaba que la hidrofobicidad y el bajo nivel de hidratación de esta molécula diera como resultado ratas de partición bajas a partir de las partículas utilizadas en este estudio, y por lo tanto proveería una definición del destino de la partícula, con la condición de que la integridad de la partícula fuese mantenida.

Se llevó a cabo un cierto número de experimentos para determinar la validez de las suposiciones anteriores y aproximar la rata de eliminación del plasma de las partículas. Las formulaciones compuestas de 1/VES/2kPS3k (1:1:2) y 2/VES/2kPS3k (1:1:2) fueron marcadas con cantidades traza de  $^3\text{H-CHE}$  y los niveles de plasma tanto para el marcador como el profármaco fueron monitorizados en ratones Foxn1<sup>nu</sup> (Figura 1, Panel A). El marcador  $^3\text{H-CHE}$  se eliminó a la misma rata en ambos grupos, con una vida media de aproximadamente 24 horas. El profármaco 1 se eliminó aproximadamente a la misma rata que  $^3\text{H-CHE}$  en este sistema, mientras que 2 fue eliminado de una manera significativamente más rápida. La comparación de las relaciones profármaco/ $^3\text{H-CHE}$  (Figura 1, Panel B) demostraron que la relación de 1 al marcador de partículas permanecía virtualmente sin cambios en el transcurso del experimento, sugiriendo que la vida media de partición era significativamente más larga que la duración del experimento. El profármaco 2 disminuyó con respecto a  $^3\text{H-CHE}$  a una rata consistente con la vida media de partición de aproximadamente 4 horas. Los datos en el experimento podrían ser ajustados a un parámetro de disminución doble exponencial implicando que la constante de rata de partición cambia con el tiempo, presumiblemente en respuesta a cambios en el ambiente local a medida que el fármaco experimenta partición a partir de las partículas individuales.

Los efectos de la composición de la formulación en la eliminación fueron determinados comparando la eliminación en plasma de 1 y de  $^3\text{H-CHE}$  usando formulaciones 1/2kPS3k, 1/POCP/2kPS3k y 1/VES/2kPS3k marcadas con  $^3\text{H-CHE}$  (1:1:2) in vivo (datos no mostrados). Para todas las tres formulaciones las ratas de eliminación tanto del marcador como del profármaco se encontraron similares a las observadas para la Figura 1, indicando poco o ningún papel del colípido sobre la rata de eliminación de 1 en estas formulaciones. Se llevaron a cabo estudios de eliminación adicionales utilizando micelas 2kPS3k marcadas con  $^3\text{H-CHE}$  y nanopartículas POPC/2kPS3k (1:2), ninguna de las cuales contenía profármaco (datos no mostrados). En ambos casos el marcador  $^3\text{H-CHE}$  fue eliminado a aproximadamente a la misma rata que se observó para 1 en la Figura 1. Finalmente, los estudios que utilizaron formulaciones 1/VES/3kPS3k y 1/VES/2.5kPS1.6k mostraron que las variaciones moderadas en la relación de estabilizador poli(etilen glicol) poliestireno tenía poco efecto sobre la eliminación de 1 con respecto a la vista en la Figura 1 (datos no mostrados).

La eliminación de 1 en estas formulaciones encontró independiente de la composición de colípidos y estabilizador, y correspondió a la pérdida del marcador  $^3\text{H-CHE}$  con el tiempo. Estos resultados sugieren que el marcador  $^3\text{H-CHE}$  permanece con la partícula a lo largo del experimento farmacocinético, independientemente de los cambios en la composición de la partícula. Las vidas medias de circulación para estas partículas fueron notablemente largas (aproximadamente 24 horas), un orden de magnitud más largo que el que había sido reportado para micelas preparadas utilizando otros polímeros a estas concentraciones y comparable con el observado con liposomas de larga circulación.

Se determinó el efecto de la partición del profármaco en la eliminación del fármaco del plasma. El panel del profármaco fue seleccionado utilizando nanopartículas de profármaco/POPC/2kPS3k (1:1:2) en ratones Foxn1<sup>nu</sup> para determinar las ratas de eliminación para los diferentes conjugados de profármaco (Figura 2). Los niveles de circulación del profármaco parecieron ser dependientes primariamente de la rata de partición del profármaco, y consecuentemente reflejan de manera indirecta la rata, puesto que las partículas son suficientemente estables para permanecer intactas a lo largo del curso del experimento. Los conjugados fueron formulados a una concentración de 0.7 mg/mL. Las variaciones en concentración no parecen afectar la rata de eliminación de partículas puesto que la eliminación en plasma de 1/VES/2.5kPS1.6k (1:1:2) fue fundamentalmente independiente de la dosis en el rango de 3-25 mg/kg (datos no mostrados).

Con el fin de estimar la vida media de partición para cada profármaco, se asumió que 1 siguió la rata de eliminación de la partícula con base en los resultados discutidos anteriormente. La eliminación de todos los demás profármacos fue ajustada entonces a las curvas de descenso exponencial de doble parámetro y se normalizaron contra 1. La presencia o ausencia de profármaco en la formulación no afectó significativamente el comportamiento de eliminación de las partículas, implicando que los cambios en la composición con el tiempo a medida que el fármaco experimenta partición no afectó las ratas de eliminación de partículas. La eliminación de profármaco normalizada a 1 produjo por lo tanto una aproximación razonable de las vidas medias de partición relativa de los profármacos en estas formulaciones.

El profármaco 1 tenía una rata de partición despreciable por encima de 24 horas mientras que 2 en esta composición experimento partición con una vida media de aproximadamente 1.7 horas. Ambos profármacos utilizaron entrecruzadores de succinato y fueron significativamente menos activos que el paclitaxel in vitro. Las versiones con diglicolato de estos compuestos (3 y 4 respectivamente) mostraron una eliminación acelerada con respecto a sus progenitores de succinato, con vidas medias de partición de aproximadamente 13 horas y 1 hora, respectivamente. Esto es consistente con un nivel incrementado de hidratación durante la partición hacia la fase acuosa debido a la presencia del grupo 3-oxa del enlace diglicolato.

El efecto de cambios pequeños en el tamaño del ancla lipídica fue determinado utilizando las series 4, 5, 6 y 7, las cuales tenían unidades estructurales oleilo ( $\Delta C18$ ), estearilo (C18), cosanilo (C20) y docosanilo (C22), respectivamente. Con base en los resultados de la Figura 2 pudimos estimar que las vidas medias de partición para estos profármacos eran de aproximadamente 1 hora, 1.7 horas, 6.5 horas y 10 horas, respectivamente. Estos resultados indican que la liberación del profármaco desde las nanopartículas puede ser regulada ajustando la longitud del ancla alquilo usada.

El efecto de otros tipos de lípidos comunes en la cinética de partición también fue examinado. Un conjugado de colesteril diglicolato (8) fue retenido considerablemente más tiempo que la especie alifática de cadena recta, con una vida media de partición estimada de aproximadamente 21 horas. Desafortunadamente 8 fue susceptible de separación de fases a partir de las nanopartículas por almacenamiento y no se evaluó por completo en estudio de eficacias posteriores en este trabajo. Un derivado de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-succinato (9) fue evaluado en anticipación de que sería mejor retenido que 7 puesto que tiene dos anclas C14, sin embargo experimento partición más rápida, con una vida media de 8.5 horas. La rata de partición más alta fue debida probablemente a niveles incrementados de hidratación del esqueleto glicerol durante el intercambio desde la nanopartícula.

#### Ejemplo 5

##### Eficacia in vivo

Ratones lampiños atímicos hembra (7-8 semanas de edad) fueron inoculados por vía subcutánea con 100  $\mu$ l de células de carcinoma de colon humano HT29 ( $2 \times 10^6$  células) utilizando una aguja de calibre 26. Los ratones fueron agrupados aleatoriamente ( $n = 6$ /grupo) con un tamaño de tumor medio entre 80 y 120 mg antes del primer tratamiento. (Los tumores mayores de 200 mg y menores de 30 mg fueron excluidos). Las muestras de prueba fueron inyectadas con un volumen de 10  $\mu$ l de fármaco/g de peso corporal, hasta un máximo de 250  $\mu$ l. Se hicieron inyecciones subsecuentes de acuerdo con la agenda diseñada. Las mediciones de longitud y anchura del tumor, peso corporal y observaciones en vida fueron registradas 2-3 veces por semana. El peso del tumor fue calculado de acuerdo con la fórmula  $(L \times W^2)/2$ .

Las eficacias relativas de las formulaciones de nanopartículas de 1, 2, 4, 5, 6 y 7 fueron determinadas en el modelo HT29 utilizando una dosis de 36  $\mu$ mol/kg sobre una agenda Q4Dx6 (Figura 3). Se utilizó solución salina como control negativo. Experimentos anteriores llevados a cabo con dosis submáximas sugieren que esta dosis daría como resultado un rango de respuestas que encierran los comportamientos de los grupos de control positivo y negativo, y de esta manera permitiría discernir las potencias terapéuticas relativas de las especies de profármacos individuales. El profármaco 8 no estuvo incluido en el estudio debido a la precipitación del fármaco desde las formulaciones en almacenamiento. Los profármacos 3 y 9 fueron omitidos puesto que sus vidas medias de partición fueron similares a las de 6 y 7.

Los dos profármacos enlazados a succinato, 1 y 2, no mostraron evidencia de actividad terapéutica en la dosis de 34  $\mu$ mol/kg. Los resultados se correlacionaron con la observación de que estos profármacos fueron de 1-2 órdenes de magnitud menos potentes que el paclitaxel en ensayos de inhibición de crecimiento celular in vitro (Tabla 2). Las vidas media de partición de 2 y 1 difirieron ampliamente, variando desde 1.7 horas con 2 a marcos de tiempo experimentales no intercambiables efectivamente con 1. Estos resultados indican que aunque la especie 2 enlazada a succinato está siempre disponible para las células, la rata de hidrólisis inferior y la liberación concomitante de paclitaxel es insuficiente para proveer una respuesta terapéutica significativa.

Estudios de distribución de partículas in vivo preliminares indicaron una meseta en los niveles de acumulación de tumor en ~3% de la dosis inyectada por gramo de tejido de tumor, ocurriendo la mayoría de la acumulación dentro de las primeras 8 horas. En la literatura se han reportado resultados similares. En el caso de profármacos tales como 4 y 5 en donde las vidas medias de partición son aproximadamente 1 y 1.7 horas respectivamente, el nivel de fármaco administrado a los tumores se espera que sea significativamente inferior, probablemente teniendo en cuenta la eficacia reducida observada para estas especies. Los profármacos 6 y 7 liberan fármaco a ratas más bajas, con vida media de partición de aproximadamente 6.5 y 10 horas

respectivamente. Puesto que la acumulación de partículas en el tumor se espera que sea similar en todos los casos, las formulaciones con estos profármacos son capaces de administrar más fármaco al tumor.

Las cuatro especies enlazadas a diglicolato 4, 5, 6 y 7, dieron como resultado todos grados variables de inhibición del crecimiento tumoral. Los estudios de inhibición del crecimiento in vitro de estos profármacos habrían demostrado que la citotoxicidad de los profármacos enlazados a diglicolato era mayor en sus análogos de succinato (Tabla 2). Los datos de eliminación para estas formulaciones indicaron que la longitud de la cadena alifática estaba relacionada con las vidas medias de partición para los profármacos, los cuales fueron 1 hora, 1.7 horas, 6.5 horas y 10 horas respectivamente. Esto correlaciona bien con las tendencias de eficacia observadas, donde la respuesta antitumoral mayor es vista con el profármaco que tiene la vida media de partición más larga, a saber el conjugado 7 de docosanilo. La eficacia relativa fue determinada utilizando el retardo inducido por tratamiento para alcanzar un tamaño tumoral medio de 500 mm<sup>3</sup>, produciendo valores de 3, 4, 15 y 17 días, respectivamente. Con base en estos resultados, se abordaron investigaciones adicionales para optimizar la dosis y la agenda utilizando la formulación de nanopartículas de 7.

#### Ejemplo 6

##### Efecto de la dosis sobre la eficacia de 7

La actividad de 7 en formulaciones de nanopartículas POPC/2.5kPS3k con respecto a paclitaxel fueron determinadas por comparación de la eficacia de las dosis que varían de 0.25 a 3 equivalentes molares de paclitaxel (Figura 4) en el modelo de tumor HT29. El Taxol® dosificado a 23 µmol/kg sobre una agenda Q2Dx5 fue utilizado como control positivo. El régimen de dosificación fue escogido puesto que la mayor eficacia para 7 fue observada en una agenda Q2D, la cual también fue óptima para Taxol®, y la duración del tratamiento máximo tolerado a esta dosis de Taxol® fue de 5 inyecciones. La dosis tolerada máxima de 7 en esta agenda fue aproximadamente 3 equivalentes de paclitaxel (69 µmol/kg).

Los datos de crecimiento del tumor fueron analizados por dos métodos para determinar cuál dosis de 7 sería equivalente al control positivo de Taxol®. En el primer método fueron considerados solamente los grupos de tratamiento que dieron como resultado regresión del tumor. El retardo en alcanzar un tamaño tumoral de 125 mg fue medido a partir del inicio del tratamiento y luego normalizado contra el retardo observado para el grupo de Taxol®. El retardo relativo fue representado gráficamente contra los equivalentes de dosis de paclitaxel de 7, produciendo un conjunto de datos que mostró una respuesta lineal a la dosis hasta el MTD de 7. La curva ajustada indicó que 7 alcanzó paridad con Taxol® a una dosis de 1.75 equivalentes de dosis de paclitaxel. En el segundo análisis el retardo en alcanzar un tamaño de tumor de 300 mg fue medido con respecto al control negativo de solución salina y luego normalizado contra el retardo observado para el grupo del Taxol®. Representando gráficamente el retardo relativo contra los equivalentes de dosis de paclitaxel de 7 de nuevo produjo una respuesta lineal a la dosis que mostró que la paridad con el grupo del Taxol® se alcanzaba con 1.65 equivalentes de paclitaxel de 7. De manera importante, cuando la formulación en nanopartículas de 7 fue dosificada a 2 equivalentes molares de paclitaxel (69 µmol/kg) su MTD (69 µmol/kg), la actividad antitumoral fue significativamente mayor que la alcanzada con Taxol® administrado en su MTD. Específicamente, los tumores tratados con la formulación de nanopartículas de 7 en MTD permanecieron por debajo de 50 mg en el día 60 en contraste con los tumores tratados con Taxol® en MTD los cuales habían crecido hasta casi 300 mg (Figura 4).

La Figura 5 muestra el cálculo del número de equivalentes de paclitaxel de 7 para alcanzar paridad con el Taxol<sup>TM</sup>.

Los efectos de la dosis sobre la eficacia de las nanopartículas 7 fueron evaluados con respecto al Taxol®. La respuesta terapéutica óptima fue observada con una dosificación Q2D en el modelo de tumor sólido HT29. Las nanopartículas utilizadas para formular 7 tienen una vida media de eliminación de aproximadamente 24-36 horas, mientras que 7 en sí mismo tiene una vida media de partición de aproximadamente 10 horas. Estos valores son consistentes con una liberación efectiva de profármaco en el sitio del tumor durante un periodo de aproximadamente dos días después de la administración, coincidiendo con la agenda Q2D. La titulación de la dosis de fármaco a través de 0.25x a 3x equivalentes de paclitaxel en comparación con Taxol® en MTD mostró que 7 alcanzó una eficacia equivalente a aproximadamente 1.7 equivalentes de paclitaxel. Puesto que la respuesta de dosis para 7 es lineal al MTD es posible mejorar significativamente la eficacia sobre la dosis máxima tolerada de Taxol® utilizando dosis más altas de 7. Los profármacos que son mejor retenidos que 7 en las nanopartículas alcanzarían paridad a dosis incluso más bajas que la vista para 7.

#### Referencias

- (1) Hennenfent, K.L.; Govindan, R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?, *Ann. Oncol.* 2006, 17, 734-749
- (2) Hamaguchi, T.; Matsumura, Y.; Suzuki, M.; Shimizu, K.; Goda, R.; Nakamura, I.; Yokoyama, M.; Kataoka, K.; Kakizoe, T. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel, *Br. J. Cancer* 2005, 92, 1240-1246
- (3) Ansell, S. Lipophilic drug derivatives for use in liposomes. U.S. Patent 5,534,499 1996
- (4) Hostetler, K.Y.; Sridhar, N.C. Prodrugs for oral administration containing Taxol covalently bound to a phospholipid. U.S. Patent 5,484,809 1996
- (5) Stevens, P.J.; Sekido, M.; Lee, R.J. A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm. Res.* 2004, 21, 2153-2157
- (6) Perkins, W.R.; Ahmad, I.; Li, X.; Hirsh, D.J.; Masters, G.R.; Fecko, C.J.; Lee, J.K.; Ali, S.; Nguyen, J.; Schupsky, J.; Herbert, C.; Janoff, A.S.; Mayhew, E. Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds. *Int. J. Pharm.* 2000, 200, 27-39
- (7) Ali, S.; Ahmad, I.; Peters, A.; Masters, G.; Minchey, S.; Janoff, A.S.; Mayhew, E. Hydrolyzable hydrophobic taxanes: synthesis and anti-cancer activities. *Anticancer Drugs* 2001, 12, 117-128
- (8) Lundberg, B.B.; Risovic, V.; Ramaswamy, M.; Wasan, K.M. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. *J. Control. Release* 2003, 86, 93-100
- (9) Rodrigues, D.C.; Maria, D.A.; Fernandes, D.C.; Valduga, C.J.; Couto, R.D.; Ibanez, O.C.M.; Maranhao, R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2005, 55, 565-576
- (10) Zakharian, T.Y.; Seryshev, A.; Sitharaman, B.; Gilbert, B.E.; Knight, V.; Wilson, L.J. A fullerene-paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization and study of biological activity in tissue culture. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12508-12509
- (11) Bradley, M.O.; Webb, N.L.; Anthony, F.H.; Devanesan, P.; Witman, P.A.; Hemamalini, S.; Chander, M.C.; Baker, S.D.; He, L.; Horwits, S.B.; Swindell, C.S. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7, 3229-3238
- (12) Deutsch, H.M.; Glinski, J.A.; Hernandez, M.; Haugwitz, R.D.; Narayanan, V.L.; Suffness, M.; Zalkow, L.H. Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 788-792
- (13) Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Flash nanoprecipitation of organic actives and block copolymers using a confined impinging jets mixer. *Aust. J. Chem.* 2003, 56, 1021-1024
- (14) Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* 2003, 91, 118302
- (15) Fetterly, G.J.; Straubinger, R.M. Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats, *AAPS PharmSci* 2003, 5, 1-11
- (16) Sparreboom, A.; Scripture, C.D.; Trieu, V.; Williams, P.J.; De, T.; Yang, A.; Beals, B.; Figg, M. Hawkins, W.D.; Desai, N. Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in cremophor (Taxol). *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 4136-4143
- (17) Sparreboom, A.; van Zuilen, L.; Brouwer, E.; Loos, W.J.; de Bruijn, P.; Gelderblom, H.; Pillay, M; Nooter, K.; Stoter, G.; Verweij, J. Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res.* 1999, 59, 1454-1457

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas o micelas, en donde dichas nanopartículas o micelas son formadas a partir de la asociación (i) de un conjugado de taxano acoplado con un ancla lipídica hidrófoba a través de un enlazante diglicolato con (ii) un lípido y/o un estabilizador anfifílico.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1 en donde dicho conjugado de taxano está asociado con un lípido y un estabilizador anfifílico.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2 en donde el taxano es paclitaxel.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el ancla lipídica hidrófoba es derivada de un alcohol de cadena larga, un tocoferol o un esteroide.
- 10 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el lípido es un fosfolípido o un tocoferol.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el estabilizador anfifílico es un copolímero.
7. La composición de la reivindicación 6 en donde dicho copolímero comprende polietilen glicol y poliestireno.
- 15 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 la cual contiene adicionalmente un agente antineoplásico adicional formulado para imitar la farmacocinética de la composición que contiene taxano.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de cáncer y otras indicaciones hiperproliferativas, en donde dicha composición va a ser administrada a un sujeto que requiere de tal tratamiento.
- 20 10. La composición de la reivindicación 9 en donde un agente antineoplásico adicional formulado para imitar la farmacocinética de la composición que contiene taxano también es administrado al sujeto bien sea mezclado con la composición que contiene taxano o de manera sustancial simultáneamente como una composición separada.
- 25 11. Un método para preparar la composición de la reivindicación 1, método que comprende mezclar rápidamente agua y un solvente miscible que contiene dicho conjugado de taxano, lípido, y/o estabilizador anfifílico en un espacio confinado utilizando ratas de flujo controladas.

5 Panel A: Eliminación de 1 (O) y 2 (●) en formulaciones de profármaco/VES/2kPS3k (1:1:2; p/p) marcadas con <sup>3</sup>H-CHE (□ y ■ respectivamente) en ratones lampiños atómicos Foxn1<sup>nu</sup> dosificados a dosis de 35 mg de fármaco/kg (n = 3/punto en el tiempo) Panel A. Las concentraciones de fármaco fueron determinadas por análisis por HPLC de plasma recuperado en diversos puntos de tiempo. Panel B: La retención relativa del fármaco fue determinada utilizando la relación de fármaco/<sup>3</sup>H-CHE en ratones individuales para los sistemas 1 y 2 (Δ y ▲ respectivamente). Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

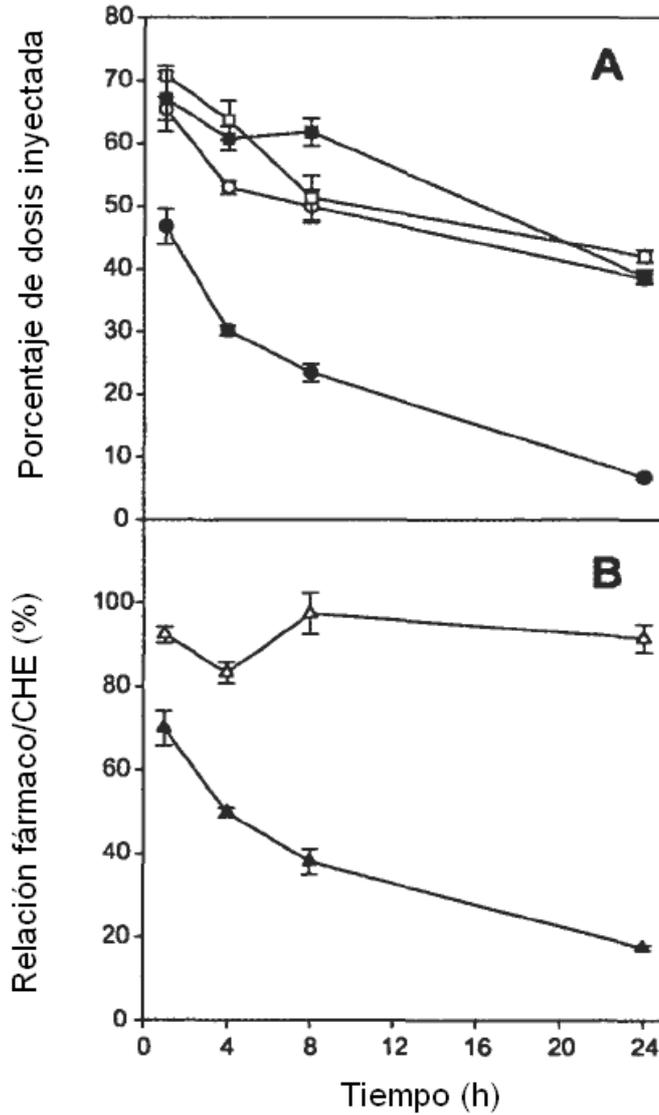


Figura 1

5 Eliminación de profármaco formulado como formulaciones profármaco/POPC/2kPS3k (1:1:2; p/p) y administrado por vía intravenosa a ratones lampiños atímicos en Foxn1<sup>nu</sup> a una dosis de 7 mg/kg (n=3/punto de tiempo). Las concentraciones de fármaco fueron determinadas por análisis de HPLC de plasma aislado en diversos puntos de tiempo. Los profármacos utilizados fueron: 1 (●); 2 (○); 3 (◇); 4 (■); 5 (□); 6 (▲); 7 (△); 8 (▼); y 9 (▽). Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

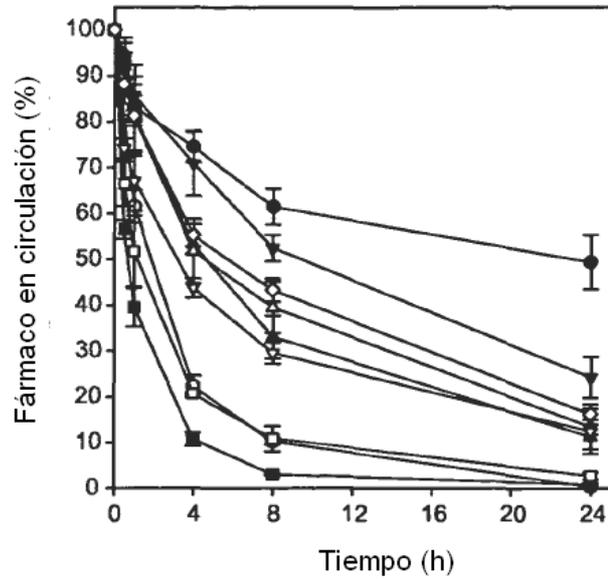


Figura 2

5 La eficacia relativa de los profármacos formulados como nanopartículas de profármaco/POPC/2kPS3k (1:1:2; p/p) cuando se administraron a ratones lampiños atómicos que portaban xenoinjertos de carcinoma de colon humano HT29. El fármaco fue administrado a una dosis de 36  $\mu\text{mol/kg}$  utilizando una agenda Q4Dx6. Los profármacos y los controles utilizados fueron solución salina (●), 1 (□); 2 (▲); 4 (▽); 5 (◆); 6 (○); 7 (■). Las barras de error representan la desviación estándar (n=6).

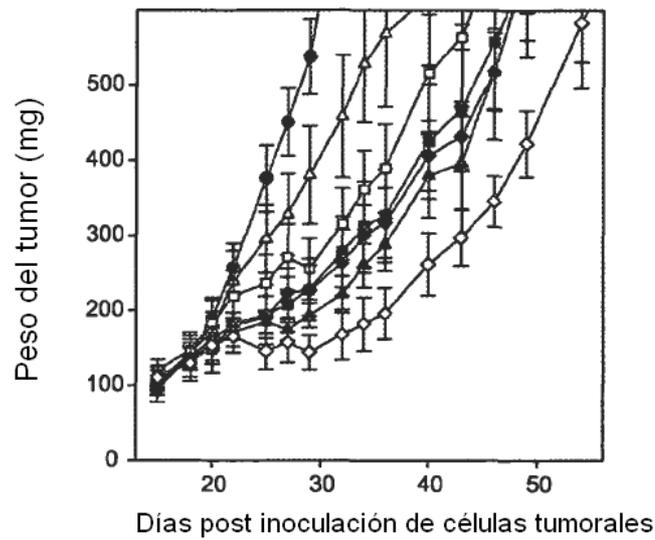


Figura 3

- 5 Efecto de la dosis sobre la eficacia de nanopartículas de 7/POPC/2kPS3k en el modelo de carcinoma de colon humano HT29. Los ratones lampiños atómicos fueron inyectados por vía intravenosa con las formulaciones 14 días después de la inoculación de las células tumorales. Se administró 7/POPC/2kPS3k (1:1:2) a 69  $\mu\text{mol/kg}$  (3X equivalentes de paclitaxel,  $\square$ ), 46  $\mu\text{mol/kg}$  (2X equivalentes de paclitaxel,  $\Delta$ ), 34  $\mu\text{mol/kg}$  (1.5 equivalentes de paclitaxel,  $\nabla$ ), 23  $\mu\text{mol/kg}$  (1X equivalentes de paclitaxel,  $\diamond$ ) y 5.7  $\mu\text{mol/kg}$  (0.25 equivalentes de paclitaxel,  $\blacktriangledown$ ) utilizando una agenda Q2Dx5. Se utilizó solución salina (Q2Dx5,  $\blacksquare$ ) como control negativo. El Taxol® fue administrado a 23  $\mu\text{mol/kg}$  utilizando una programación de dosificación Q2Dx5 ( $\bullet$ ). Las barras de error representan la desviación estándar (n=6).

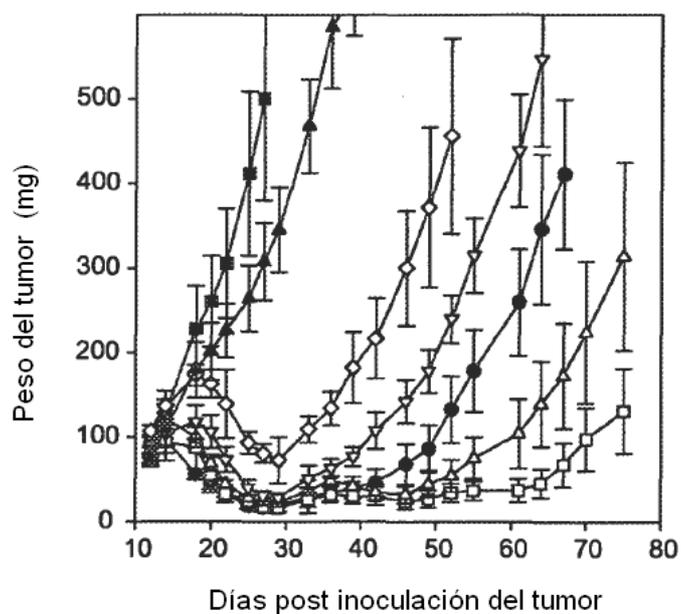


Figura 4

Cálculo del número de equivalentes de paclitaxel de 7 requeridos para alcanzar paridad con Taxol<sup>TM</sup>.

Los datos de crecimiento tumoral fueron analizados por dos métodos para determinar cuál dosis de 7 sería equivalente al control positivo de Taxol®.

5 El retardo en alcanzar un tamaño tumoral de 300 mg fue medido con respecto al control negativo de solución salina y luego normalizado contra el retardo observado para el grupo de Taxol®. La representación gráfica del retardo relativo contra los equivalentes de la dosis de paclitaxel de 7 produjo una respuesta a la dosis lineal la cual mostró que la paridad con el grupo de Taxol® fue alcanzada con 1.65 equivalentes de paclitaxel de 7.

10 El retardo en alcanzar un tamaño tumoral de 125 mg fue medido a partir del inicio del tratamiento y luego normalizado contra el retardo observado para el grupo del Taxol®. El retardo relativo fue representado gráficamente contra los equivalentes de la dosis de paclitaxel de 7, produciendo un conjunto de datos que mostró una respuesta lineal a la dosis hasta el MTD de 7. La curva ajustada indicó que 7 alcanzó paridad con Taxol® a una dosis de 1.75 equivalentes de dosis de paclitaxel.

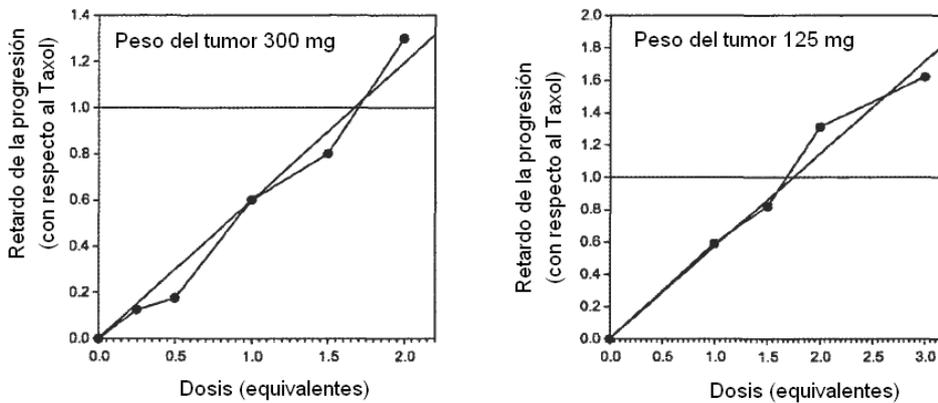


Figura 5