

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 876**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/91** (2006.01)  
**C08G 63/08** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2007.01)  
**A61K 47/42** (2007.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C08G 63/685** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2013 PCT/CN2013/083958**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO2014063549**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2013 E 13848829 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2913353**

54 Título: **Bloque copolimérico anfifílico y método de preparación del mismo y sistema micelar de carga de fármacos formado por el mismo con un fármaco antitumoral**

30 Prioridad:

**26.10.2012 CN 201210414318**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2017**

73 Titular/es:

**CHANGZHOU TARGET MEDICINE TECHNOLOGY CO., LIMITED (100.0%)  
 No. 18, Huashan Road, Xinbei District,  
 Changzhou City  
 Jiangsu 213022, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, KE;  
 GONG, FEIRONG;  
 XU, HUI;  
 LANG, YUEWU;  
 FAN, HUAYING;  
 HAN, FEI y  
 CHE, XIN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 613 876 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

Bloque copolimérico anfífilico y método de preparación del mismo y sistema micelar de carga de fármacos formado por el mismo con un fármaco antitumoral

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un bloque copolimérico anfífilico, el método de preparación del mismo, y un sistema micelar de carga de fármacos estable formado por dicho copolímero y un fármaco antitumoral, y que pertenece al campo de la formulación de nanofármacos.

10

**Antecedentes**

El tumor es una enfermedad que pone en peligro seriamente la vida del ser humano. Es de gran importancia investigar y desarrollar fármacos antitumorales seguros y eficaces para mejorar la calidad de vida del ser humano.

15

Los taxanos (incluyendo el paclitaxel (PTX), docetaxel (DTX), cabazitaxel y larotaxel) son una clase de fármacos antitumorales de amplio espectro. Su mecanismo de acción incluye principalmente la polimerización y estabilización de microtúbulos, haciendo fijas las células tumorales que se dividen rápidamente en la mitosis, bloqueando la replicación de las células cancerosas y dando lugar a la muerte de las células. Se ha demostrado en experimentos *in vitro* que los taxanos tenían un significativo efecto radiosensibilizante, y hace que las células se suspendan en las fases G2 y M, durante las que las células son sensibles a la radioterapia. Sin embargo, casi todos los taxanos son altamente hidrófobos y tienen una baja absorción por vía oral, y por lo tanto la única vía de administración es por inyección. Debido a la dificultad de preparar una solución acuosa de los taxanos, a menudo se añaden tensioactivos en las formulaciones disponibles en el mercado para aumentar la solubilidad de los fármacos. Sin embargo hay muchas desventajas en este método de solubilización: (1) tanto el aceite de ricino polioxiethylado (Cremophor® EL) que se utiliza como solubilizante del paclitaxel (nombre comercial: Taxol) como el Tween 80 que se utiliza como solubilizante del docetaxel (nombre comercial: Taxotere) y el cabazitaxel (nombre comercial: JEV TANA), producen fácilmente alergias; por lo tanto, los pacientes tienen que aceptar un tratamiento antialérgico antes del uso del fármaco; (2) la estabilidad del fármaco es pobre, y la disponibilidad tras la inyección no es alta; los fármacos de las formulaciones anteriores precipitan fácilmente al diluirlas; los fármacos se tienen que someter a una filtración especial antes de la administración; la solución por inyección se tiene que diluir lentamente, y el grado de precipitación del fármaco varía a menudo según el operario, lo que da como resultado que se inyecte una cantidad de fármaco poco precisa en el cuerpo y entonces diferentes eficacias terapéuticas; (3) la toxicidad hematológica es alta: tanto el Cremophor® EL como el Tween 80 pueden producir toxicidad hematológica, que es el principal factor restrictivo de la mejoría de la dosificación terapéutica.

20

25

30

35

La Doxorubicina es un antibiótico antitumoral y pertenece a los fármacos citotóxicos, al igual que los taxanos. Inhibe la síntesis de ARN y ADN, y tiene una inhibición más fuerte sobre el ARN. Tiene un amplio espectro antitumoral y es eficaz para una variedad de tumores. Como fármaco inespecífico del ciclo celular, la doxorubicina puede destruir las células tumorales en varios estadios de crecimiento. La doxorubicina se utiliza principalmente en el tratamiento de leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide. Las formulaciones convencionales de Doxorubicina tienen efectos secundarios tales como toxicidad cardíaca significativa y supresión de médula ósea.

40

45

La Epirubicina, un isómero de la doxorubicina, tiene una eficacia terapéutica igual o ligeramente mayor y menos toxicidad para el corazón, en comparación con la Doxorubicina.

La Curcumina ha recibido una amplia atención en años recientes como un fármaco no citotóxico con potencial actividad antitumoral. La característica principal de la curcumina se basa en que tiene pocos efectos secundarios y tiene efectos terapéuticos adyuvantes como anti-inflamatorios, anti-oxidantes, etc. El mayor inconveniente de la curcumina es la baja hidrosolubilidad. La preparación de una formulación de curcumina acuosa estable ha atraído una atención creciente en los últimos años.

50

Se han desarrollado micelas poliméricas como un nuevo sistema de suministro en los últimos años. Las micelas se forman habitualmente por la orientación de una gran cantidad de cadenas moleculares en bloques copoliméricos anfífilicos. Los fármacos se encapsulan en el núcleo micelar por una débil interacción entre el segmento hidrófobo del bloque copolimérico y las moléculas de fármaco, y el segmento hidrófilo está hacia el exterior para estabilizar la micela, formando una típica estructura de núcleo con una cubierta. Las micelas poliméricas no solo aumentan la solubilidad de los fármacos y la dosificación terapéutica, sino que también evita la degradación e inactivación de fármacos y reducen la toxicidad encapsulando los fármacos en ellas. El diámetro de la micela es habitualmente menor de 100 nm, y la cubierta habitualmente es un segmento de PEG hidrófilo; por lo tanto, son capaces de evitar la fagocitosis por el sistema retículoendotelial (SER), aumentan el tiempo de circulación y consiguen el direccionamiento pasivo a los tumores por medio del efecto EPR (efecto de aumento de permeabilidad y retención). Además, debido a su alto peso molecular, las micelas poliméricas son capaces de evitar el aclaramiento renal. En comparación con el tensioactivo molecular pequeño, la CMC (concentración crítica de micelas) de la micela polimérica es mucho menor, y la estructura micelar se mantiene estable al diluirse. La eficacia de carga de fármacos

55

60

65

del sistema micelar de carga de fármacos puede alcanzar el 25 %, que es capaz de cumplir las necesidades de dosificación clínica. Al mismo tiempo, los materiales poliméricos son biodegradables y biocompatibles.

5 Se considera que las micelas poliméricas son un nuevo sistema de suministro de fármacos con un gran potencial, particularmente para fármacos antitumorales con solubilidad baja. Sin embargo, su relativamente baja estabilidad en solución se ha convertido en el problema clave para transferir este nuevo sistema de suministro de fármacos en la investigación clínica. Particularmente, la estabilidad de micelas de taxano generalmente es baja. La micela de paclitaxel para inyección (nombre comercial: Genexol PM) que se aprobó por primera vez en Corea, por ejemplo, se mantiene estable no más de 24 h en solución a temperatura ambiente (Lee SW, et al, *Ionic Fixed Polymeric Nanoparticles as a Novel Drug Carrier*, Pharmaceutical Research, 2007, 24: 1508-1516). Samyang Corporation ha hecho un gran esfuerzo para mejorar la estabilidad de las micelas de paclitaxel. Por ejemplo, se desvela en el documento WO 01/87345 A1 que el grupo hidroxilo terminal del bloque copolimérico estaba protegido en el extremo con un acetoxi o benzoilo para aumentar la compatibilidad entre el segmento hidrófobo y el fármaco, y de esta manera mejorar la estabilidad de la micela. Sin embargo, la micela preparada con el copolímero se mantiene estable durante hasta 3 días a temperatura ambiente *in vitro*, y la estabilidad *in vivo* de la micela era menor. La estabilidad de la solución micelar de docetaxel o cabazitaxel, que son derivados del paclitaxel, es incluso menor. Hasta la fecha, tomando como ejemplo la micela de docetaxel, hay pocos casos en los que se puede transferir a un estudio clínico, y el factor clave es la poca estabilidad de la solución de la micela (Gaucher G, et al. *Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes*, Journal of Controlled Release, 2010, 143: 2-12). Tomando la micela Nanoxel PM™ (en la que se utiliza mPEG-PLA como excipiente polimérico, se utiliza docetaxel como fármaco) de Korea Samyang Corporation como ejemplo, cuando la eficacia de carga del fármaco de la micela es del 5 % y la concentración del fármaco es de 0,1-2 mg/ml, la micela es estable a temperatura ambiente durante solo 6 h (Lee SW, et al, *Development of docetaxel-loaded intravenous formulation, Nanoxel-PM™ using colymer-based delivery system*, Journal of Controlled Release, 2011, 155: 262-271). La micela se desintegra rápidamente tras administrarse en el cuerpo, y el fármaco se une inmediatamente a las proteínas de la sangre (tales como albúmina); por lo tanto, el efecto EPR de la micela está disminuido. Los resultados en animales de experimentación mostraban que no había diferencia en la eficacia del fármaco entre las micelas Nanoxel PM™ y la inyección de docetaxel, y no hay una mejoría en la mayor dosis tolerada; por lo tanto, no existen ventajas significativas con las micelas Nanoxel PM™. Por otra parte, debido a la similitud estructural entre docetaxel y cabazitaxel, la estabilidad de la micela mPEG-PLA/cabazitaxel es similar a la del docetaxel. Se ha descubierto en el estudio de los inventores que cuando la concentración de fármaco en la micela de mPEG-PLA/cabazitaxel es de 5 mg/ml, la solución micelar se mantiene estable a temperatura ambiente no más de 2 h. Ni la eficacia *in vivo* ni la seguridad se mejoran de manera eficaz. Además, existe una gran dificultad para la preparación de dichas micelas inestables a gran escala.

35 Los taxanos están entre los descubrimientos más grandes en la investigación y desarrollo de fármacos antitumorales en los últimos 20 años, y se mantendrán como fármacos antitumorales principales en los próximos 20 años. Debido a su toxicidad limitante de la dosis, el foco principal de los investigadores ha estado siempre sobre cómo utilizar completamente la eficacia del fármaco. Como sistema de suministro con gran potencial para los taxanos, la inestabilidad de las micelas se ha convertido en el mayor fallo de este sistema de suministro de fármacos, y como las razones que producen dicha inestabilidad aún no se han aclarado, los investigadores han hecho un gran esfuerzo para mejorar la estabilidad de las micelas con taxanos encapsulados. Por ejemplo, como se desvela en la patente 201010001047, para mejorar la estabilidad de una micela de paclitaxel, se añadieron aminoácidos a la solución de micelas (los aminoácidos se añadieron durante la formación de las micelas), pero en la divulgación no hay información acerca de la localización de los aminoácidos en las micelas (solamente como un agente de barrera física de la micela o moléculas co-presentes con las moléculas de fármaco en el núcleo hidrófobo de la micela). Mientras tanto, como aditivo auxiliar, se desconoce si el aminoácido es capaz de mantener la estabilidad micelar aún después de su administración al cuerpo y la dilución por la sangre; por lo tanto, el efecto el fármaco *in vivo* sigue sin aclararse. Además, se ha informado que atrapando el paclitaxel y docetaxel juntos en una micela copolimérica puede aumentar significativamente la eficacia de carga de fármaco y la estabilidad de la micela; pero esta micela cargada con fármacos binaria no se ha reconocido aún en la clínica (Shao Cheng Wei, etc., *In vitro stability of paclitaxel and docetaxel binary-drug loaded micelles*, Journal of China Pharmaceutical University, 2010,41:428-434). Huh et al., sintetizaron una micela con el bloque copolimérico PDENA-PEG. La micela mostraba una estabilidad a largo plazo tras encapsular paclitaxel, por los datos que soportan la seguridad insuficientes de los materiales poliméricos presentaba grandes desafíos de seguridad para su uso clínico (Huh KM, et al. *Hydmotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel*. Journal of Controlled Release, 2005,101 (1-3):59-68).

### Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a un sistema micelar de carga de fármacos, que se caracteriza porque comprende al menos un bloque copolimérico anfifílico, al menos un fármaco antitumoral con una cantidad terapéuticamente eficaz, y un agente farmacéutico auxiliar farmacéuticamente aceptable; en el que dicho bloque copolimérico anfifílico comprende un segmento hidrófilo, y un segmento hidrófobo; en el que dicho segmento hidrófilo es polietilenglicol o metoxipolietilenglicol con un valor medio de peso molecular de 750 a 5000; y dicho segmento hidrófobo se selecciona de entre el grupo que consiste en poliláctido, poliglicólido, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, policarbonato y polidioxanona, que cada uno tiene un valor medio del peso molecular en el intervalo de 1000 a 50000 y están protegidos en sus extremos con un grupo hidrófobo; dicho grupo hidrófobo es t-

butoxicarbonil fenilalanina.

Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un bloque copolimérico anfífilico que afronta los problemas anteriores de la técnica anterior. Un bloque copolimérico de metoxipolietilenglicol (o polietilenglicol)-poliéster con seguridad reconocida se utiliza como el material fundamental del bloque copolimérico anfífilico, y el grupo hidroxilo terminal del segmento de poliéster se modifica con un grupo hidrófobo por la introducción de un grupo hidrófobo con una estructura espacial grande, tal como el grupo t-butoxicarbonilo, aminoácidos con fenilo o derivados de los mismos, mejorando de esta manera la compatibilidad entre la molécula de fármaco y el segmento hidrófobo del bloque copolimérico y la interacción entre ellos aumenta; la introducción de un grupo hidrófobo con una gran estructura espacial proporciona un espacio mayor para las moléculas de fármaco que entran en el núcleo de las micelas; por lo tanto, es más difícil que se disuelvan los fármacos fuera del núcleo de la micela, y por lo tanto se obtiene una micela cargada de fármaco con alta estabilidad. La mayor significancia de la presente invención se basa en que se mejora la estabilidad de la micela en solución, especialmente la estabilidad *in vivo*; por lo tanto se asegura el efecto EPR de las micelas, se consigue una mejor biodisponibilidad y efecto terapéutico de los fármacos.

Se describe en el presente documento:

Un bloque copolimérico anfífilico, que se caracteriza por que el segmento hidrófilo del mismo es polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol (mPEG) con un valor medio del peso molecular en el intervalo de 400 a 20000; cuyo segmento hidrófobo se selecciona de entre el grupo que consiste en poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), policarbonato (PTMC) y derivados de los mismos, y polidioxanona (PPDO) y derivados de la misma, que tienen cada uno un valor medio de peso molecular en el intervalo de 500 a 10000 y está protegido en su extremo con un grupo hidrófobo que se selecciona de entre el grupo que consiste en t-butil-acilo, t-butil-acetilo, un resto de aminoácido y un resto derivado de un aminoácido.

Se describe además que dichos derivados de aminoácidos se seleccionan preferentemente de ácido  $\gamma$ -bencil glutámico, ácido  $\beta$ -bencil aspártico y derivados de aminoácidos protegidos en el grupo amino.

Además se describe que dicho derivado de aminoácido se selecciona más preferentemente de entre un aminoácido protegido con bencilo o t-butoxicarbonilo (Boc).

Además se describe que dicho derivado de aminoácido es t-butoxicarbonil-fenilalanina.

En la presente invención, dicho segmento hidrófobo se selecciona de entre el grupo que consiste en poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), policarbonato (PTMC) y derivados de los mismos, y polidioxanona (PPDO) y derivados de la misma, que tienen cada uno un valor medio de peso molecular en el intervalo de 1.000 a 50.000; dicho segmento hidrófilo se selecciona de entre polietilenglicol y metoxipolietilenglicol con un valor medio de peso molecular en el intervalo de 750 a 5.000.

Un objetivo adicional de la presente divulgación es proporcionar un método para preparar dicho bloque copolimérico anfífilico.

Se describe en el presente documento:

El método para preparar dicho bloque copolimérico anfífilico que comprenden las siguientes etapas:

1) añadir un segmento hidrófilo con un valor medio de peso molecular en el intervalo de 400 a 20000 en un matraz para la polimerización; calentar a 100 °C-130 °C y deshidratar al vacío durante 2 h-4 h; luego añadir el monómero del segmento hidrófobo y octoato de estaño como catalítico, donde el peso del octoato de estaño es un 0,3%-1% de dicho monómero; sellar el matraz al vacío, llevar a cabo la reacción con los reactivos anteriores a 100 °C-150 °C durante 12 h -24 h; luego disolver con diclorometano, etanol, tetrahidrofurano, metanol, acetato de etilo o acetona; añadir éter dietílico para precipitar completamente el polímero, seguido por filtración y secado al vacío para obtener el bloque copolimérico compuesto del segmento hidrófilo y el segmento hidrófobo, donde dicho segmento hidrófilo es polietilenglicol (PEG) o metoxipolietilenglicol (mPEG); 2) disolver el bloque copolimérico compuesto por el segmento hidrófilo y el segmento hidrófobo en acetato de etilo, tetrahidrofurano, diclorometano, acetato de etilo o agua doblemente destilada; luego añadir t-butilacilo, t-butilacetilo, un resto de aminoácido o un resto derivado de aminoácido para llevar a cabo la reacción de conversión del grupo hidroxilo terminal en un grupo hidrófobo; filtrar para eliminar la sustancia insoluble, añadir una cantidad suficiente de éter dietílico para precipitar el polímero; filtrar y secar al vacío para obtener el copolímero diana.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema micelar de carga de fármacos formado por dicho bloque copolimérico anfífilico.

Las soluciones técnicas de la presente invención se describen en las reivindicaciones y además se proporcionan de la siguiente manera:

- 5 El sistema micelar de carga de fármacos formado por dicho bloque copolimérico anfifílico con un fármaco antitumoral, en el que dicho sistema micelar de carga de fármacos comprende al menos uno de dichos bloques copoliméricos anfifílicos, al menos un fármaco antitumoral con una cantidad terapéuticamente eficaz, y un agente farmacéutico auxiliar farmacéuticamente aceptable.
- 10 En una realización preferida, dicho agente farmacéutico auxiliar es un excipiente para la liofilización.
- 15 En una realización preferida, dicho excipiente para la liofilización es al menos uno de entre lactosa, manitol, sacarosa, trealosa, fructosa, glucosa, alginato sódico y gelatina.
- 20 Dicho agente farmacéutico auxiliar incluye además un antioxidante, agente formador de complejos con iones metálicos, agente de ajuste del pH o agente de ajuste de la isotonicidad, y similares; dicho antioxidante es sulfito de sodio, bisulfito de sodio, o metabisulfito de sodio, y similares, dicho agente formador de complejos con iones metálicos es edetato disódico, edetato disódico cálcico o tetraacetato diamina de ciclohexileno sódico, y similares; dicho agente de ajuste del pH es ácido cítrico, bicarbonato sódico, fosfato de hidrógeno disódico o fosfato dihidrógeno sódico y similares; dicho agente de ajuste de la isotonicidad es cloruro sódico o glucosa, y similares.
- 25 En una realización preferida, dicho fármaco antitumoral es al menos uno de entre taxanos, incluyendo paclitaxel (PTX), docetaxel (DTX), cabazitaxel y larotaxel, curcumina, doxorubicina, epirubicina y similares.
- En una realización preferida, la relación de peso del bloque copolimérico anfifílico respecto al fármaco está en el intervalo de 99,5:0,5 a 50:50, preferentemente en el intervalo de 99,1 a 75:25.
- En una realización preferida, dicho excipiente para la liofilización supone del 0 a 99,9 %, preferentemente del 10,0 % al 80,0 % del sistema entero por peso.
- 30 La formulación micelar polímero-fármaco antitumoral de la presente invención se puede utilizar en el tratamiento de un cáncer, preferentemente que se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer prostático, cáncer ovárico, cáncer intestinal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, etc.
- 35 La cantidad terapéuticamente eficaz que se menciona en la presente invención se refiere a la cantidad de fármaco antitumoral contenido en dicho sistema micelar de carga de fármacos que es eficaz en el tratamiento de cánceres (particularmente, cáncer de mama, cáncer prostático, cáncer ovárico, cáncer intestinal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, etc.).
- 40 El sistema micelar de carga de fármacos de la presente invención se puede administrar por inyección, y generalmente se preparar como un polvo liofilizado. De manera adicional, un experto en la técnica puede determinar la dosificación de administración en referencia a la dosificación de fármacos antitumorales existentes, y ajustarla según el estado individual.
- 45 Se describe además un método para preparar dicho sistema micelar de carga de fármacos formado por el bloque copolimérico anfifílico y un fármaco antitumoral, incluyendo un método de diálisis, un método de disolución directa, un método de hidratación en película, un método de dispersión en sólidos y un método de homoemulsión de alta energía, preferentemente un método de hidratación en película y un método de dispersión en sólidos.
- 50 Las etapas de dicho método de hidratación en película incluyen: disolver el polímero y el fármaco en un disolvente orgánico; retirar el disolvente por evaporación con rotación; luego añadir agua para inyección para disolver la película de fármaco de manera que se obtenga la solución de la micela con carga de fármaco; y obtener el polvo liofilizado de la micela tras la esterilización por filtración y liofilización.
- 55 Las etapas de dicha dispersión en sólidos incluyen: disolver el fármaco en el polímero que está en estado fundido por calentamiento para dar una mezcla transparente (durante esta etapa, se puede añadir una pequeña cantidad de disolventes orgánico para ayudar a la disolución); añadir agua para inyección para disolver y obtener la solución de la micela; y obtener el polvo liofilizado de la micela tras esterilización por filtración y liofilización.
- 60 En comparación con la técnica anterior, la presente invención tiene las siguientes propiedades:
- 65 1) In la presente invención, en vista de la hidrofobia y la gran estructura estérica de la mayoría de los fármacos antitumorales, el grupo hidroxilo terminal del segmento de poliéster se modifica con un grupo hidrófobo, de manera que mejora la compatibilidad entre las moléculas de fármaco y el segmento hidrófobo del bloque copolimérico, y aumenta la interacción entre ellos. Entre tanto, el espacio para acomodar las moléculas de fármaco en el núcleo micelar aumenta, y las moléculas de fármaco se restringen al núcleo micelar, y es difícil que se disuelvan fuera del núcleo micelar. Por lo tanto, se obtiene una serie de micelas cargadas de fármaco con alta

estabilidad tanto *in vivo*, como *in vitro*. Dichas micelas cargadas de fármaco se pueden preparar como formulaciones liofilizadas.

2) Se ha demostrado en los experimentos que la formulación liofilizada de la micela cargada con fármacos por el bloque copolimérico anfifílico de la presente invención se dispersan rápidamente para formar una solución transparente con una opalescencia azulada tras la reconstitución. La solución es estable a temperatura ambiente durante al menos 24 horas sin una precipitación evidente de los fármacos, y proporciona un potencial efecto EPR *in vivo* tras la inyección. La invención tiene buenas perspectivas para aplicaciones industriales.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es el cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB, PDI = 1,05;  
 La Figura 2 es el cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>1800</sub>-BP, PDI = 1,05;  
 La Figura 3 es el espectro de <sup>1</sup>H-NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-BP, PDI = 1,05;  
 La Figura 4 es el cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-Asp, PDI = 1.05;  
 La Figura 5 es el cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS, PDI = 1.05;  
 La Figura 6 es el cromatograma de penetración en gel de PEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS, PDI = 1.05;  
 La Figura 7 es el cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP, PDI = 1.07;  
 La Figura 8 es el espectro <sup>1</sup>H-NMR de mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP;  
 La Figura 9 es una figura que muestra la distribución de tamaño en la micela mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP/paclitaxel;  
 La Figura 10 es una figura que muestra la distribución de tamaño en la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel;  
 La Figura 11 es una figura que muestra la distribución de tamaño en la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/cabazitaxel;  
 La Figura 12 muestra los resultados del ensayo de estabilidad de la solución micelar mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel;  
 La Figura 13 muestra los resultados del ensayo de estabilidad de la solución micelar mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/cabazitaxel;  
 La Figura 14 muestra la inhibición de la inyección de docetaxel e inyección micelar de docetaxel contra el tumor H460;  
 La Figura 15 muestra la inhibición de la inyección de docetaxel e inyección micelar de docetaxel contra el tumor H460;  
 La Figura 16 muestra la inhibición de la inyección de docetaxel e inyección micelar de docetaxel contra el tumor MDA-MB-231;  
 La Figura 17 muestra la inhibición de la inyección de docetaxel e inyección micelar de docetaxel contra el tumor MDA-MB-231;  
 La Figura 18 muestra la curva de concentración de fármaco-tiempo de docetaxel en el plasma de ratas a las que se administró por vía iv micelas de docetaxel (5 mg/kg);  
 La Figura 19 muestra la curva de concentración de fármaco-tiempo de cabazitaxel en el plasma de ratas a las que se administró por vía iv micelas de cabazitaxel (5 mg/kg);  
 La Figura 20 muestra las curvas de concentración-tiempo de la cantidad total de fármaco y el fármaco encapsulado de docetaxel en el plasma de ratas a las que se administró por vía iv micelas de docetaxel (5 mg/kg);  
 La Figura 21 muestra las curvas de concentración-tiempo de la cantidad total de fármaco y el fármaco encapsulado de docetaxel en el plasma de ratas a las que se administró por vía iv micelas de cabazitaxel (5 mg/kg);  
 La Figura 22 muestra las curvas de concentración-tiempo de docetaxel (10 mg/kg iv) en los tejidos tumorales de ratones desnudos que albergaban un tumor (MX-1);  
 La Figura 23 muestra las curvas de concentración de fármaco-tiempo de paclitaxel en el plasma de ratas a las que se administró por vía iv micelas mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/paclitaxel y micelas protegidas con benzoilo mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>/paclitaxel.

### Realizaciones

Para entender mejor la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos para interpretar adicionalmente la presente invención. Sin embargo, los ejemplos no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1. Preparación de los bloques copoliméricos anfifílicos

(1) Síntesis de bloque copolimérico de metoxi poli (etilenglicol)-poli (ácido láctico-co-glicólico) protegido terminalmente con t-butilacilo (mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB)

Se añadieron 18,2 g de mPEG (valor medio de peso molecular de 2.000) a un matraz para la polimerización, se calentó a 100 °C y se deshidrató al vacío durante 3 h. Luego se añadieron 26 mg de octoato de estaño, 11,6 g de glicólido (GA) y 14,4 g de D, L-láctido (D, L-LA). El matraz se selló al vacío y se llevó a cabo la polimerización a 130 °C durante 15 h. Los reactivos se disolvieron en diclorometano, y se añadió una gran cantidad de dietil éter para precipitar completamente el polímero. Tras la filtración y secado al vacío, se obtuvo el bloque copolimérico mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>.

Se disolvieron 4 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub> en 20 ml de diclorometano, y se añadieron 0,5 g de carbonato potásico, y 0,25 g de cloruro de pivaloilo con agitado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 h. La sustancia insoluble se retiró por filtración. Se añadió una gran cantidad de dietil éter para precipitar completamente el polímero. Tras filtrarlo y secarlo al vacío se obtuvo mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB.

5 Nótese que TB es la abreviatura de t-butilacilo.

El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB se muestra en la Figura 1, en el que el PDI es 1,05;

10 Se utilizó el equipamiento 400MBruker NMR con cloroformo deuterado como disolvente para caracterizar la estructura del polímero, y los datos de <sup>1</sup>H NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB se mostraron de la siguiente manera:

15 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,56 ppm, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C, CHCH<sub>3</sub>O), δ (3,55-3,75 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ (5,15-5,23 ppm, 1H, CHCH<sub>3</sub>O).

(2) Síntesis de bloque copolimérico metoxi poli (etilenglicol)-poliláctido protegido terminalmente con un resto de t-butoxicarbonil fenilalanina (mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP)

20 Se añadieron 20 g de mPEG (valor medio de peso molecular de 2.000) a un matraz para la polimerización, se calentó a 120 °C, y se deshidrató al vacío durante 3 h. Se añadieron 25 mg de octoato de estaño y 25 g de D, L-láctido (D, L-LA). Se selló el matraz de reacción al vacío. Se llevó a cabo la polimerización a 130 °C durante 12 h y los reactivos se disolvieron en etanol. Se añadió una gran cantidad de dietil éter para precipitar completamente el polímero. Tras la filtración y el secado al vacío se obtuvo el bloque copolimérico mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>.

25 Se disolvieron 6,65 g de Boc-L-fenilalanina en 50 ml de acetato de etilo anhidro y se añadieron 4,2 ml de trietilamina. La solución anterior se enfrió a -10 °C y se añadieron 3,66 ml de cloruro de pivaloilo. Se llevó a cabo la reacción con agitado a 0 °C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante otra 1 h. La sustancia insoluble se retiró por filtración y el disolvente se retiró al vacío, obteniendo de esta manera un líquido viscoso.

30 Se añadieron 25 ml de diclorometano para la disolución. La solución obtenida se añadió a 75 ml de una solución de diclorometano que contenía 15 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>. Tras el mezclado completo, se añadieron 14 ml de piridina y 160 mg de tetrametil aminopiridina. La mezcla se dejó reaccionar a 0 °C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante otras 24 h. Tras la filtración y retirada del disolvente, el polímero obtenido se re-disolvió en 100 ml de etanol y se enfrió a -20 °C durante 1 h. Tras la filtración y secado al vacío se obtuvo el mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP.

35 Nótese que BP es la abreviatura del resto t-butoxicarbonil fenilalanina-

40 El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP se muestra en la Figura 2, en la que el PDI es 1,05;

Se utilizó el equipamiento 400MBruker NMR con cloroformo deuterado para la caracterización de la estructura del polímero. El espectro <sup>1</sup>H NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP se muestra en la Figura 3, y los datos de <sup>1</sup>H NMR eran los siguientes:

45 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,38-1,41 ppm, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), δ (1,51-1,60 ppm, 3H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (3,38 ppm, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), δ (3,63-3,70 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) δ (4,60-4,66 ppm, 1H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), δ (5,15-5,17 ppm, 1H, CHCH<sub>3</sub>O).

50 (3) Síntesis del bloque copolimérico metoxi poli (etilenglicol)-poliláctido protegido terminalmente con un resto de ácido β-bencil aspártico (mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-Asp)

La síntesis de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> era la misma que en el Ejemplo 1 (2).

55 Se añadieron 100 ml de agua desionizada y 100 ml de dioxano (como disolvente de la mezcla) a 22,3 g de bencil L-aspartato y se agitó, luego se añadieron 30 ml de NaOH 4 N y se agitó hasta que se disolvía el bencil éster. El matraz de reacción se enfrió en un baño de hielo y se controló la temperatura por debajo de 4 °C. Por separado, se disolvieron 8,7 ml de bromuro de bromoacetilo en 35 ml de dioxano refinado y aproximadamente 25 ml de NaOH 4 N. Se juntaron gota a gota las dos soluciones con agitado vigoroso simultáneo a través de dos túneles de goteo. El valor del pH se controló entre 8 y 9 (la adición duraba aproximadamente 30 min). Tras completarse la adición, se continuó la reacción durante 5 minutos y se ajustó el pH a 2 utilizando ácido clorhídrico concentrado. Se utilizaron 200 ml de dietil éter para la extracción. La mezcla estaba contenida en la capa orgánica. La capa orgánica se lavó con una solución de NaCl saturada 5 veces. Finalmente se añadió sulfato magnésico anhidro al vacío, y se colocó en una placa de Petri para obtener 25 g de bromoacetil bencil L-aspartato cristalizado.

65 Se disolvieron 10 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> en 50 ml de diclorometano, y 5 ml de trietilamina y se añadieron 2,5 g de bromoacetil bencil L-aspartato. Los reactivos se agitaron a temperatura ambiente durante 24 h, se precipitaron con

dietil éter y se secaron al vacío para obtener mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-Asp.

Nótese que Asp es la abreviatura del resto de ácido bencil aspártico.

- 5 El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-Asp se muestra en la Figura 4, en el que el PDI es de 1,05.

Se utilizó el 400MBruker NMR con cloroformo deuterado como disolvente para caracterizar la estructura de polímero. Los datos de <sup>1</sup>H NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-Asp se mostraron de la siguiente manera:

10 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,51-1,60 ppm, 3H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (2,90-3,15 ppm, 2H, OCOCH<sub>2</sub>), δ (3,63-3,70 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ (5,13-5,15 ppm, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), δ (5,15-5,17 ppm, 1H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (7,34 ppm, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

- 15 (4) Síntesis del bloque copolimérico metoxi poli (etilenglicol)-poli (ácido láctico-co-glicólico) protegido terminalmente con un resto de tirosina (mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS)

La síntesis del mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub> era la misma que en el Ejemplo 1 (1).

20 Se disolvieron 10 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub> en 200 ml de agua destilada doblemente, luego se añadieron 1,91 g de clorhidrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y 1,8 g de tirosina. Tras la reacción que se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 48 h, se extrajo el producto tres veces con 200 ml de diclorometano. Se lavó la capa orgánica combinada con salmuera cinco veces, se secó en sulfato magnésico anhidro y se precipitó con dietil éter. Tras el secado al vacío se obtuvo mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS.

25 Nótese que TS es una abreviatura del resto de tirosina.

El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS se muestra en la Figura 5, en el que el PDI es de 1,05.

- 30 Se utilizó el equipamiento 400MBruker NMR para caracterizar la estructura de polímero. Los datos de <sup>1</sup>H NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS se muestran de la siguiente manera:

35 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,51-1,60 ppm, 3H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (2,94-3,00 ppm, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), δ (3,63-3,70 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ (5,15-5,17 ppm, 1H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (6,74-6,93 ppm, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

(5) Síntesis del bloque copolimérico poli (etilenglicol)-poli (ácido láctico-co-glicólico) protegido terminalmente con un resto de tirosina

El método sintético de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub> era el que se describe en el Ejemplo 1 (1).

40 Se disolvieron 10 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub> en 200 ml de agua destilada doblemente, luego se añadieron 1,91 g de hidrocloreuro de 1-etil-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida y un 1,8 g de tirosina. Tras llevarse a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 48 h, se extrajo el producto tres veces con 200 ml de diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada durante cinco veces, se secó con sulfato magnésico anhidro y se precipitó con dietil éter. Tras el secado al vacío, se obtuvo el mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS.

Nótese que TS es la abreviatura del resto de tirosina.

50 El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS se muestra en la Figura 6, en la que el PDI es del 1,05.

Se utilizó el 400MBruker NMR con cloroformo deuterado como disolvente para caracterizar la estructura del polímero. Los datos de <sup>1</sup>H NMR de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TS se muestran de la siguiente manera:

55 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,51-1,60 ppm, 3H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (2,94-3,00 ppm, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), δ (3,63-3,70 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ (5,15-5,17 ppm, 1H, CHCH<sub>3</sub>O), δ (6,74-6,93 ppm, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

(6) Síntesis del bloque copolimérico metoxil poli (etilenglicol)-policaprolactona protegido terminalmente con un resto de t-butoxicarbonil fenilalanina (mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP)

60 Se añadieron 20 g de mPEG (valor medio de peso molecular de 5.000) a un matraz para la polimerización, se calentó a 130 °C y se deshidrató al vacío durante 4 h. Se añadieron 20 mg de octoato de estaño y 20 g de caprolactona (CL). Tras sellar el matraz de reacción al vacío, los reactivos anteriores se dejaron reaccionar a 130 °C durante 24 h, se disolvió en diclorometano y se precipitó completamente por adición de una gran cantidad de dietil éter. Tras la filtración y secado al vacío, se obtuvo el polímero mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>.

Se disolvieron 6,65 g de Boc-L-fenilalanina en 50 ml de acetato de etilo anhidro, y 4,2 ml de trietilamina. La solución anterior se enfrió a -10 °C y se añadieron 3,66 ml de cloruro de pivaloilo. Se llevó a cabo la reacción con agitado a 0 °C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante otra 1 h. La sustancia insoluble se retiró por filtración y el disolvente se restiró al vacío para obtener un líquido viscoso.

5 Se añadieron para la disolución 25 ml de diclorometano. La solución obtenida se añadió a 150 ml de una solución de diclorometano que contenía 30 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> y se mezcló completamente. Se añadieron 14 ml de piridina y 160 mg de tetrametil aminopiridina. La mezcla se dejó reaccionar a 0 °C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante otras 24 h. Tras la filtración, la solución de polímero se precipitó en dietil éter a -20 °C y se secó al vacío para dar mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP.

Nótese que BP es la abreviatura del resto de t-butoxicarbonil fenilalanina.

15 El cromatograma de penetración en gel de mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP se muestra en la Figura 7, en la que el PDI es de 1,08;

Se utilizó el 400MBruker NMR con cloroformo deuterado para caracterizar la estructura del polímero. El espectro <sup>1</sup>H NMR del mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP se muestra en la Figura 8, y los datos de <sup>1</sup>H NMR se muestran de la siguiente manera:

20 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (1,38-1,43 ppm, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), δ (1,53-1,64 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ (2,34 ppm, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), δ (3,63-3,70 ppm, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ (4,06-4,15 ppm, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

### 25 **Ejemplo 2. Preparación de una formulación liofilizada de micelas poliméricas cargadas con fármacos antitumorales**

En las preparaciones micelares de acuerdo con la invención, la protección terminal es por medio de t-butoxicarbonil fenilalanina (abreviado como BP).

30 (1) Preparación de una micela mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP/paclitaxel y la formulación liofilizada de la misma

Se disolvieron 150 mg de mPEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>4000</sub>-BP como se prepara en el Ejemplo 1 y 30 mg de paclitaxel en 2 ml de tetrahydrofurano. Se añadieron gota a gota 5 ml de agua ultrapura con agitado. Tras la adición, se agitó la solución a temperatura ambiente durante una noche, y luego se retiró el disolvente orgánico para obtener una solución transparente de micelas de paclitaxel con una opalescencia azul evidente. Se añadieron 120 mg de manitol, y la solución obtenida se esterilizó a través de un filtro con una membrana de 0,22 μm y se liofilizó para obtener el polvo liofilizado de micelas de paclitaxel. Por análisis con LC-MS-MS, la eficacia de encapsulación del fármaco de la micela de paclitaxel era del 98,6 %, y la eficacia de carga de fármaco era mayor del 11,2 %. Los resultados de la medición del diámetro de las partículas se muestran en la Figura 9. El diámetro de partículas medio de la micela era de 33,8 nm, y el índice de polidispersión (PDI) era del 0,1.

El polvo liofilizado se reconstituyó en solución salina para obtener una solución de 5 mg/ml. La solución se mantuvo estable a temperatura ambiente durante más de 7 días, que es significativamente más tiempo que la de la micela de polímero protegido terminalmente con acetoxilo o benzoilo.

45 (2) Preparación de micelas mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel y la formulación liofilizada de la misma

Se disolvieron 100 mg de docetaxel y 1,9 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP como se preparó en el Ejemplo 1 en 25 ml de etanol anhidro. El disolvente se retiró a 45 °C por evaporación rotatoria y se añadieron 25 ml de solución salina para disolver la película fina que contenía el fármaco. Se añadieron 400 mg de lactosa y luego se esterilizó la solución a través de un filtro con una membrana de 0,22 μm y se liofilizó para obtener el polvo liofilizado de micelas de docetaxel. Se demostró por el análisis LC-MS/MS que la eficacia de encapsulación de la micela era del 95,8 %, la eficacia de encapsulación de fármaco era del 4,76 %. Los resultados de la medición del diámetro de particular se muestran en la Figura 10. El diámetro de partículas medio era de 23,3 nm, y el índice de polidispersión (PDI) era del 0,02.

El polvo liofilizado se reconstituyó en solución salina para obtener una solución de 5 mg/ml, se almacenó a temperatura ambiente durante 90 días, y el contenido de docetaxel disuelto en la solución era mayor del 90 %.

60 (3) Preparación de micelas mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/cabazitaxel y la formulación liofilizada de las mismas

Se calentaron 1,9 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB como se preparó en el Ejemplo 1, a 50 °C hasta que se fundía. Se añadieron 100 mg de cabazitaxel y se disolvió en el polímero fundido con agitado para dar una mezcla clara y transparente, luego se añadieron 25 ml de solución salina a 50 °C para disolver la mezcla de polímero/fármaco para obtener la solución micelar. Se añadieron 400 mg de sacarosa y se esterilizó la solución por filtración a través de un filtro con una membrana de 0,22 μm y se liofilizó para obtener el polvo liofilizado de la micela de cabazitaxel. Se

demonstró por análisis LC-MS/MS que la eficacia de encapsulación era del 96,2 % y la eficacia de carga del fármaco era mayor del 4,82 %. Los resultados de la medición del diámetro de las partículas se muestran en la Figura 11. El diámetro de partículas medio era de 24,2 nm, y el índice de polidispersión (PDI) era de 0,02.

- 5 Dicho polvo liofilizado se reconstituyó con solución salina para obtener una solución de 5 mg/ml y se almacenó a temperatura ambiente durante 90 días. El contenido de cabazitaxel disuelto en la solución era mayor del 90 %.

(4) Preparación de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>1800</sub>-TB/curcumina y la formulación liofilizada de la misma

- 10 Se disolvieron 100 mg de curcumina y 1,9 g de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>1800</sub>-TB como se preparó en el Ejemplo 1 en 25 ml de etanol anhidro. El disolvente orgánico se retiró a 50 °C por evaporación rotacional. Se añadieron 25 ml de solución salina para disolver la fina película que contenía el fármaco. Se añadieron 400 mg de alginato sódico y la solución se esterilizó a través de un filtro con una membrana de 0,22 µm y se liofilizó para obtener el polvo liofilizado de micela de curcumina. Se demostró por LC-MS/MS que la eficacia de encapsulación del fármaco era del 98,9 % y la eficacia de carga del fármaco era del 4,88 %. El diámetro de partícula medio era de 15,3 nm, y el índice de polidispersión (PDI) era de 0,02.

Dicho polvo liofilizado se reconstituyó en solución salina para obtener una solución de 5 mg/ml y se almacenó a temperatura ambiente durante 7 días. El contenido de curcumina disuelta en la solución era mayor del 90 %.

- 20 (5) Preparación de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/doxorubicina y la formulación liofilizada de la misma

- 25 Se disolvieron 3300 mg de mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB como se preparó en el Ejemplo 1 y 40 mg de hidrocloreto de doxorubicina en cloroformo a 40 °C. Se añadieron 0,1 ml de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente orgánico se retiró por evaporación rotacional y 50 ml de tampón HBS 10 mM se añadió para disolver la fina película que contenía el fármaco. El hidrocloreto de trietilamina se retiró por diálisis o ultrafiltración, luego se añadieron 250 mg de gelatina. La solución se esterilizó a través de un filtro con una membrana de 0,22 µm y se liofilizó para obtener el polvo liofilizado de micela de doxorubicina. Se demostró por análisis LC-MS/MS que la eficacia de encapsulación del fármaco era del 94,7 % y la eficacia de carga de fármaco era mayor del 22,47 %. El diámetro de partícula medio era de 19,4 nm, y el índice de polidispersión (PDI) era del 0,04.

Dicho polvo liofilizado se reconstituyó en solución salina para obtener una solución de 2 mg/ml y se almacenó a temperatura ambiente durante 24 h. El contenido de doxorubicina disuelta en la solución era mayor del 90 %.

### 35 **Ejemplo 3. Ensayo de estabilidad**

(1) Ensayo de estabilidad de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel

- 40 El polvo liofilizado de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel se reconstituyó (concentración de docetaxel: 6 mg/ml) y se almacenó en una incubadora a 25 °C durante un cierto periodo. Tras la centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min, se midió el sobrenadante por HPLC.

- 45 La variación de contenido del fármaco en estado disuelto se muestra en la Figura 12. El contenido de fármaco en la solución de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/docetaxel disminuía hasta cierto punto en los primeros 15 días. Después, la liberación del fármaco era mucho más lenta. El contenido del fármaco en estado disuelto se mantenía por encima del 90 % incluso después de 90 días.

(2) Ensayo de estabilidad de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/cabazitaxel

- 50 El polvo liofilizado de micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/cabazitaxel se reconstituyó (concentración de cabazitaxel: 6 mg/ml) y se almacenó en una incubadora a 25 °C durante un cierto periodo. Tras la centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min, se midió el contenido de fármaco en el sobrenadante por HPLC.

- 55 La variación de contenido con el tiempo del fármaco en un estado disuelto se muestra en la Figura 13. El contenido del fármaco disuelto en la solución de micela mPEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>2000</sub>-TB/cabazitaxel disminuía hasta cierto punto en los 3 primeros días. Después, la liberación de fármaco era mucho más lenta. El contenido del fármaco en estado disuelto se mantenía por encima del 90 % incluso más de 90 días.

### 60 **Ejemplo 4. Ensayo farmacodinámico**

(1) Inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de la micela de docetaxel tumor H460 de cáncer de pulmón humano en ratones desnudos

A. Fármacos y reactivos:

65

El polvo liofilizado de la micela de docetaxel como se preparaba en el Ejemplo 2, proporcionado por Shandong Target Drug Research Co., Ltd., disuelto en solución salina al 0,9 %;  
 Inyección de docetaxel, 0,5 ml por tubo: 20 mg producido por Qilu Pharmaceutical Co., Ltd.;  
 Disolvente control (blanco de micela, 10 mg/kg), proporcionado por Shandong Target Drug Research Co., Ltd.,  
 disuelto en solución salina al 0,9 %.

B. Animales de experimentación:

Los ratones BALB/c desnudos, de 4-6 semanas de edad, de ambos sexos (dependiendo de los tumores cada ensayo utilizaba el mismo sexo), se proporcionaron por Beijing HFK Bioscience Co., Ltd., Certificado N°: SCXK (Beijing) 2009-0004.

C. Instalaciones de cría:

Las instalaciones de alojamiento con barreras del Laboratory Animal Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Número de licencia: SYXK (Beijing) 2009-0004; Duración: 25 de Febrero de 2009 – 25 de Febrero de 2014.

D. Cepas celulares tumorales:

Células H460 de cáncer de pulmón humano de la ATCC se cultivaron *in vitro* en el laboratorio de los inventores, se inocularon en ratones desnudos para formar el tumor, y se subcultivaron y conservaron.

E. Métodos de ensayo

Los animales que albergaban tumores en buen estado y con un tumor H460 con buen crecimiento se seleccionaron y se mataron por dislocación cervical. Se retiró el tumor en condiciones de esterilidad, se cortaron con un bisturí en piezas de 2-3 mm de diámetro y se inocularon por vía subcutánea con un trocar en la axila de los ratones desnudos. 7 a 8 días después de la inoculación, el volumen medio del tumor en los ratones que albergaban el tumor era de aproximadamente 110-120 mm<sup>3</sup>. Los animales se agruparon basándose en el tamaño del tumor, con 8 ratones en cada grupo.

Se montaron un grupo de control negativo, un grupo de control con disolvente, un grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg/vez) y un grupo del polvo liofilizado de la micela de docetaxel (10 mg/kg/vez basándose en el docetaxel); en los que el tumor crecía naturalmente en los animales del grupo de control negativo; el disolvente que se utilizaba en el grupo de control con disolvente tenía el mismo volumen que el grupo del polvo liofilizado de la micela de docetaxel; la inyección de docetaxel se diluyó al mismo volumen que el del grupo del polvo liofilizado de la micela de docetaxel; los animales se inyectaron por vía intravenosa simultáneamente.

Comenzando el día del agrupamiento, se administró a los animales de cada grupo por vía intravenosa una vez cada tres días como se programó, con tres dosis en total. La observación terminó cuando el volumen medio del tumor del grupo de control negativo alcanzaba aproximadamente 2.000 mm<sup>3</sup>.

Estadísticas experimentales y métodos de evaluación:

(A) Fórmula para calcular el volumen tumoral:  $V=a3b^2/2$  (donde a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente)

(B) El volumen relativo del tumor (RTV) se calculó por la fórmula  $V_t/V_o$  (donde  $V_o$  es el TV medido el día del agrupamiento;  $V_t$  era el TV medido posteriormente) TV representa el volumen tumoral.

(C) La tasa relativa de proliferación tumoral (T/C (%)) se utilizó como criterio para evaluar la actividad antitumoral, y se calculó por la siguiente fórmula:

$$T/C (\%) = RTV \text{ del grupo de tratamiento (T)}/RTV \text{ del grupo de control negativo (C)} \times 100$$

(D) La tasa de inhibición de los fármacos contra el crecimiento tumoral se calculó por la siguiente fórmula:

$$Tasa \text{ de inhibición tumoral } (\%) = (\text{el peso medio tumoral del grupo de control} - \text{el peso medio tumoral del grupo de tratamiento}) / \text{el peso medio tumoral del grupo de control} \times 100$$

(E) La significación estadística de las diferencias de peso tumoral, volumen tumoral, RTV y otros criterios entre los grupos se calcularon por ensayo-t.

(F) Criterios de evaluación:  $T/C (\%) > 40$  se determinó como ineficaz;  $T/C (\%) \leq 40$  y  $P < 0,05$  se determinó como eficaz.

F. Resultados y conclusiones

5 Tanto el grupo de la inyección de docetaxel (10 mg/kg/vez) y el grupo del polvo liofilizado de la micela de docetaxel (10 mg/kg/vez) mostraba un efecto de inhibición significativo contra el crecimiento del tumor H460 en ratones desnudos, y los volúmenes tumorales disminuyeron significativamente. En el grupo del polvo liofilizado de micelas de docetaxel (10 mg/kg/vez), el volumen tumoral se redujo gradualmente durante el periodo de administración; y el volumen tumoral se mantuvo menor que el volumen medio antes de la administración durante casi 10 días. En comparación con el grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg/vez), el efecto inhibitor del tumor de las micelas de docetaxel inyectadas por vía intravenosa a la misma dosificación mejoraba significativamente, donde la tasa de inhibición del peso tumoral era 68,35 % para el primer grupo, y del 97,5 % para el último grupo, la tasa relativa de proliferación tumoral era del 25,25 % para el primer grupo, y del 3,78 % para el último grupo, sugiriendo que había aumentado la eficacia.

15 Los efectos beneficiosos de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor H460 se muestran en la Figura 14 y Figura 15.

La tasa de inhibición sobre el tumor H460 de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel y la tasa de proliferación relativa se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2.

20 Tabla 1. Efecto de inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor H460

Grupo	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
	Principio	Final	Principio	Final		
Grupo de control negativo	8	8	21,0±1,00	24,0±1,41	1,72±0,517	
Grupo de control con disolvente	8	8	20,9±1,39	24,1±1,76	1,62±0,510	5,81
Grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg)	8	8	21,3±0,97	23,1±2,20	0,545±0,166*	68,35
Grupo de micelas de docetaxel (10 mg/kg)	8	8	21,6±1,11	21,6±2,34	0,04±0,018*	97,5

\*: P < 0.001, en comparación con el control negativo

25 Tabla 2. Efecto de inhibición de la inyección de docetaxel y polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor H460

Grupo	Volumen tumoral (mm <sup>3</sup> )		RTV	T/C (%)
	Principio	Final		
Grupo de control negativo	119±25,5	1947±748,7	16,87±6,684	
Grupo de control con disolvente	109±20,8	1810±481,9	16,63±3,179	94,02
Grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg)	121 ±25,3	509±165,4	3,93±2,838**	25,25
Grupo de micelas de docetaxel (10 mg/kg)	112±29,0	69,3±27,2	0,64±0,243**	3,78

\*: P < 0.01, en comparación con el control negativo; \*\*: P < 0.001, en comparación con el control negativo

(2) Inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel en el tumor MDA-MB-231 de cáncer de mama humano en ratones desnudos

- 30 A. Fármacos y reactivos: los mismos que en el experimento 4 (1).  
 B. Animales experimentales: los mismos que en el experimento 4 (1).  
 C. Instalaciones de cría: las mismas que en el experimento 4 (1).

## D. Cepas celulares tumorales:

Las células MAD-MB-231 de cáncer de mama humano obtenidas de la ATCC se cultivaron *in vitro* en el laboratorio de los inventores, se inocularon en ratones desnudos para formar el tumor, y se subcultivaron y conservaron.

## E. Métodos de ensayo

Los animales que albergaban los tumores en buen estado y con tumor MDA-MB-231 con buen crecimiento se seleccionaron y se mataron por dislocación cervical. Se retiró el tumor en condiciones de esterilidad, se cortó con un bisturí en piezas de 2-3 mm de diámetro, y se inocularon por vía subcutánea con un trocar en la axila de los ratones desnudos. 11 días después de la inoculación, el volumen medio del tumor en los ratones que albergaban el tumor era de aproximadamente 110-120 mm<sup>3</sup>. Los animales se agruparon basándose en el tamaño del tumor, con 8-9 ratones en cada grupo.

Se montaron un grupo de control negativo, un grupo de control con disolvente, un grupo de inyección de docetaxel y un grupo de polvo liofilizado de micelas de docetaxel. (10 mg/kg/vez basándose en el docetaxel); en donde el tumor de los animales del grupo de control negativo crecía naturalmente; el disolvente utilizado en el grupo de control con disolvente tenía el mismo volumen que el grupo de micelas de docetaxel (dosis de 10 mg/kg); la inyección de docetaxel se diluyó en el mismo volumen que el del grupo de polvo liofilizado de micelas de docetaxel; los animales de cada grupo se inyectaron por vía intravenosa simultáneamente.

Comenzando el día del agrupamiento, se administró a los animales de cada grupo por vía intravenosa una vez cada tres días como se había programado, con tres dosis en total. La observación se terminaba cuando el volumen medio del tumor del grupo de control negativo alcanzaba aproximadamente 2.000 mm<sup>3</sup>.

## Estadísticas experimentales y métodos de evaluación:

(A) Fórmula para calcular el volumen tumoral:  $V=a3b^2/2$  (donde a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente)

(B) El volumen de tumor relativo (RTV) se calculó por la fórmula:  $Vt/Vo$  (donde Vo era el TV medido el día del agrupamiento; Vt era el TV medido posteriormente)

(C) La tasa relativa de proliferación tumoral (T/C (%)) se utilizó como criterio para evaluar la actividad anti-tumoral, y se calculó por la siguiente fórmula:

$$T/C (\%) = RTV \text{ del grupo de tratamiento (T)}/RTV \text{ del grupo de control negativo (C)} \times 100$$

(D) La tasa de inhibición de los fármacos contra el crecimiento tumoral se calculó por la siguiente fórmula:

$$Tasa \text{ de inhibición tumoral } (\%) = (\text{el peso medio tumoral del grupo de control} - \text{el peso medio tumoral del grupo de tratamiento}) / \text{el peso medio tumoral del grupo de control} \times 100$$

(E) La significación estadística de las diferencias de peso tumoral, volumen tumoral, RTV y otros criterios entre los grupos se calculó por ensayo-t.

(F) Criterios de evaluación:  $T/C (\%) > 40$  se determinó ineficaz;  $T/C (\%) \leq 40$  y  $P < 0,05$  se determinó eficaz.

## F. Resultados y conclusiones:

Los ratones que albergaban el tumor MDA-MB-231 del grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg/vez) y el grupo de polvo liofilizado de micelas de docetaxel (10 mg/kg/vez) se inyectaron por vía intravenosa intermitentemente tres veces. El crecimiento del tumor en los ratones desnudos se inhibía significativamente por los fármacos. Tras la administración tres veces, el volumen tumoral disminuyó progresivamente en comparación con el volumen antes de la administración. El crecimiento del tumor casi se paraba en el grupo del polvo liofilizado de micelas de docetaxel (10 mg/kg/vez). El efecto de inhibición sobre el tumor MDA-MB-231 del grupo de polvo liofilizado de micelas de docetaxel era mejor en comparación con el grupo de inyección de docetaxel a la misma dosis.

Los efectos de inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor MDA-MB-231 se muestran en la Figura 16 y Figura 17;

La tasa de inhibición sobre el tumor MDA-MB-231 de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel y la tasa relativa de proliferación tumoral se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 3. Efecto de inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor MDA-MB-231

Grupo	Número de animales		Peso corporal (g)		Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
	Principio	Final	Principio	Final		
Grupo de control negativo	8	8	17,1±1,12	21,3±0,51	2,83±0,735	
Grupo de control con disolvente	8	8	17,3±0,99	20,8±1,92	2,48±0,886	12,3
Grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg)	8	8	15,8±1,16	21,0±1,63	1,08±0,646*	61,8
Grupo de micelas de docetaxel (10 mg/kg)	9	9	17,0±0,71	20,1±1,05	0,26±0,191*	90,8

\*: P < 0.01, en comparación con el control negativo

5

Tabla 4. Efecto de inhibición de la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel sobre el tumor MDA-MB-231

Grupo	Volumen tumoral (mm <sup>3</sup> )		RTV	T/C (%)
	Principio	Final		
Grupo de control negativo	107±22,0	2833±782,3	28,89±11,371	
Grupo de control con disolvente	107±27,9	1472±904,9	27,26±11,779	94,41
Grupo de inyección de docetaxel (10 mg/kg)	107±30,7	1054±620,5	10,62±5,295*	36,78
Grupo de micelas de docetaxel (10 mg/kg)	101 ±42,4	0	1,96±1,44,8**	6,79

\*: P < 0,01, en comparación con el control negativo; \*\*: P < 0,001, en comparación con el control negativo

### Ejemplo 5. Estudio de farmacocinética

(1) Estudio comparativo de farmacocinética en plasma de ratas

10

A. Animales de experimentación:

Se dividieron aleatoriamente ratas SD machos, con un peso de 240 ± 20 g en cuatro grupos (I, II, III, y IV), con 6 ratas en cada grupo.

15

B. Preparaciones experimentales:

Se preparó el polvo liofilizado de micelas de docetaxel (a) por el procedimiento del Ejemplo 2 (2); número de lote 20120907; especificación: 20 mg de docetaxel/botella;

20

Se preparó el polvo liofilizado de micelas de cabazitaxel (b) por el procedimiento del Ejemplo 2 (3); número de lote 20120830; especificación: 20 mg de cabazitaxel/botella;

25

Dopafei (inyección de docetaxel, c) era un producto de Qilu Pharmaceutical Co., Ltd.; número de lote: 1120312TA; especificación: 0.5 ml, 20 mg;

Polvo liofilizado de cabazitaxel (d), preparado con Tween-80 como solubilizante.

30

C. Administración y recolección de muestras:

Las preparaciones experimentales se disolvieron o diluyeron en una concentración adecuada inmediatamente antes de su uso. Se inyectaron 5 mg/kg de micelas de docetaxel (a) y micelas de cabazitaxel (b) (basándose en el contenido de docetaxel y cabazitaxel, respectivamente) en las venas caudales de las ratas de los grupos III y IV, respectivamente. Se tomaron muestras de sangre del plexo venoso periorbital de las ratas en diferentes puntos de

tiempo tras la administración, y se recolectaron en tubos de centrifuga con anticoagulante que contenían heparina, y se centrifugaron para obtener el plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C en un congelador de temperatura ultra-baja para su uso posterior.

5 D. Curvas de concentración en plasma-tiempo y parámetros farmacocinéticos:

Tras precipitar con metanol para retirar las proteínas, las muestras de plasma se analizaron por LC-MS/MS para determinar la concentración total de fármaco de docetaxel o cabazitaxel. Las curvas de concentración de fármacos en el plasma frente al tiempo de cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 18 (las curvas de concentración plasmática frente al tiempo del polvo liofilizado de micelas de docetaxel (a) y la inyección de docetaxel (c) administrados por vía intravenosa a las ratas) y la Figura 19 (las curvas de concentración plasmática-tiempo del polvo liofilizado de micelas de cabazitaxel (b) y el polvo liofilizado de cabazitaxel (d) administrados por vía intravenosa a las ratas).

15 Mientras tanto, después de que los fármacos libres se retiraron por ultra-filtración, las muestras de plasma se analizaron por LC-MS/MS para determinar la concentración de docetaxel o cabazitaxel encapsulados. Las curvas de concentración –tiempo del total de fármacos y fármacos encapsulados en el plasma de las ratas a las que se administraron micelas de docetaxel y micelas de cabazitaxel se dibujaron y se muestran en la Figura 20 (micela de docetaxel, 5 mg/kg iv) y Figura 21 (micela de cabazitaxel, 5 mg/kg iv).

20 E. Resultados:

Los resultados indicaban que tanto el grupo de micelas de docetaxel como el grupo de micelas de cabazitaxel tenían una concentración en el plasma significativamente más alta de fármaco y una semivida más larga por eliminación, en comparación con el grupo de inyección correspondiente. Particularmente, el AUC del plasma de micelas de docetaxel y de la inyección de docetaxel (5 mg/kg iv, basándose en el docetaxel) eran de 3.732 ng/ml h y 436 ng/ml h, respectivamente, y el  $t_{1/2}$  era de 1,9 h y 0,1 h, respectivamente. El AUC del grupo de micelas de cabazitaxel y el grupo de la inyección de cabazitaxel (5 mg/kg iv, basándose en cabazitaxel) era de 4.295 ng/ml h y 482 ng/ml h, respectivamente y el  $t_{1/2}$  era de 2,7 h y 0,3 h, respectivamente. El AUC del plasma del grupo de micelas de docetaxel y el grupo de micelas de cabazitaxel era de 8,56 veces y 8,91 veces la de sus grupos de inyección correspondientes, respectivamente. Además, como se muestra en la Figura 20 y la Figura 21, tanto la micela de docetaxel como la micela de cabazitaxel en el plasma estaban principalmente en forma de micela encapsulada 24 horas tras la administración intravenosa. Las características farmacocinéticas del plasma de la administración de micelas indican la excelente estabilidad y propiedades de liberación únicas *in vivo* de las micelas que se preparan en la presente invención.

(2) Estudio comparativo de la distribución farmacológica en los tejidos tumorales de ratones que albergan un tumor

40 A. Animales de experimentación:

Se dividieron aleatoriamente ratones desnudos hembras, a los que se había inoculado células cancerosas MX-1 de tumor de mama humano en la axila con una densidad de  $5 \times 10^6$ , en dos grupos después de que los tumores crecieran hasta un volumen de aproximadamente  $500 \text{ mm}^3$  (Grupo I: grupo para el polvo liofilizado de micelas de docetaxel, Grupo II: grupo de inyección de docetaxel). Los pesos corporales de los ratones en los dos grupos eran de  $24,9 \pm 1,2 \text{ g}$  y  $25,0 \pm 1,3 \text{ g}$ , respectivamente, sin diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Cada grupo se dividió entonces equitativamente en siete sub-grupos, y cada sub-grupo tenía 10 ratones que albergaban tumores.

B. Preparaciones experimentales

50 El polvo liofilizado de micelas de docetaxel se preparó por el procedimiento del Ejemplo 2 (2); número de lote: 20120907; especificación: 20 mg/botella;

Dopafei (inyección de docetaxel) era un producto de Qilu Pharmaceutical Co., Ltd.; número de lote: 1120312TA; especificación: 0,5 ml, 20 mg.

55 C. Administración y recolección de muestras:

Se disolvieron o diluyeron la inyección de docetaxel y el polvo liofilizado de micelas de docetaxel a una concentración adecuada inmediatamente antes de su uso, y se inyectaron por medio de las venas caudales de los animales de los grupos I y II a una dosificación de 10 mg/kg (basándose en docetaxel), respectivamente. Los ratones de cada grupo se sacrificaron 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 8 h y 24 h tras la administración y los tejidos tumorales se rasparon, se pesaron y se almacenaron a -80 °C en un congelador de temperatura ultra-baja para su uso posterior.

65

## D. Distribución de fármacos en tejidos tumorales:

Tras la homogeneización, los tejidos tumorales se analizaron por LC-MS/MS para determinar la concentración de docetaxel. Las curvas de concentración-tiempo de fármacos en los tejidos tumorales de cada grupo de tratamiento se muestran en la Figura 22. Con la misma dosis (10 mg/kg), la AUC de docetaxel en los tejidos tumorales de ratones desnudos a las 24 h tras la administración era 45,528 mg/l h para el grupo de la inyección (Grupo I) y de 57,089 mg/l h para el grupo de las micelas (Grupo II). Estos resultados mostraban que la distribución de fármaco en el tejido tumoral para el grupo de micelas de docetaxel era significativamente más alta que la del grupo de inyección de docetaxel ( $P < 0,01$ ), y la diferencia era del 25,4 %.

Los ejemplos descritos anteriormente son realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, las realizaciones de la presente invención no se limitan a los ejemplos anteriores. Cualquiera de las variaciones, modificaciones, sustituciones, combinaciones y simplificaciones de la invención sin alejarse del espíritu o principio de la presente invención son equivalentes de la presente invención, y se incluyen en el alcance de la presente invención.

**Ejemplo 6. Estudio comparativo sobre la estabilidad *in vivo* e *in vitro* de micelas de copolímero mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> protegido terminalmente con Boc-fenilalanina/paclitaxel y micelas de copolímero mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> protegido terminalmente con benzoilo/paclitaxel**

(1) Preparación de copolímeros: el copolímero mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> se sintetizó por el método que se describe en el documento CN01809632.8. Se sintetizó el mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP por el método que se describe en el Ejemplo 1 (2) de la presente solicitud. Las micelas de paclitaxel se prepararon con cualquiera de los dos copolímeros como excipiente y con el paclitaxel como fármaco.

(2) Preparación de micelas: se disolvieron 150 mg de copolímero y 30 mg de paclitaxel en 5 ml de etanol. El disolvente se retiró por evaporación rotacional a 45 °C. Luego, se añadieron 5 ml de solución salina para disolver el fármaco. La solución obtenida se filtró a través de una membrana de 0,22 µm y se almacenó a 37 °C, y se observó la estabilidad.

(3) Método para ensayar la estabilidad: La solución micelar se inyectó en la sangre de las ratas por la vena caudal; se tomaron muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo, y se sometieron a cromatografía líquida de altas prestaciones para determinar el contenido de paclitaxel en la sangre.

(4) Resultados y conclusiones: Las curvas de concentración plasmática-tiempo de las dos micelas se muestran en la Figura 23, donde la concentración plasmática del grupo con la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/paclitaxel era significativamente más alta que la del grupo con la micela copolímero mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> protegido con benzoilo/paclitaxel, y más del 80 % de la droga estaba encapsulada en las micelas, indicando la excelente estabilidad *in vivo*. No se observó precipitación de fármaco para la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/paclitaxel durante un periodo de al menos 48 h, mientras que con la micela copolímero mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> protegida con benzoilo/paclitaxel, se producía una precipitación significativa tras 17 h, indicando que la estabilidad de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub>-BP/paclitaxel era significativamente más alta que la de la micela mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1800</sub> protegida con benzoilo/paclitaxel.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema micelar de carga de fármacos, **caracterizado porque** comprende al menos un bloque copolimérico anfifílico, al menos un fármaco anti-tumoral en una cantidad terapéuticamente eficaz, y un agente farmacéutico auxiliar farmacéuticamente aceptable; donde dicho bloque copolimérico anfifílico comprende un segmento hidrófilo y un segmento hidrófobo; donde dicho segmento hidrófilo es polietilenglicol o metoxipolietilenglicol con un valor medio de peso molecular en el intervalo de 750 a 5000; y dicho segmento hidrófobo se selecciona de entre el grupo que consiste en poliláctido, poliglicólido, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, policarbonato y polidioxanona, cada uno tiene un valor medio de peso molecular en el intervalo de 1000 a 50000 y está protegido terminalmente con un grupo hidrófobo; dicho grupo hidrófobo es t-butoxicarbonil fenilalanina.
2. El sistema micelar de carga de fármacos de la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho agente farmacéutico auxiliar es un excipiente para la liofilización.
3. El sistema micelar de carga de fármacos de la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho excipiente para la liofilización es al menos uno de entre lactosa, manitol, sacarosa, fructosa, glucosa, alginato sódico y gelatina.
4. El sistema micelar de carga de fármacos de la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho fármaco antitumoral es al menos uno de entre paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel, larotaxel, curcumina, doxorubicina y epirubicina.

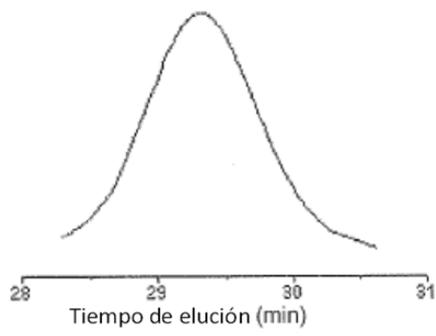


Figura 1



Figura 2

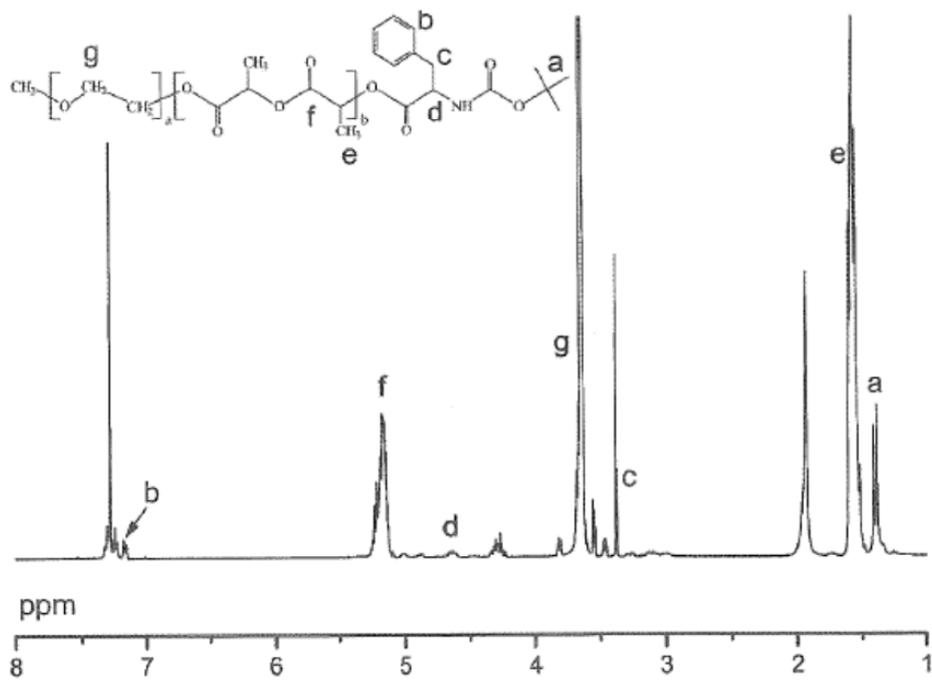


Figura 3

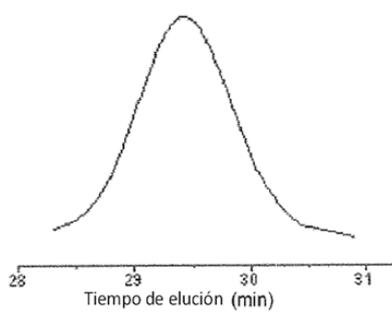


Figura 4

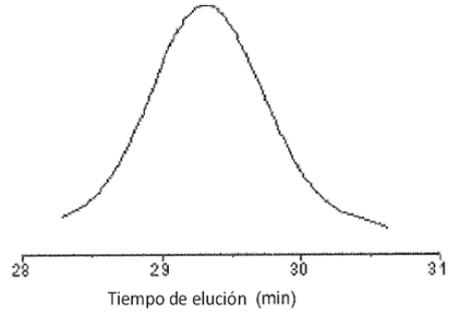


Figura 5

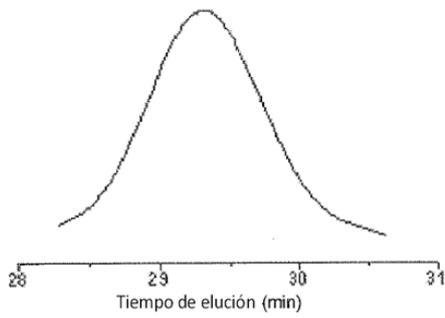


Figura 6

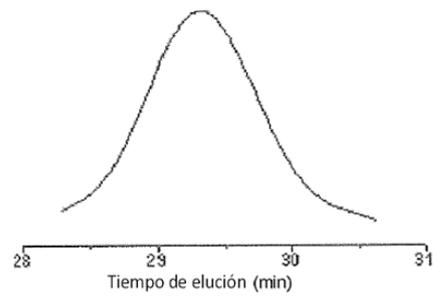


Figura 7

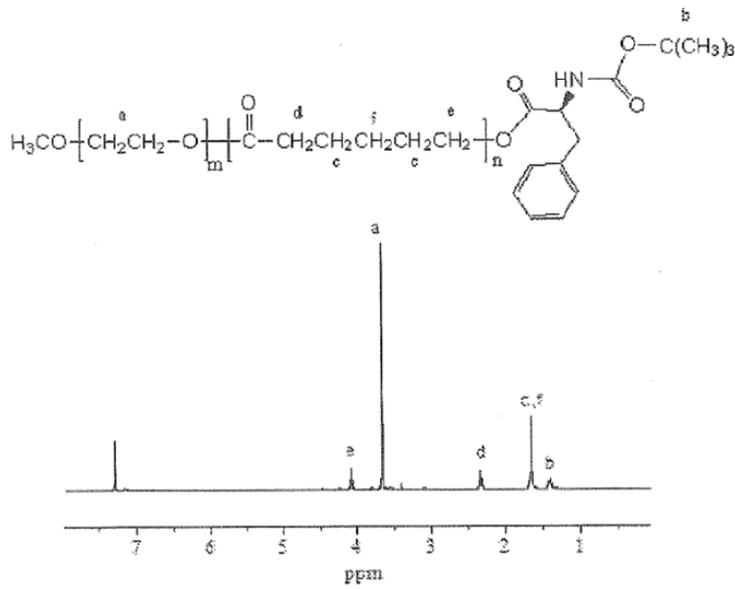
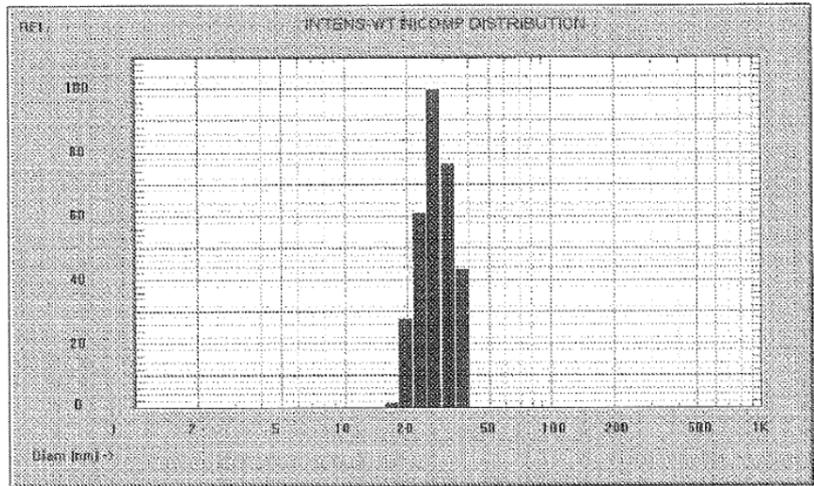


Figura 8



Partícula Sólida  
 Tiempo de ejecución  
 hr:min:seg  
 0:10:6  
 Ajuste de Error  
 27.22  
 Residual  
 15.24  
 Gaussiano  
 Chi cuadrado  
 10.99  
 Ch.1 Datos  
 X1000  
 9

20100301-0114-A  
 Diámetro (nm) : 21--20.1 nm  
 Desv. est. (nm%) : 5.2 nm (18.4%)  
 Porcentaje : 100.0 %  
 Printout ID: 2010011425C-1M

Figura 9

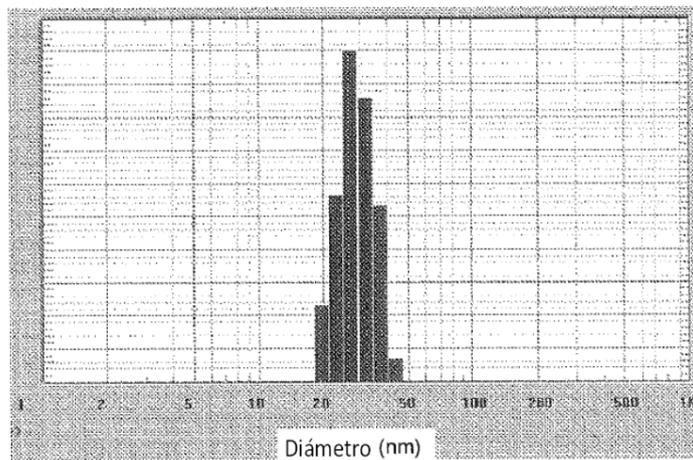


Figura 10

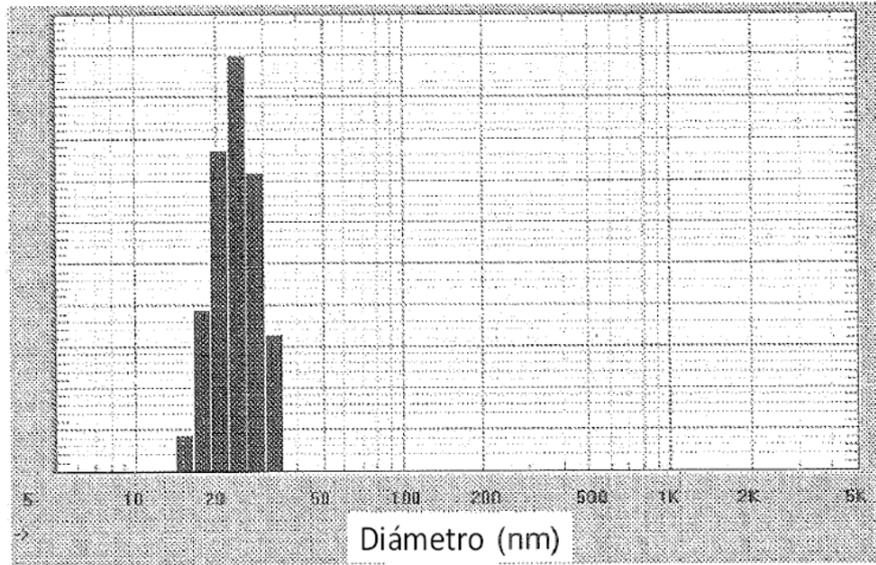


Figura 11

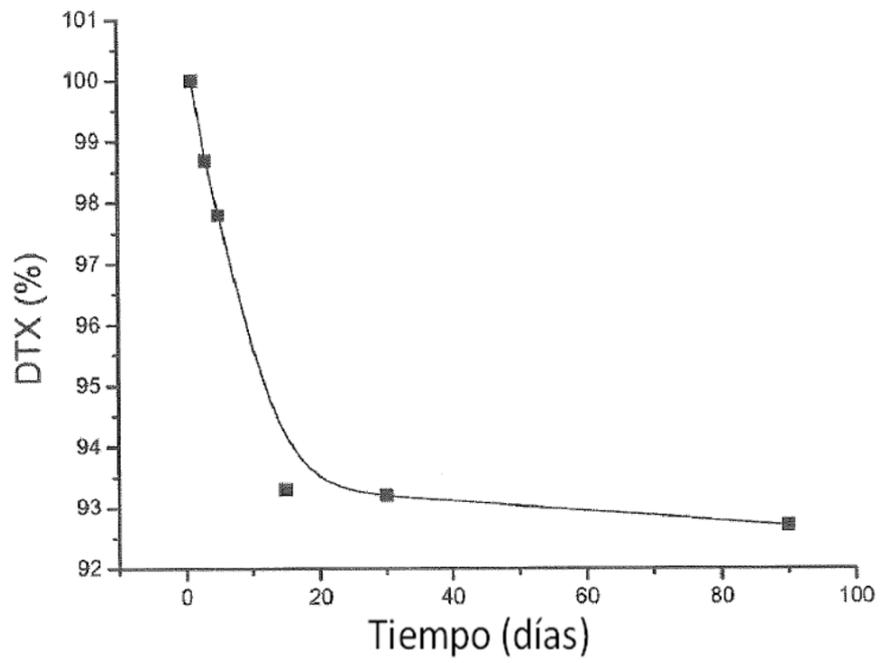


Figura 12

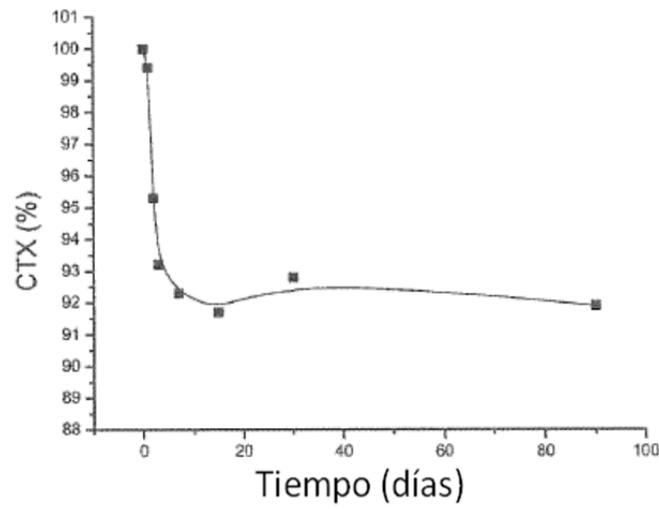


Figura 13

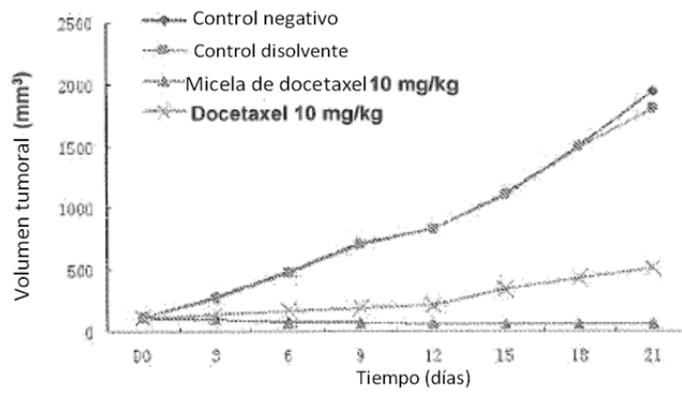


Figura 14

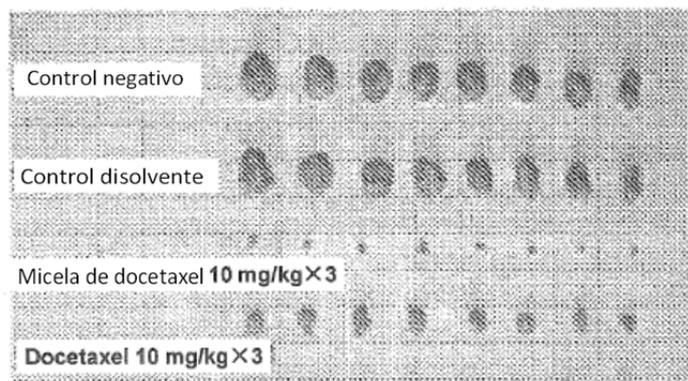


Figura 15

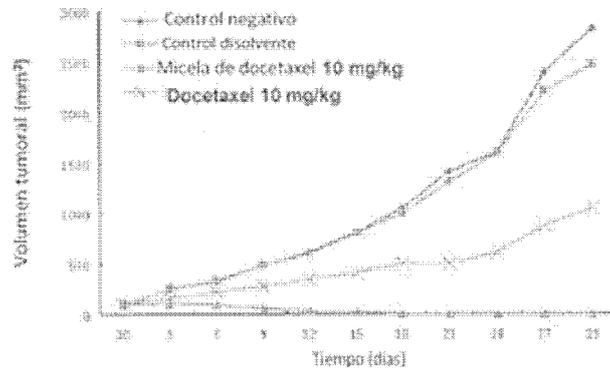


Figura 16

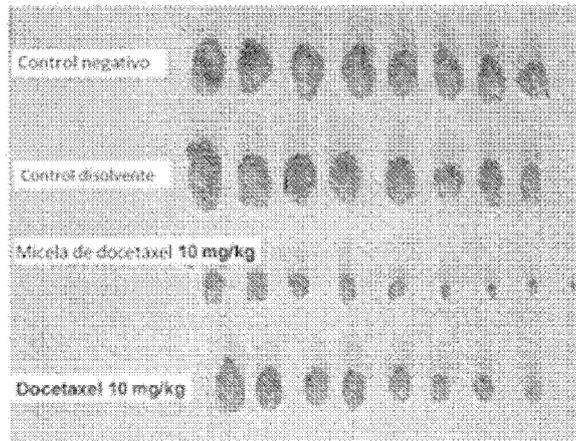


Figura 17

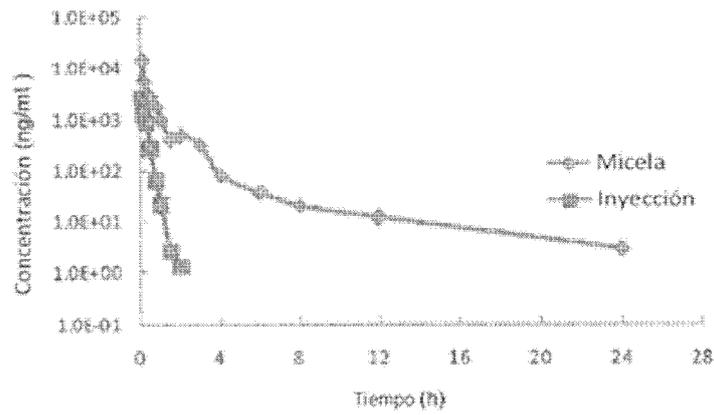


Figura 18

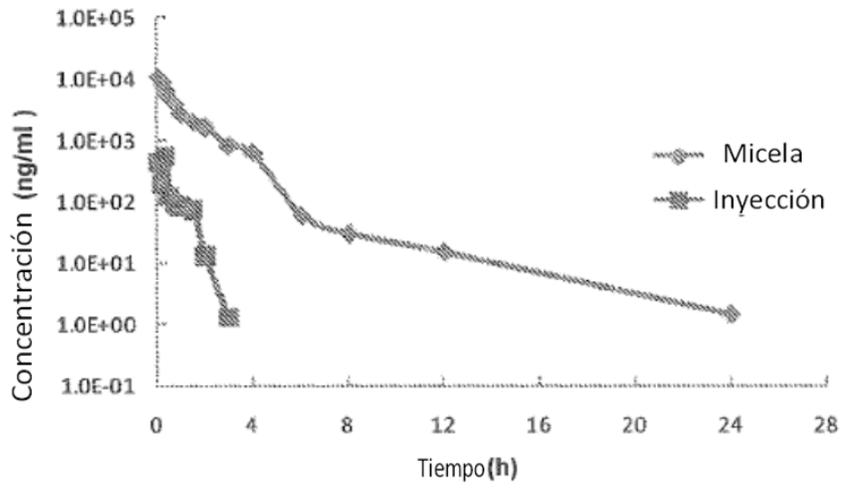


Figura 19

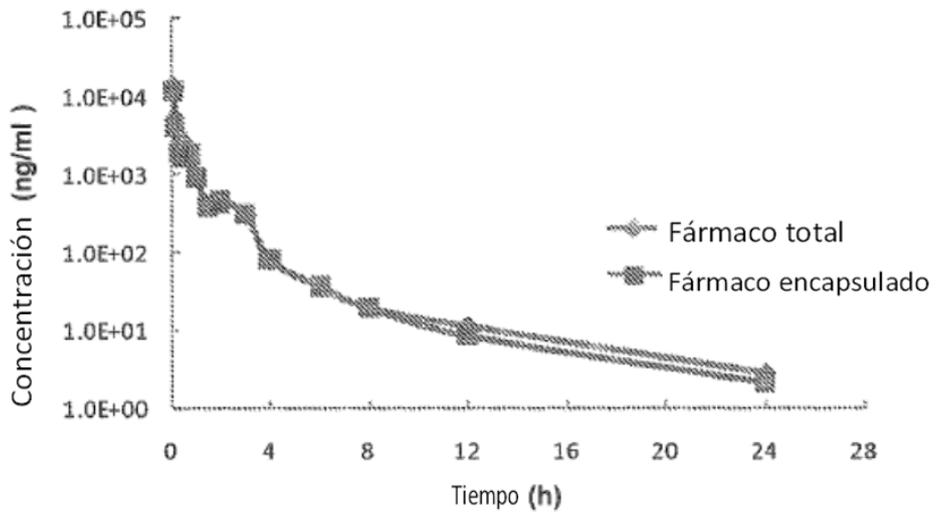


Figura 20

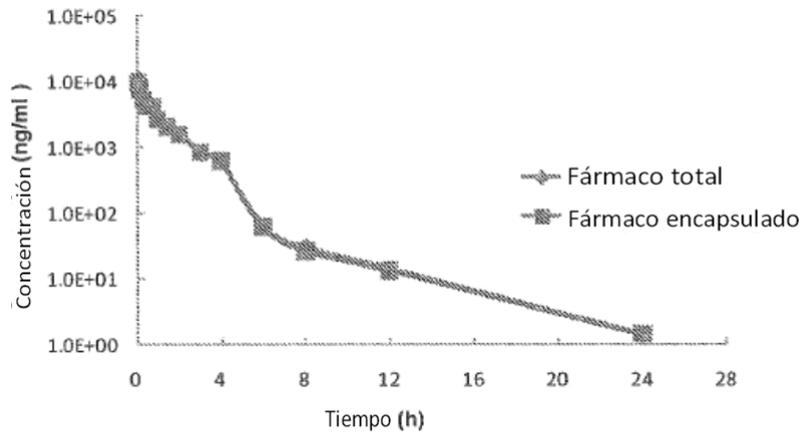


Figura 21

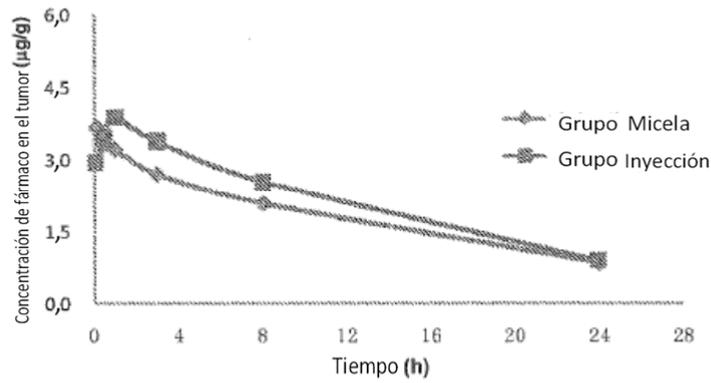


Figura 22

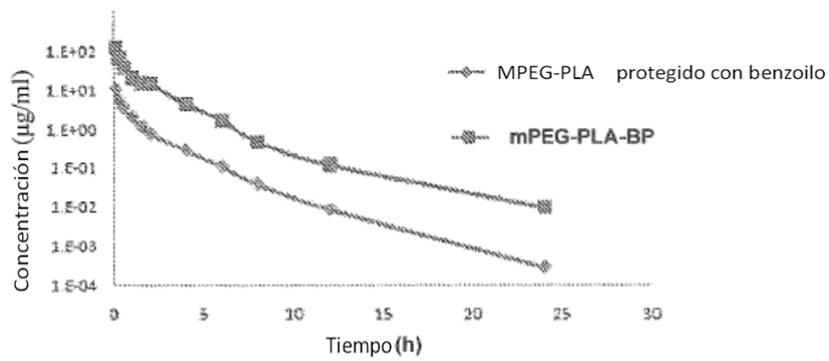


Figura 23