

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 173**

51 Int. Cl.:

A61K 47/59 (2007.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2011 PCT/EP2011/070441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2011 E 11784668 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2640422**

54 Título: **Conjugados poliméricos de principios activos, su procedimiento de preparación y sus intermedios poliméricos**

30 Prioridad:

19.11.2010 FR 1059561

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

18.07.2017

73 Titular/es:

**SANOFI (33.3%)
54, rue de la Boétie
75008 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**AMGOUNE, ABDERRHAMANE;
BAZILE, DIDIER;
BENSAID, FETHI;
BOURISSOU, DIDIER;
DIDIER, ERIC;
GRECO, STÉPHANIE;
LAKKIREDDY, HARIVARDHAN REDDY;
SABLE, SERGE y
VEILLARD, MICHEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 625 173 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

Conjugados poliméricos de principios activos, su procedimiento de preparación y sus intermedios poliméricos

La presente invención se refiere a conjugados poliméricos de principios activos, en particular de taxoides.

5 Los taxoides tienen generalmente en común una solubilidad muy baja en agua. De este modo, el taxol se formula en una mezcla de cremophor y alcohol, lo que provoca efectos secundarios significativos, tales como hipersensibilidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y neurotoxicidad. Se han buscado formulaciones alternativas; en particular, se han explorado formulaciones solubles en agua a base de polímeros, tales como microesferas, nanopartículas y micelas, con el objetivo de proporcionar formas de administración alternativas y eficaces (Gaucher et al., J. of Controlled Release, 143 (2010), 2-12).

10 Las partículas de tamaño nanométrico son particularmente ventajosas por cuanto su pequeño tamaño les permitiría alcanzar tejidos tumorales, y su estructura, que comprende una corona hidrófila, haría posible prolongar el tiempo de circulación sistémica.

De este modo, la patente US 5766635 describe nanopartículas de principios activos preparadas a partir de copolímeros de polietilenglicol y poliácido láctico, formándose las nanopartículas mediante precipitación simple. No obstante, las nanopartículas así formadas resultan de un simple encapsulamiento físico del principio activo.

15 Adicionalmente, Nederberg et al., Biomacromolecules, 2009, 10, 1460-1468, describen micelas que comprenden paclitaxel y un copolímero Y de polietilenglicol y poliácido láctico. Sin embargo, nuevamente aquí, las micelas obtenidas resultan del simple encapsulamiento físico del paclitaxel con el mencionado copolímero de PEG-PLA modificado.

20 Sin embargo, este tipo de encapsulamiento presenta la desventaja de proporcionar un grado pobremente controlado de encapsulamiento, generalmente con un riesgo elevado de precipitación del principio activo. Adicionalmente, el nanoencapsulamiento proporciona una liberación que es difícil de controlar y que depende de la difusión y biodegradación.

Por lo tanto, es deseable otro tipo de nanopartículas desprovistas de estas desventajas. De este modo, se ha propuesto una conjugación covalente del principio activo y del (co)polímero.

25 Esto es debido a que es deseable proporcionar formulaciones con encapsulamiento covalente, haciendo posible en particular un encapsulamiento estequiométrico, una precipitación limitada del principio activo y/o una liberación controlada.

30 El documento WO 99/17804 describe derivados de camptotecina poliméricos que resultan de la conjugación covalente de camptotecina y un derivado de metacrililoil-glicina-aminoácido.

Sin embargo, esta solicitud de patente se refiere solamente a derivados de camptotecina.

De este modo, se han proporcionado conjugados covalentes de polímeros y taxoides. Por ejemplo, Zhang et al., Biomaterials, 26(2005), 2121-2128, proporcionan conjugados de paclitaxel con monometoxi-polietilenglicol-pollactida (MPEG-PLA) vía un enlazador diglicólico que forman micelas en un medio acuoso. Sin embargo, el principio activo, enlazado al extremo del PLA, está atrapado en la región hidrófoba de las micelas así formadas, y de hecho no es muy accesible.

35 Cheng et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 4830, también han descrito nanopartículas en las que el principio activo se injerta en el extremo del PLA, en la región hidrófoba no muy accesible.

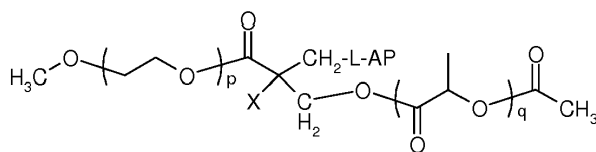
40 De este modo, es deseable mejorar el control de la liberación del principio activo desde el (co)polímero en este tipo de formulación con encapsulamiento covalente que haga posible un encapsulamiento estequiométrico y una precipitación limitada del principio activo.

Biomacromolecules 2009, 10(6), 1460-1468, describe estructuras que comprenden un copolímero de tres brazos sin principios activos, para formar micelas.

45 La presente invención propone responder a este problema técnico al proporcionar un encapsulamiento covalente, denominado conjugación, al introducir un enlazador entre el (co)polímero y el principio activo y al mejorar significativamente la accesibilidad del principio activo para la hidrólisis.

De este modo, los presentes inventores han descubierto polímeros funcionalizados de polietilenglicol y poliácido láctico que satisfacen los requisitos expuestos anteriormente.

50 Según una primera materia objeto, la presente invención se refiere así a conjugados de principio activo y de un copolímero de polietilenglicol y poliácido láctico de fórmula (Ia):



(Ia),

en la fórmula (I) mencionada anteriormente:

- p es el número medio de unidades de óxido de etileno, y está comprendido entre 1 y 340;
 - q representa el número medio de unidades de ácido láctico, y está comprendido entre 10 y 700;
- 5
- AP es un resto de principio activo, seleccionado preferiblemente de taxoides,
 - L es un enlazador,
 - X es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno o grupos OR, CN, CF₃, NRR' o COOR, en los que R y R', que son idénticos o diferentes entre sí, son un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo,
- 10
- y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La expresión "peso molecular medio" se refiere al peso molecular medio ponderal.

Generalmente, el resto AP está enlazado a L por medio de un grupo OH presente en el AP.

Preferiblemente, el PLA muestra, en su extremo hidroxilo libre opcionalmente restante, un grupo protector, por ejemplo un grupo C(=O)alquilo, tal como un grupo C(=O)CH₃.

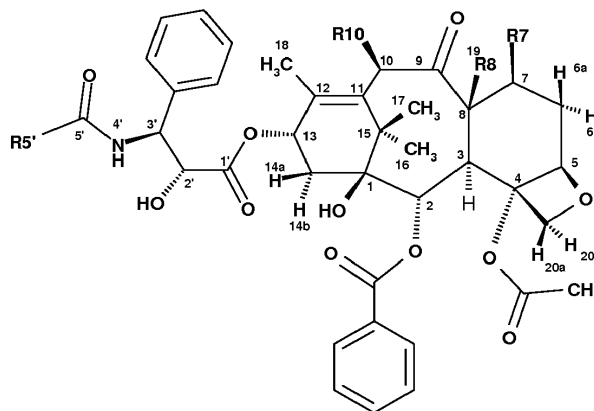
- 15
- Preferiblemente, X es un grupo metilo.

Generalmente, p está comprendido entre aproximadamente 20 y 110.

Generalmente, q está comprendido entre aproximadamente 40 y 300.

- 20
- Los conjugados según la invención hacen posible un encapsulamiento estequiométrico del principio activo por cadena de polímero comprendido entre 1 y 50%, generalmente hasta 15% p/p, en particular alrededor de 5-6%, y muestra una baja precipitación del principio activo en la fase acuosa y una liberación controlada del principio activo mediante el enlazador. Adicionalmente, debido a la estructura de Y específica del copolímero de mPEG/PLA, el principio activo aparece en la interfaz hidrófoba/hidrófila y de este modo es accesible a la hidrólisis específica y no específica, haciendo posible una liberación controlada en comparación con un principio activo situado en el núcleo hidrófobo.

- 25
- En la fórmula (I) definida anteriormente, AP se puede seleccionar de taxoides. Los mencionados taxoides se seleccionan en particular de paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel y larotaxel, tales como de fórmulas:



Paclitaxel: R10 = -OC(=O)-CH₃; R5' = Ph, R7 = OH; R8 = CH₃

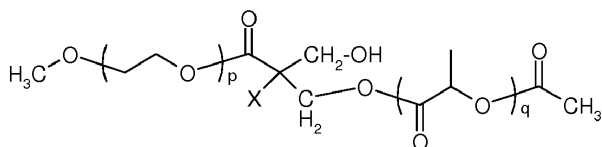
Docetaxel: R10 = -OH; R5' = -O-C(CH₃)₃; R7 = OH; R8 = CH₃

- 30
- Larotaxel: R10 = -O-C(=O)-CH₃; R5' = -O-C(CH₃)₃; R7 y R8 forman un ciclopropilo con los átomos de carbono a los que están unidos;

- un grupo alquilo se entiende que significa: un grupo de hidrocarburo alifático (C1-C6) saturado, lineal o ramificado. Se puede hacer mención, a título de ejemplo, de los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo o pentilo;
- un grupo arilo se entiende que significa: un grupo cíclico aromático que comprende entre 5 y 10 átomos de carbono. Se puede hacer mención, como ejemplos, de grupos arilo, de fenilo o naftilo.

Según otra materia objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado según la invención.

Según una primera realización, el conjugado de fórmula (I) se puede obtener acoplando el compuesto de fórmula (IIIa):



(IIIa)

con un derivado del mencionado principio activo, que corresponde a la fórmula:



en la que L se define como en la fórmula general (Ia).

De este modo, en el caso de los taxoides, AP-L-H corresponde al derivado de AP en el que el grupo OH libre de la cadena lateral del taxoide se ha esterificado generalmente con el grupo LH vía el grupo ácido carboxílico de LH.

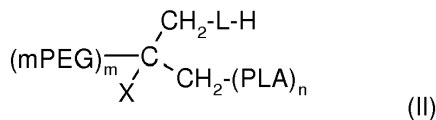
Esta reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo en condiciones de esterificación conocidas por una persona experta en la técnica, en particular en presencia de agentes activantes, tales como carbodiimidas (tales como diisopropilcarbodiimida (DIPC)), con o sin catalizador, tal como dimetilaminopiridina (DMAP). Esta reacción se puede llevar a cabo en un disolvente apropiado, tal como diclorometano, cloroformo o acetato de etilo, a una temperatura de entre 0°C y la temperatura de reflujo del disolvente, más generalmente a temperatura ambiente.

El principio activo modificado AP-L-H se puede obtener del principio activo AP mediante un acoplamiento con el precursor del enlazador L deseado.

De este modo, en el caso en el que L represente un compuesto de disuccinato, el precursor usado es anhídrido succínico. En el caso en el que L represente un grupo diglicolato, el precursor usado es anhídrido diglicólico.

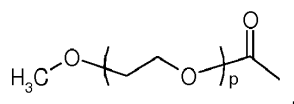
Esta reacción de acoplamiento se lleva a cabo generalmente en un disolvente tal como piridina, o en un disolvente clorado en presencia de un catalizador, tal como DMAP o piridina, a una temperatura entre 0°C y la temperatura de reflujo del disolvente bajo consideración, más generalmente a temperatura ambiente.

Según una segunda realización, el mencionado procedimiento comprende la etapa de acoplar el mencionado principio activo AP que exhibe un grupo OH con un copolímero de PEG/PLA de fórmula (II):

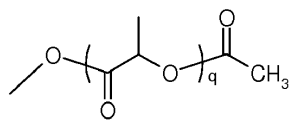


(II)

en la que LH exhibe un grupo ácido carboxílico terminal COOH y X y n se definen como en la fórmula (Ia), mPEG representa:



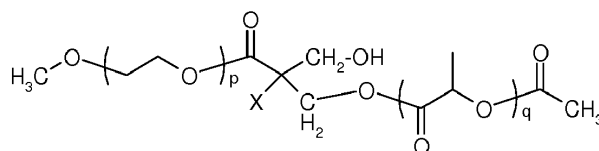
en el que p se define como en la fórmula (Ia), y PLA representa:



en el que q se define como en la fórmula (Ia).

- 5 La mencionada reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo en las condiciones de esterificación normales en un disolvente tal como diclorometano o cloroformo, en presencia de agentes activantes, tales como carbodiimidas (tales como diisopropilcarbodiimida (DIPC)), con o sin catalizador, tal como dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción se lleva a cabo generalmente a una temperatura entre 0°C y la temperatura de reflujo del disolvente, más generalmente a temperatura ambiente.

El compuesto de fórmula (II) se puede obtener a partir del compuesto de fórmula (IIIa):

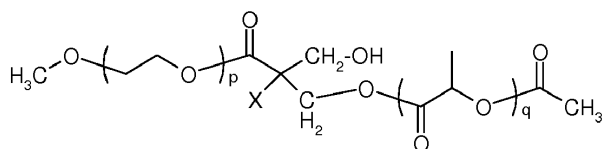


en la que p, q y X se definen como en las fórmulas (Ia) y/o (Ib).

- 10 en la que m, p, q, n y X se definen como en la fórmula (I), mediante acoplamiento con un precursor del enlazador LH. De este modo, en el caso en el que LH represente el grupo disuccinato, el precursor usado es anhídrido succínico. Cuando L es un grupo diglicolato, su precursor usado es anhídrido diglicólico. Los precursores disponibles según el grupo L deseado son generalmente conocidos por la persona experta en la técnica, y están comercialmente disponibles.
- 15 La mencionada reacción de acoplamiento tiene lugar generalmente en un disolvente, tal como tolueno o diclorometano, en presencia de un catalizador, tal como piridina, a una temperatura de entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo del mencionado disolvente.

Esta reacción se puede facilitar usando un catalizador apropiado, tal como en particular DMAP.

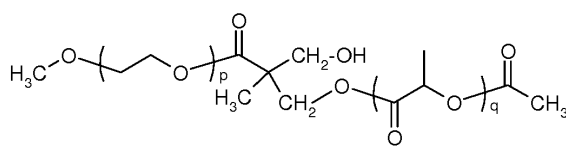
- 20 El compuesto de fórmula (IIIa) usado según una u otra de las rutas sintéticas anteriores es nuevo. De este modo, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (IIIa):



(IIIa)

en la que p, q, n y X se definen como en las fórmulas (Ia) y/o (Ib).

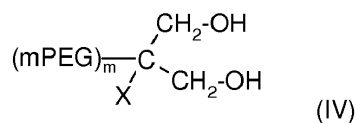
El compuesto (IIIa) corresponde preferiblemente a las siguientes fórmulas (IIIb):



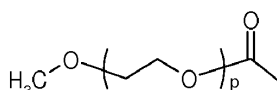
(IIIb)

- 25 Según otra materia objeto, la presente invención también se refiere al procedimiento para la preparación del intermedio de fórmula (IIIa). El mencionado procedimiento comprende:

1. la etapa de monoproteger selectivamente un grupo hidroxilo del compuesto de fórmula (IV):



en la que (mPEG)m representa:



- 30

por medio de un grupo protector apropiado,

El compuesto de fórmula (VII) está comercialmente disponible o se puede obtener mediante aplicación o adaptación de métodos conocidos por una persona experta en la técnica y/o dentro del alcance de una persona experta en la técnica, en particular a la vista de los procedimientos descritos por Larock et al. en *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, 1989.

5 El procedimiento según la invención puede comprender adicionalmente la etapa subsiguiente que comprende el aislamiento y/o la purificación del compuesto deseado. El compuesto deseado así preparado se puede recuperar de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos se pueden recuperar destilando el disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario, tras la destilación del disolvente de la mezcla de la disolución, vertiendo el residuo en agua, seguido de una extracción con un disolvente orgánico inmiscible con agua, y
10 destilando el disolvente del extracto. Además, si se desea, el compuesto se puede purificar adicionalmente mediante diversas técnicas, tales como recristalización, reprecipitación, o las diversas técnicas de cromatografía, en particular cromatografía preparativa de exclusión de tamaños.

Según otra materia objeto, la presente invención también se refiere a las nanopartículas que comprenden un conjugado según la invención. Estas nanopartículas exhiben generalmente un tamaño de entre 10 y 300 nm,
15 generalmente entre 20 y 200 nm.

Típicamente, comprenden un núcleo de PLA y una corona de PEG, en cuya interfaz aparece el AP.

Generalmente se pueden preparar mediante nanoprecipitación, en particular mediante disolución del conjugado en un disolvente apropiado, tal como acetona, y evaporación del mencionado disolvente.

Según otra materia objeto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado según la invención.
20

Según otra materia objeto, la presente invención también se refiere a un conjugado según la invención para uso en el tratamiento y/o prevención de cánceres.

FIGURAS

25 La Figura 1 representa la imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas obtenidas según la invención.

La Figura 2 representa la distribución en tamaños de las partículas mediante medida de DLS (dispersión de luz dinámica) a T 0 y a T + 3 semanas.

30 La Figura 3 representa el perfil in vitro de formulaciones de nanopartículas de conjugados de cabazitaxel (es decir, PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel, PLA-PEG-Y-glutaril-cabazitaxel, y PLA-PEG-Y-diglicolil-cabazitaxel) en plasma de rata.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se dan a título de representación e ilustración de la presente invención.

35 Los disolventes y agentes reaccionantes se usaron como tales, excepto cuando esto se especifica. Todas las síntesis y polimerizaciones se llevan a cabo en atmósfera inerte de argón, usando una técnica Schlenk estándar. Los disolventes se secan de antemano y se destilan antes del uso: diclorometano (DCM) sobre CaH₂, tolueno sobre sodio o con un purificador de disolvente (sistema Mbraun MB-SPS-800), tetrahidrofurano (THF) sobre sodio, y éter dietílico sobre sodio. La DL-lactida (PURAC) se purifica mediante destilación azeotrópica y recristalización en tolueno. Subsiguientemente se sublima y entonces se almacena en argón en una caja de guantes.

40 Resonancia magnética nuclear (RMN): los espectros de RMN se registraron a temperatura ambiente en dispositivos Bruker Avance 300 MHz, Bruker Avance 400 MHz y Bruker Avance 500 MHz, equipados con una criosonda. Los desplazamientos químicos δ en ¹H y ¹³C se dan en ppm con respecto al disolvente residual, y los desplazamientos químicos δ en ²⁹Si se dan en ppm con respecto a Me₄Si como patrón externo. Las constantes de acoplamiento *J* se dan en hercios. Las siguientes abreviaturas se han empleado para describir las señales: s (singlete), br (ancho), d (doblete), t (triplete), q (cuartete) y m (multiplete).

45 Cromatografía de exclusión estérica (SEC): las masas molares medias numéricas *M_n*, las masas molares medias ponderales *M_w* y los índices de polidispersidad (*M_w/M_n*) se miden mediante cromatografía de exclusión estérica (SEC) a 35°C con una línea de detección triple compuesta de un Alliance Waters e2695, de un detector de dispersión de luz MALS miniDAWN (Wyatt), de un viscosímetro Viscostar-II (Wyatt) y de un refractómetro Waters 2414. Como eluyente, se usa THF a un caudal de 1,0 ml/min. Se usa una precolumna Styragel (WAT054405) y dos
50 columnas Shodex (KF-802.5 y KF-804). Las calibraciones se llevan a cabo con patrones de poliestireno (400-100000 g/mol). Las muestras se preparan de la siguiente manera: el producto a analizar (10 a 20 mg) se disuelve en 1 ml de THF que contiene tolueno como marcador. La disolución se filtra subsiguientemente usando un filtro de 0,45 μ m.

Espectrometría de masas: los espectros de masas mediante ionización química (DCI) se registran en un

espectrómetro Thermo Fisher Scientific DSQ.

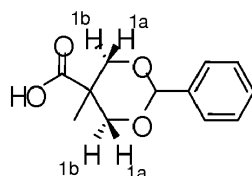
Microscopía electrónica de transmisión (TEM): la morfología de las nanopartículas se observa mediante TEM usando un microscopio JEOL-JEM 2100F con un campo de aceleración de 200 keV. A fin de preparar las muestras, unas pocas gotas de la dispersión de nanopartículas, diluida diez veces (0,5 mg/ml), se incuban con 0,2% (p/v) de ácido fosfovolfámico durante 30 min. La muestra se coloca subsiguientemente en una rejilla de cobre y se seca a temperatura ambiente.

Dispersión de luz dinámica (DLS): el tamaño (diámetro hidrodinámico) de las nanopartículas se mide mediante DLS usando un Zetasizer 3000 HS (Malvern).

La muestra (5 mg/ml) se coloca en una celda capilar tras la filtración (filtro de PVDF de 1,2 μm). Las medidas se llevan a cabo a 25°C con un ángulo de detección de 90°C. La longitud de onda usada es 633 nm.

En los ejemplos a continuación, los índices m y n en (mPEG)_m y (PLA)_n son peso molecular medio ponderal. n se determina experimentalmente a partir del peso obtenido mediante el análisis de SEC.

Síntesis de ácido 5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico (Bn-Bis-MPA)(I)



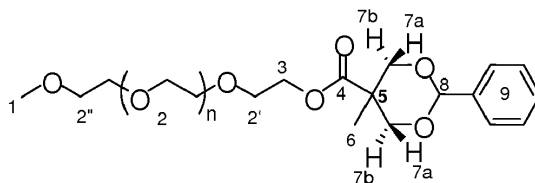
- 15 Se disuelven ácido 2,2'-bis(hidroximetil)propiónico (Bis-MPA) (10 g, 74,6 mmoles), benzaldehído (8,3 g, 78,2 mmoles) y ácido metanosulfónico (MSA) (1,5 g, 15,6 mmoles) en 100 ml de tolueno. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 h. El disolvente se evapora subsiguientemente a vacío, y después se añaden una disolución de NaHCO_3 al 10% (300 ml) y éter (300 ml) hasta que el residuo se ha disuelto completamente. La fase acuosa se recupera, y se añaden unas pocas gotas de ácido acético glacial. Tras un fuerte desprendimiento de gas, se forma un precipitado blanco. Se separa por filtración, se enjuaga con 20 ml de agua y se seca a vacío toda la noche. $W_{\text{obt}} = 13,3 \text{ g}$, $Y = 80\%$.

RMN ^1H (d_6 -acetona, 300 MHz): δ (ppm) 1,04 (s, 3H, -C- CH_3), 3,73 (d, 2H, 1a, $J^2_{\text{Ha-Hb}} = 11,4\text{Hz}$), 4,57 (d, 2H, 1b, $J^2_{\text{Ha-Hb}} = 11,3 \text{ Hz}$), 5,52 (s, 1H, O_2 -CH-), 7,32 (m, 3H, ArH), 7,42 (m, 2H, ArH).

- 25 RMN ^{13}C (d_6 -acetona, 75,5 MHz): δ (ppm) 18,4 (- CH_3), 42,8 (Cq), 74,2 (- CH_2 -), 102,1 (- O_2 -CH-), 127,3 (CH arílico), 128,8 (CH arílico), 129,5 (CH arílico), 140,0 (Cq arílico), 176,2 (-COOH).

DCI calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 240,12; determinado = 239,90

Síntesis de metoxi-polietilenglicol-bencilideno (mPEG₂₀₀₀-O₂Bn) (II)



- 30 Se disuelven metoxi-polietilenglicol (peso molecular medio: 2000 g/mol, citado aquí como mPEG₂₀₀₀) (10 g, 5 mmoles) y el bis-MPA (I) protegido (1,35 g, 6,1 mmoles) en 45 ml de DCM anhidro en una vasija Schlenk de 250 ml. Subsiguientemente se añaden al medio 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (0,96 g, 5 mmoles) y *p*-toluenosulfonato de 4-(dimetilamino)-piridinio (DPTS) (0,6 g, 2 mmoles). El medio de reacción se agita a 40°C en argón durante 48 h. El medio de reacción se extrae subsiguientemente con 20 ml de una disolución 1M de HCl, 20 ml de disolución de NaHCO_3 al 10% y 20 ml de H_2O .

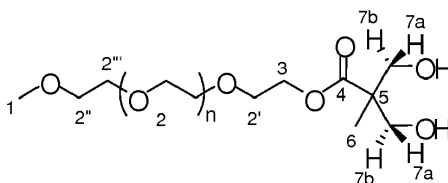
- 35 Tras secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , filtrar y evaporar el disolvente, el residuo se precipita en éter a 0°C. El precipitado se separa entonces por filtración y se seca a vacío toda la noche. Se obtiene un sólido blanco. $W_{\text{obt}} = 9,68 \text{ g}$, $Y = 88\%$.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,05 (s, 3H, 6), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (bs, 180H, 2, 2' y 7b), 4,36 (t, 2H, 3, $J^3_{\text{H-H}} = 4,8 \text{ Hz}$), 4,66 (d, 2H, 7a, $J^2_{\text{Ha-Hb}} = 11,5 \text{ Hz}$), 5,44 (s, 1 H, 8), 7,32 (m, 3H, ArH), 7,42 (m, 2H, ArH).

- 40 RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ (ppm) 17,8 (C6), 42,3 (C5), 58,9 (C1), 64,1 (C3), 68,9 (C7), 70,5 (C2), 71,8 (C2'), 73,4 (C2''), 101,2 (C8), 126,1 (CH arílico), 128,0 (CH arílico), 128,8 (CH arílico), 137,8 (Cq arílico), 173,8 (C4).

SEC: $M_n = 2867$ g/mol, $PI = 1,06$

Síntesis de metoxi-polietilenglicol-diol (mPEG₂₀₀₀-(OH)₂) (III)

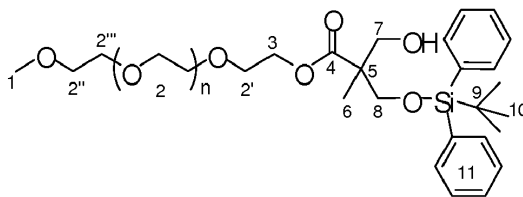


5 El compuesto (II) (9,5 g, 4,3 mmoles) y paladio sobre carbón (Pd al 10%/C) (0,95 g, 10% p/p) se mezclan en un matraz Schlenk de 250 ml de dos bocas de fondo redondo equipado con un balón lleno de hidrógeno (H₂), seguido de un ciclo de vacío en argón. Subsiguientemente se añaden 40 ml de DCM y 40 ml de metanol (MeOH). Se lleva a cabo un ciclo de vacío en H₂. El medio de reacción se agita bajo H₂ estático a TA durante 4 h. La mezcla se filtra subsiguientemente a través de Celite. Los disolventes se evaporan a vacío, y el residuo se seca a vacío toda la noche. Se obtiene un sólido amarillento. $W_{obt} = 8,7$ g, $Y = 95\%$.

10 RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1,11 (s, 3H, 6), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (bs, 180H, 2), 3,69 - 3,78 (m, 4H, 7a y 7b), 4,33 (t, 2H, 3, $J_{H-H}^3 = 4,8$ Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,7 MHz): δ 16,9 (C6), 49,5 (C5), 58,8 (C1), 63,2 (C3), 67,1 (C7), 68,7 (C2'), 70,4 (C2), 71,8 (C2''), 72,6 (C2'''), 175,5 (C4).

Síntesis de mPEG₂₀₀₀-(OH)-Y-(OTBDPS) (IV)



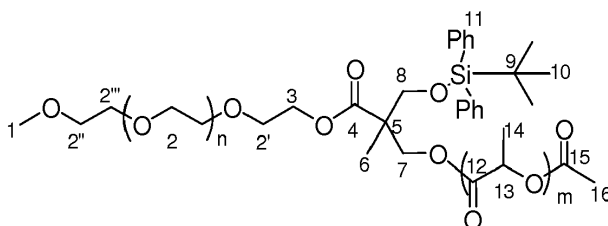
15 El compuesto (III) (4 g, 1,90 mmoles) se disuelve en 18 ml de DCM anhidro en una vasija Schlenk de 100 ml. Subsiguientemente se añade trietilamina (TEA), destilada sobre KOH (0,4 g, 3,95 mmoles), y después se añade gota a gota terc-butildifenilclorosilano (TBDPSiCl) (1,1 g, 3,92 mmoles) a 0°C. El medio de reacción se agita a 40°C y en argón. Después de 24 h, la sal formada se separa por filtración, y después la fase orgánica se extrae con una disolución 1M de HCl (15 ml), después con una disolución de NaHCO₃ (15 ml) y, finalmente, con H₂O (15 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. Tras filtrar, la mezcla se concentra a vacío, y después el residuo se precipita en éter a 0°C. El precipitado blanco obtenido se separa entonces por filtración, se lava y se seca a vacío. El producto se seca subsiguientemente usando un azeótropo en tolueno. El producto se almacena en una caja de guantes. $W_{obt} = 4,1$ g, $Y = 90\%$.

25 RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1,02 (s, 9H, 10), 1,19 (s, 3H, 6), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (br, 180H, 2/2'/2''/2'''), 3,73 - 3,80 (m, 4H, 7 y 8), 4,26 (t, 2H, 3, $J_{H-H}^3 = 4,8$ Hz), 7,35-7,64 (m, 10H, 11).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz): δ 16,9 (C6), 19,1 (C9), 26,5 (C10), 50,3 (C5), 58,7 (C1), 63,1 (C3), 65,6 (C7), 66,4 (C8), 68,6 (C2'), 70,3 (C2), 71,7 (C2''), 72,3 (C2'''), 127,5 (CH arílico), 129,5 (CH arílico), 132,9 (Cq arílico), 135,3 (CH arílico), 174,8 (C4).

30 RMN ²⁹Si (CDCl₃, 59,6 MHz): δ -4,33 (-O-Si-).

Síntesis de un copolímero de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₄₀₀₀-Y-OTBDPS (V)



35 El macroiniciador (IV) (0,8 g, 0,34 mmoles) y DL-lactida (5 g, 35 mmoles, DP 100) se disuelven en 25 ml de DCM anhidro. Subsiguientemente se añaden una disolución de catalizador (10 ml), 4 equivalentes de tiourea (N-ciclohexil-N'-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]tiourea) y 4 equivalentes de (-)-esparteína. El medio de reacción se agita a 35°C en argón hasta que la lactida se ha consumido totalmente, acción la cual se monitoriza mediante RMN ¹H. Después de

6 h, se añaden al medio de reacción anhídrido acético (166 μ l, 1,71 mmoles) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (4,5 mg, 0,35 mmoles). Este último se agita durante 1 h adicional. La mezcla se concentra subsiguientemente a vacío y después se precipita en 150 ml de MeOH a 0°C. El precipitado blanco formado se separa por filtración, se lava con 20 ml de MeOH y después se seca a vacío toda la noche.

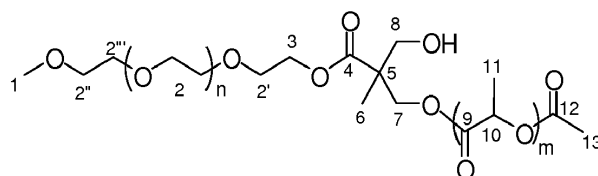
5 RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1,02 (s, 9H, 10), 1,19 (s, 3H, 6), 1,58 (br, 595H, 14), 2,12 (s, 3H, PLA: 16), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (br, 180H, 2/2'/2''/2'''), 3,73 - 3,80 (m, 2H, 8), 4,20 - 4,40 (m, 4H, 3 y 7), 5,16 (br, 192H, 13), 7,35-7,64 (m, 10H, 11).

10 RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz): δ 16,6 (C14 y C6), 20,4 (C9), 26,6 (C10), 48,5 (C5), 58,8 (C1), 63,5 (C3), 65,0 (C7), 66,6 (C8), 68,9 (C13), 68,2 (C2'), 70,1 (C2), 71,7 (C2'''), 72,2 (C2''), 127,7, 129,8, 132,8, 135,5 (C11), 169,50 (C12 y C15), 174,82 (C4).

Peso molecular medio (mediante RMN): $M = 16150$ g/mol

De forma similar, la reacción de polimerización por apertura de anillo (ROP) también se lleva a cabo con 35 y 150 equivalentes de la lactida, que conducen a los copolímeros mPEG₂₀₀₀-PLA₅₀₀₀ y mPEG₂₀₀₀-PLA₂₁₀₀₀

Síntesis de un copolímero de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₄₀₀₀-Y-OH (VI)



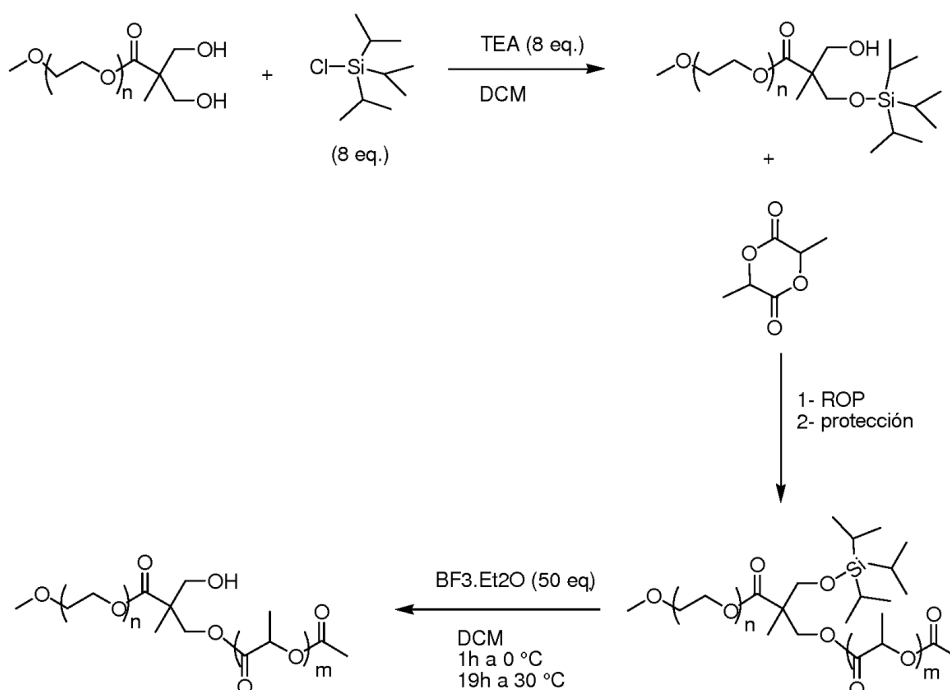
15 El copolímero (V) (3,96 g, 0,28 mmoles) se disuelve en 40 ml de THF anhidro. Subsiguientemente se añade gota a gota una disolución 1M de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF (1,5 ml, 1,5 mmoles). El medio de reacción se agita a 30°C en argón durante 7 h. El THF se evapora subsiguientemente a vacío. El residuo se disuelve en 15 ml de DCM y se precipita subsiguientemente en 800 ml de éter a 0°C. El precipitado blanco se separa por filtración y después se seca a vacío toda la noche. $W_{\text{obt}} = 2,14$ g, $Y = 55\%$.

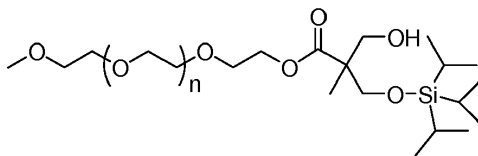
20 RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,57 (br, 590H, PLA: 11), 2,12 (s, 3H, PLA: 13), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (br, 180H, 8, 2/2'/2''/2'''), 4,33 (m, 4H, 3 y 7), 5,15 (br, 186H, PLA: 10).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75,5 MHz): δ 16,5 (PLA: C11), 48,5 (C5), 58,7 C1), 63,4 (C3), 64,2 (C7), 66,5 (C8), 68,8 (PLA: C10), 68,2 (C2'), 70,1 (C2), 71,7 (C2'''), 72,2 (C2''), 169,5 (PLA: C9), 174,8 (PEG: C4).

25 Peso molecular medio (mediante RMN): $M=15495$ g/mol

La protección también se llevó a cabo con triisopropilclorosilano (TIPSCI), según lo siguiente.

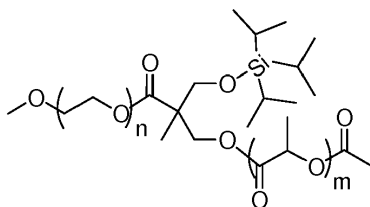


Síntesis de mPEG₂₀₀₀-(OH)-Y-(OTIPS)

5 En un Schlenk de 25 ml, el derivado de mPEG-Diol (0,5 g, 0,24 mmoles) se disuelve en 5 ml de DCM anhidro. Después se añade trietilamina (TEA) (destilada en KOH) (0,2 g, 2,01 mmoles), y se añade gota a gota tris-isopropilclorosilano (TIPSCI) (0,40 g, 2 mmoles) a 0°C. La mezcla de reacción se agita a 40°C y en argón. Después de 24 horas, la sal formada se filtra, y la fase orgánica se extrae con una disolución 1M de HCl (5 ml), y una disolución de NaHCO₃ (5 ml) y H₂O (5 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. Después de filtrar, la mezcla se concentra a vacío, y el residuo se precipita en éter a 0°C. El precipitado blanco se filtra entonces, se lava y se seca a vacío. Después, el producto se seca con un azeótropo en tolueno. El producto se almacena en una caja hermética.

10 M_{obt} = 0,4 g, R = 74 %.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 0,98 -1,03 (br, 21 H), 1,16 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 3,63 (m, 180H), 3,73 - 3,80 (m, 4H), 4,26 (t, 2H, J³_{H-H} = 4,8 Hz).

Síntesis de un copolímero de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₀₀₀₀-Y-OTIPS (V')

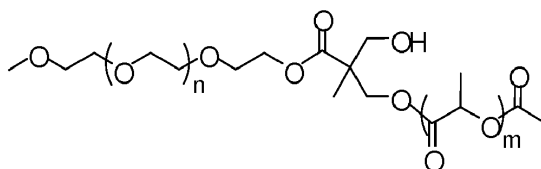
15 El macroiniciador (0,18 g, 79,6 μmoles) y la DL-Lactida (0,8 g, 5,6 mmoles, 70 equivalentes) se disuelven en 7 ml de DCM anhidro. Después se añaden una disolución del catalizador (1 ml, 4 equivalentes de tiourea (N,N'-ciclohexil-3,5-bis[trifluorometil]feniltiourea) y 2 equivalentes de (+)-esparteína). La mezcla de reacción se agita a 35°C en argón hasta la consumición total de la lactida, según se controla mediante RMN ¹H. Después de 3 horas, el anhídrido acético (39 μl, 0,40 mmoles) y la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (10 mg, 82 μmoles) se añaden a la mezcla de reacción. Ésta se agita durante una hora más. La mezcla se concentra entonces a vacío, después se precipita en 50 ml de éter a 0°C. El precipitado blanco se filtra entonces, se lava con 20 ml de MeOH, después se seca a vacío durante una noche.

20

M_{obt} = 1 g, R ~ 75 %

25 RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 0,98 -1,03 (br, 21 H), 1,16 (s, 3H), 1,58 (m, 423H), 2,12 (s, 3H), 3,37 (s, 3H, 1), 3,63 (m, 180H), 3,73 - 3,80 (m, 2H), 4,20 - 4,40 (m, 4H), 5,16 (m, 141 H, 13).

SEC: M_w = 13628 g/mol, M_n = 11850 g/mol, IP = 1,15

Síntesis de un copolímero de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₀₀₀₀-Y-OH (VI')

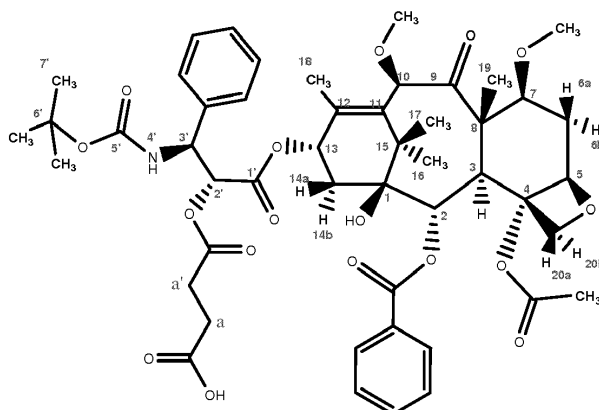
30 El copolímero protegido (1 g, 71 μmoles) se disuelve en 10 ml de DCM anhidro. Después se añade BF₃.Et₂O (0,5 g, 3,56 mmoles), gota a gota, a 0°C. La mezcla de reacción se agita a 0°C en argón durante una hora y después a 30°C durante 19 horas. Después, el DCM se evapora a vacío. El residuo se solubiliza en 5 ml de DCM, y después se precipita en 50 ml de éter a 0°C, se lava con 20 ml de MeOH y después con 20 ml de pentano. El precipitado blanco se filtra y se seca a vacío durante una noche.

M_{obt} = 0,85 g, R ~ 85%.

35 RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 1,58 (m, 425H), 2,12 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 3,63 (m, 180H), 4,33 (m, 4H), 5,16 (m, 142H).

SEC: M_w = 13925 g/mol, M_n = 11800 g/mol, IP = 1,18

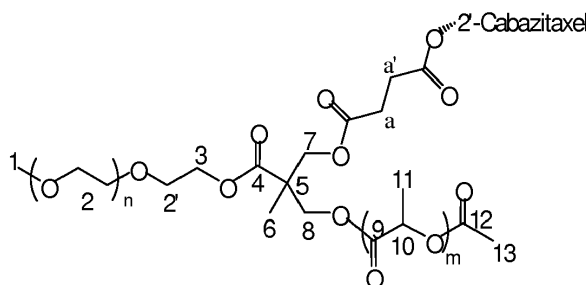
Síntesis de cabazitaxel-2'-succinilo (VII)



Se disuelve cabazitaxel (0,2 g, 0,24 mmoles) en 4 ml de piridina destilada sobre KOH. Subsiguientemente se añade anhídrido succínico (0,2 g, 2 mmoles). El medio de reacción se agita a 30°C en argón. La reacción se monitoriza mediante cromatografía de capa fina (TLC) (DCM/MeOH: 9/1). Después de 8 h, la piridina se evapora a vacío, y el residuo se purifica con una columna cromatográfica (eluyente: CHCl₃/MeOH: gradiente desde 99/1 hasta 97/3). Las diversas fracciones se evaporan subsiguientemente a fin de obtener un polvo blanco secado a vacío. $W_{\text{obt}} = 0,180 \text{ g}$, $Y = 80\%$.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 1,19 (s, 3H, 16), 1,20 (s, 3H, 17), 1,35 (s, 9H, 7'), 1,63 (s, 1 H, -OH terciario), 1,70 (s, 3H, 19), 1,78 (m, 1 H, 6a), 1,86 (s, 3H, 18), 2,15 (s, 6H, -CH₃ acetona), 2,18 - 2,33 (m, 2H, 14a y 14b), 2,34 (s, 3H, -CH₃ acetilo en 4), 2,65 (m, 5H, -CH₂ succínico a, a' y 6b), 3,28 (s, 3H, -OCH₃ en 7), 3,44 (s, 3H, -OCH₃ en 10), 3,80 (d, 1 H, 3, $J = 7,5 \text{ Hz}$), 3,84 (dd, 1 H, 7, $J = 6,5$ y $10,5 \text{ Hz}$), 4,16 (d, 1 H, 20a, $J = 8,5 \text{ Hz}$), 4,28 (d, 1 H, 20b, $J = 8,5 \text{ Hz}$), 4,80 (s, 1 H, 10), 4,95 (d, 1 H, 5, $J = 10 \text{ Hz}$), 5,28 - 5,44 (br, 2H, 2'/4'), 5,61 (d, 1 H, 2, $J = 7,5 \text{ Hz}$), 6,19 (b, 1 H, 13), 7,31, 7,38, 7,47, 7,59, (m, 9H, ArH), 8,10 (d, 2H, H ortobenzoato).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,5 MHz): δ 10,8 (C19), 15,1 (C18), 21,2 (C16), 23,2 (CH₃ acetilo), 27,3 (C17), 28,35, 28,62 (-CH₂ succínico a y a'), 28,7 (C7'), 32,6 (C6), 35,7 (C14), 43,8 (C15), 47,9 (C3), 56,7 (C3'), 57,4 (C8), 57,5 (OCH₃ en C7), 57,8 (OCH₃ en C10), 73,1 (C13), 74,7 (C2'), 75,0 (C2), 77,0 (C20), 79,2 (C1), 80,7 (C6'), 81,2 (C7), 82,3 (C4), 83,1 (C10), 84,6 (C5), 127,3-138,9 (Ar), 136,2 (C11), 139,1 (C12), 155,8 (C5'), 167,5 (CO benzoato), 168,7 (CO acetilo en 4), 170,0 - 174,0 (C1', -COO-succínico), 205,4 (C9).

Síntesis del conjugado de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₄₀₀₀-Y-succinil-2'-cabazitaxel (VIII)

El copolímero (VI) (2 g, 163 μmoles) y cabazitaxel-2'-succinilo (VII) (0,33 g, 353 μmoles) se disuelven en 40 ml de DCM anhidro. Subsiguientemente se añaden N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPC) (45 mg, 357 μmoles) y después DMAP (45 mg, 368 μmoles). El medio de reacción se agita a 35°C en argón durante 24 h. La fase orgánica se extrae subsiguientemente usando una disolución 1 M de HCl (30 ml), una disolución de NaHCO₃ al 10% (30 ml) y agua (30 ml). La fase orgánica se seca subsiguientemente sobre Na₂SO₄ y después se filtra. Se concentra a vacío, y después el residuo se precipita en 400 ml de MeOH. Tras filtrar, el precipitado se seca a vacío toda la noche. $W_{\text{obt}} = 1,5 \text{ g}$, $Y = 75\%$.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): tras la precipitación del producto bruto en MeOH, cuantificación de acoplamiento total (100%). Se detectan los mismos desplazamientos químicos de los compuestos (VI) y (VII), con una relación 1/1.

RMN ¹³C: Desplazamiento de las señales del enlazador succínico -(CH₂)-: 28,13 y 26,71 ppm, además de los desplazamientos químicos de los compuestos (VI) y (VII).

Peso molecular medio (mediante RMN): $M = 16430 \text{ g/mol}$

Formulación en nanopartículas:

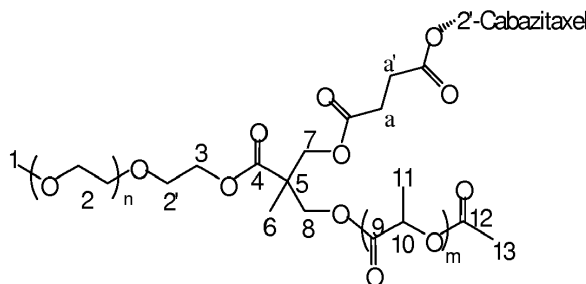
El conjugado (VIII) (20 mg) obtenido anteriormente se disuelve en 2 ml de acetona (10 mg/ml). La disolución obtenida se añade gota a gota a 4 ml de agua desionizada, con agitación. La acetona se evapora, por ejemplo en un evaporador giratorio. De este modo se obtiene una concentración final de conjugado de 5 mg/ml.

Las nanopartículas así obtenidas se caracterizaron según lo siguiente:

5 TEM: En la Figura 1 se representa una fotografía obtenida. Se observa un diámetro medio de 27 nm.

DLS: La muestra se filtra (1,2 μm): se obtiene un diámetro medio de 62 nm. La distribución permaneció sin cambios durante 3 semanas. Los resultados se ilustran en la Figura 2.

Síntesis del conjugado de mPEG₂₀₀₀-PLA₁₀₀₀-succinil-2'-cabazitaxel (VIII')



10 Se disuelven 14 g de copolímero (VI') (Mw 12700 g/mol) y 2,24 g de succinil-cabazitaxel en diclorometano seco, y se añaden 7 g de tamices moleculares activados 4A como polvo. La disolución se agita durante 10 minutos a RT, y se añaden 310 mg de DMAP y 305 mg de DIPC. La disolución se agita a 35°C durante 24 h. Tras filtrar, la disolución se concentra hasta sequedad a 40°C a vacío. El residuo se agita con 2,8 litros de metanol y 1 ml de diclorometano durante 2 horas a 0°C. La suspensión se filtra, y el sólido se lava con 100 ml de metanol. Tras secar a RT toda la noche, se obtienen 14 g de un polvo blanco. 7,5 g del sólido se vuelven a purificar en 749 ml de metanol agitando toda la noche a RT para obtener, tras filtrar y secar, 7,1 g de un polvo blanco.

20 Espectro de RMN ¹H (600 MHz, d en ppm, CDCl₃-d₁): 1,21 (m, 9 H); 1,36 (s, 9 H); 1,42 a 1,72 (m, 468 H); 1,79 (m, 1 H); 1,98 (s ancho, 3 H); 2,13 (s, 3 H); 2,18 (m, 1 H); 2,29 (m, 1 H); 2,43 (s ancho, 3 H); 2,54 a 2,77 (m, 5 H); 3,31 (s, 3 H); 3,38 (s, 3 H); 3,44 (s, 3 H); 3,50 a 3,78 (m, 180 H); 3,84 (d, J=6,5 Hz, 1 H); 3,89 (dd, J=6,5 y 10,6 Hz, 1 H); 4,08 a 4,41 (m, 8 H); 4,82 (s, 1 H); 4,99 (d, J=9,8 Hz, 1 H); 5,01 a 5,31 (m, 156 H); 5,32 (m, 1 H); 5,47 (m, 2 H); 5,64 (d, J=6,5 Hz, 1 H); 6,24 (t ancho, J=9,0 Hz, 1 H); 7,31 (m, 3 H); 7,40 (t, J=7,9 Hz, 2 H); 7,50 (t, J=7,9 Hz, 2 H); 7,61 (t, J=7,9 Hz, 1 H); 8,11 (d, J=7,7 Hz, 2 H)

SEC M_w = 13530 g/mol, M_n = 11770 g/mol, IP=1,15

Formulación de nanopartículas:

25 1) Se disuelven 30 mg de PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel (VIII') en 1,5 ml de acetona. La disolución se añade gota a gota en 3 ml de WFI, con agitación (500 rpm durante 20 minutos). Después, la acetona se evapora a 37°C a vacío usando un Rotavapor (desde 300 hasta 45 mbares durante 30 minutos).

El volumen final de la nanodispersión se ajusta entonces a 3 ml, para compensar cualquier pérdida de agua durante la evaporación.

30 Concentración final de la nanodispersión: 10 mg/ml

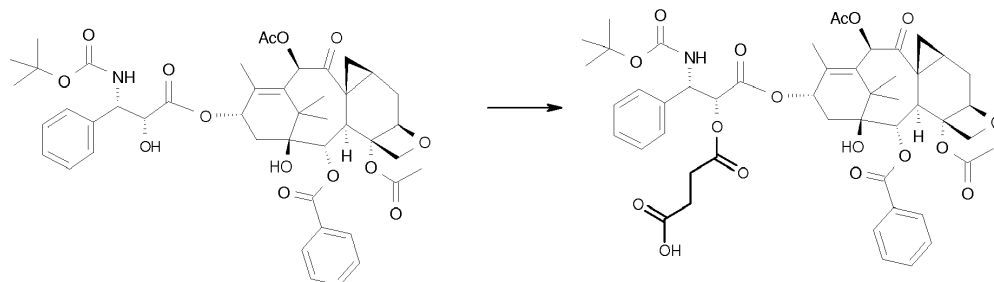
Diámetro medio (usando DLS) = 43 nm, PDI = 0,14

35 2) Se disolvió 1 g de PLA-PEG-Y-succinil cabazitaxel (VIII') en 50 ml de acetona a temperatura ambiente, con agitación. La disolución orgánica se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 μm , y después se introdujo en una jeringa Hamilton de 50 ml. Se disolvieron 0,2 g de Solutol HS15 (hidroxiestearato de Macrogol 15) y 0,04 g de desoxicolato de sodio en 450 ml de WFI, con agitación. Esta disolución acuosa se filtró en un filtro de 0,22 μm . La disolución orgánica se vertió a un caudal de 20 ml/h en la fase acuosa, usando una bomba de jeringa. A fin de obtener una dispersión homogénea, se sumergió un tubo de teflón, conectado a la jeringa, en la fase acuosa. Se obtuvieron entonces nanopartículas de tamaño ≤ 100 nm mediante nanodispersión (tamaño medio de 30 nm, PDI = 0,14), medidas usando Malvern Nanosizer (dispersión de luz cuasi estática).

40 La acetona y algo del agua se eliminaron usando un evaporador giratorio, a vacío, a 37°C. La concentración de la nanodispersión final estuvo entre 10 y 200 mg/g. El tamaño de las nanopartículas permaneció ≤ 100 nm (tamaño medio de 30 nm, para todas las concentraciones). Las partículas más grandes pudieron retirarse mediante filtración sobre 0,45 μm .

Síntesis de mPEG-PLA-succinil-larotaxel (IX)

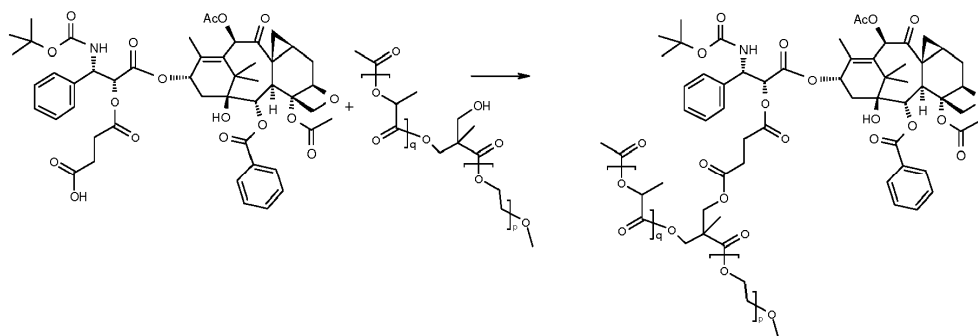
Preparación de succinil-larotaxel



5 En un matraz se añaden, en nitrógeno, 2,36 g (2,72 mmoles) de dihidrato de larotaxel, 47 ml de diclorometano, 2,72 g (27,19 mmoles) de anhídrido succínico y 33 mg (0,27 mmoles) de DMAP. La disolución se calienta a 30°C toda la noche, después se lava dos veces con 47 ml de agua. Tras secar la disolución orgánica con MgSO₄, la disolución se concentra hasta sequedad a 40°C a presión reducida. El extracto seco se trata con 3 volúmenes de éter diisopropílico, y la suspensión se agita durante 2 horas, se filtra, y el sólido se lava dos veces con 2 volúmenes de éter diisopropílico. Tras secar a 40°C a presión reducida, se obtienen 2,28 g de un polvo blanco.

10 Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 1,26 (s, 3 H); 1,28 (s, 3 H); 1,32 (s, 9 H); 1,38 (m, 1 H); 1,68 (m, 1 H); 1,93 (s, 3 H); 2,11 (d, J=15,9 Hz, 1 H); 2,19 (s ancho, 4 H); 2,25 (dd, J=4,8 y 10,3 Hz, 1 H); 2,35 (m, 1 H); 2,38 (s, 3 H); 2,49 (td, J=4,8 y 15,9 Hz, 1 H); 2,61 a 2,82 (m, 4 H); 4,07 (d, J=8,6 Hz, 1 H); 4,12 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 4,31 (d, J=8,6 Hz, 1 H); 4,75 (d ancho, J=4,8 Hz, 1 H); 5,35 a 5,51 (m, 2 H); 5,69 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 6,23 (t ancho, J=9,4 Hz, 1 H); 6,34 (s, 1 H); 7,30 (m, 3 H); 7,39 (t, J=7,8 Hz, 2 H); 7,51 (t, J=7,8 Hz, 2 H); 7,60 (t, J=7,8 Hz, 1 H); 8,16 (d, J=7,8 Hz, 2 H)

Conjugación de succinil-larotaxel con copolímero (VI')



20 En un matraz de 25 ml se añaden, en nitrógeno, 0,2 g de copolímero de mPEG-PLA-Y-OH (VI') (0,0157 mmoles), 31,6 mg (2,2 eq.) de succinil-larotaxel en 4 ml de DCM, y después 100 mg de tamices moleculares activados 4A en polvo. Tras 10 min. de agitación, se añaden 4,4 mg (2,3 eq.) de DMAP y 4,3 mg (2,2 eq.) de DIPC. La suspensión se agita durante 24 h a 35°C, después se filtra (0,22 micrómetros). La fase orgánica se concentra hasta sequedad, y el extracto se trata con 40 ml de metanol y 2 gotas de diclorometano. La suspensión se agita durante 2 h a RT, después se filtra, y el sólido se seca a RT a presión reducida para obtener 174 mg del compuesto esperado.

25 Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 1,22 (m, 3 H); 1,24 (s, 3 H); 1,27 (s, 3 H); 1,29 (s, 9 H); 1,35 a 1,85 (m, 512 H); 1,91 (s ancho, 3 H); 2,08 a 2,75 (m, 9 H); 2,13 (s, 3 H); 2,20 (s, 3 H); 2,41 (s ancho, 3 H); 3,39 (s, 3 H); 3,48 a 3,81 (m, 192 H); 4,02 a 4,39 (m, 8 H); 4,75 (d ancho, J=4,0 Hz, 1 H); 5,01 a 5,33 (m, 169 H); 5,34 (m, 1 H); 5,40 a 5,52 (m, 2 H); 5,68 (d, J=7,6 Hz, 1 H); 6,26 (t ancho, J=9,0 Hz, 1 H); 6,34 (s, 1 H); 7,30 (m, 3 H); 7,39 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,51 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,61 (t, J=7,7 Hz, 1 H); 8,18 (d, J=7,7 Hz, 2 H)

SEC M_w = 14140 g/mol M_n = 11260 g/mol, D = 1,25

30 Formulación de nanopartículas:

Se disuelven 30 mg de PLA-PEG-Y-succinil-larotaxel en 1,5 ml de acetona. La disolución se añade gota a gota en 3 ml de agua para inyección (WFI), con agitación (500 rpm durante 20 minutos). Después, la acetona se evapora a 37°C a vacío usando un Rotavapor.

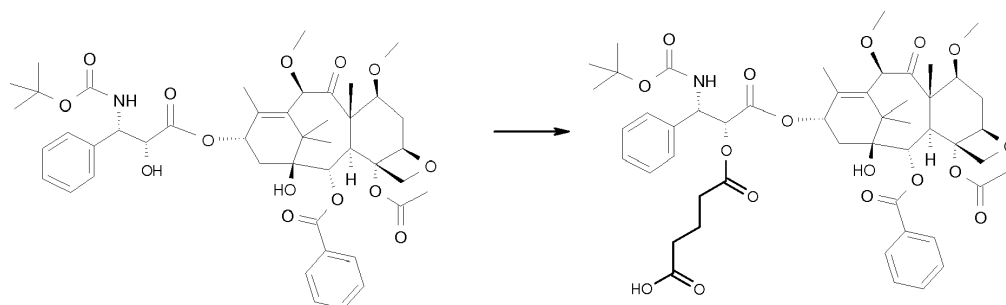
35 El volumen final de la nanodispersión se ajusta entonces a 3 ml, para compensar cualquier pérdida de agua durante la evaporación.

Concentración final de la nanodispersión: 10 mg/ml

Diámetro medio (usando DLS) = 48 nm, PDI = 0,17

Síntesis de mPEG-PLA-glutaril-cabazitaxel (X)

Preparación de glutaril-cabazitaxel



5

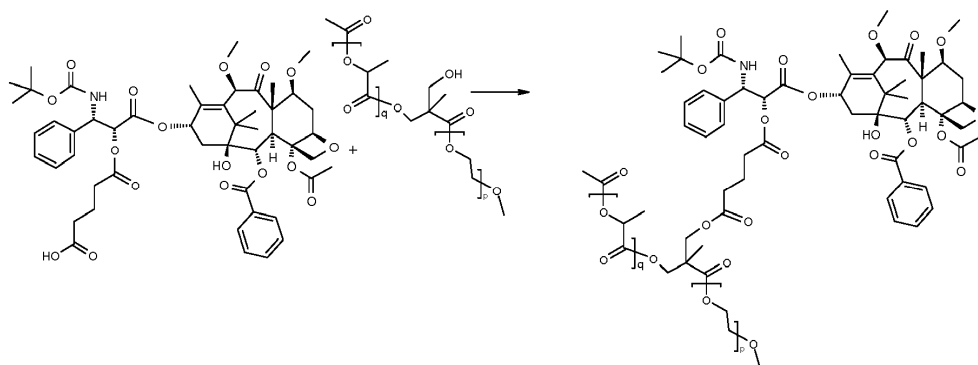
En un matraz de 500 ml se añaden, en nitrógeno, 10 g (11,24 mmoles) de solvato de acetona de cabazitaxel, 200 ml de diclorometano, 13,51 g (112,45 mmoles) de anhídrido glutárico y 0,14 g (1,12 mmoles) de DMAP. La disolución se calienta a 30°C toda la noche, después se lava varias veces con 100 ml de agua. Tras secar la disolución orgánica con MgSO₄, la disolución se concentra hasta sequedad a 40°C a presión reducida. El extracto seco se trata con 10 volúmenes de éter diisopropílico, y la suspensión se filtra, y el sólido se lava dos veces con 2 volúmenes de éter diisopropílico. Tras secar a RT a presión reducida, se obtienen 6,75 g de un polvo blanco.

10

Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 0,97 (s, 3 H); 0,98 (s, 3 H); 1,38 (s, 9 H); 1,50 (m, 5 H); 1,79 (m, 6 H); 2,24 (s, 3 H); 2,28 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 2,46 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 2,66 (m, 1 H); 3,21 (s, 3 H); 3,29 (s, 3 H); 3,59 (d, J=7,1 Hz, 1 H); 3,75 (dd, J=6,6 y 10,7 Hz, 1 H); 4,02 (s, 2 H); 4,47 (s, 1 H); 4,70 (s, 1 H); 4,95 (d ancho, J=10,7 Hz, 1 H); 5,02 a 5,12 (m, 2 H); 5,37 (d, J=7,1 Hz, 1 H); 5,81 (t ancho, J=9,0 Hz, 1 H); 7,18 (t, J=7,7 Hz, 1 H); 7,36 (d, J=7,7 Hz, 2 H); 7,43 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,66 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,74 (t, J=7,7 Hz, 1H); 7,85 (d grande, J=9,1 Hz, 1 H); 7,98 (d, J=7,7 Hz, 2 H); 12,13 (s muy ancho, 1 H).

15

Conjugación de glutaril-cabazitaxel con copolímero (VI')



En un matraz de 25 ml se añaden, en nitrógeno, 0,2 g de copolímero de mPEG-PLA-Y-OH (VI') (0,0157 mmoles), 31,6 mg (2,2 eq) de glutaril-cabazitaxel en 4 ml de DCM, y después 100 mg de tamices moleculares activados 4A en polvo. Tras 10 min. de agitación, se añaden 4,4 mg (2,3 eq.) de DMAP y 4,3 mg (2,2 eq.) de DIPC. La suspensión se agita durante 24 h a 35°C, después se filtra (0,22 micrómetros). La fase orgánica se concentra hasta sequedad, y el extracto se trata con 40 ml de metanol y 2 gotas de diclorometano. La suspensión se agita durante 2 h a RT, después se filtra, y el sólido se seca a RT a presión reducida para obtener 170 mg del compuesto esperado.

20

Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 1,21 (s, 3 H); 1,22 (s, 3 H); 1,25 (m, 3 H); 1,35 (s, 9 H); 1,40 a 1,70 (m, 452 H); 1,72 (s, 3 H); 1,80 (m, 1 H); 1,87 (m, 2 H); 2,00 (s, 3 H); 2,13 (s, 3 H); 2,15 a 2,51 (m, 6 H); 2,45 (s ancho, 3 H); 2,71 (m, 1 H); 3,32 (s, 3 H); 3,39 (s, 3 H); 3,45 (s, 3 H); 3,48 a 3,81 (m, 172 H); 3,86 (d, J=7,3 Hz, 1 H); 3,91 (dd, J=6,3 y 11,0 Hz, 1 H); 4,10 a 4,40 (m, 8 H); 4,83 (s, 1 H); 5,00 (d, J=10,7 Hz, 1 H); 5,01 a 5,33 (m, 152 H); 5,35 (m, 1 H); 5,44 a 5,63 (m, 2 H); 5,66 (d, J=7,3 Hz, 1 H); 6,27 (t ancho, J=9,0 Hz, 1 H); 7,32 (m, 3 H); 7,40 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,50 (t, J=7,7 Hz, 2 H); 7,61 (t, J=7,7 Hz, 1 H); 8,12 (d, J=7,7 Hz, 2 H)

30

SEC M_w = 14140 g/mol M_n = 11210 g/mol, D = 1,26

Formulación de nanopartículas:

Se disuelven 30 mg de PLA-PEG-Y-glutaril-cabazitaxel en 1,5 ml de acetona. La disolución se añade gota a gota en 3 ml de WFI, con agitación (500 rpm durante 20 minutos). Después, la acetona se evapora a 37°C a vacío usando un Rotavapor.

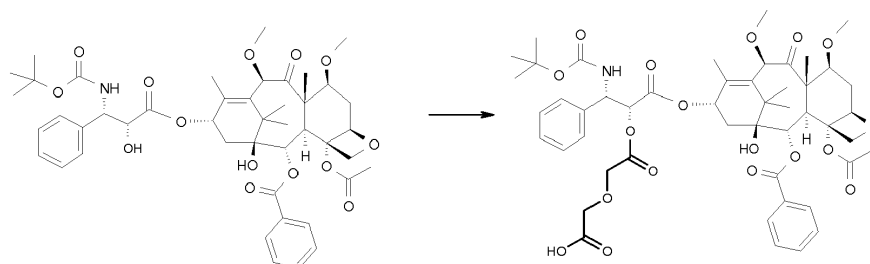
5 El volumen final de la nanodispersión se ajusta entonces a 3 ml, para compensar cualquier pérdida de agua durante la evaporación.

Concentración final de la nanodispersión: 10 mg/ml

Diámetro medio (usando DLS) = 60 nm, PDI = 0,21

Síntesis de mPEG-PLA-diglicolil-cabazitaxel (XI)

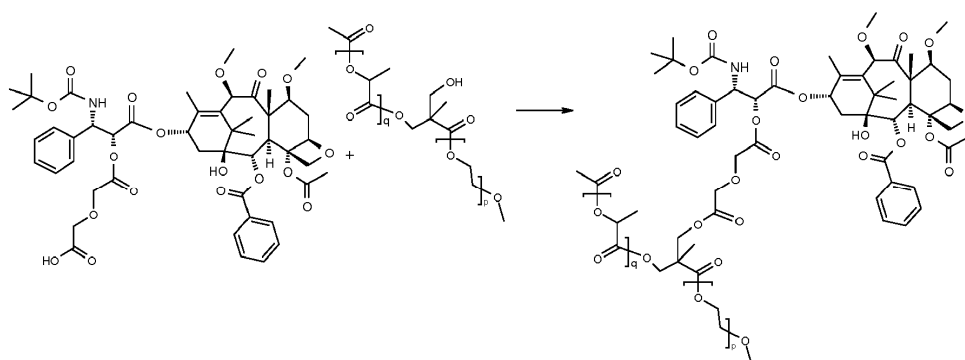
Preparación de diglicolil-cabazitaxel



10 En un matraz de 250 ml se añaden, en nitrógeno, 5 g (5,62 mmoles) de solvato de acetona de cabazitaxel, 100 ml de diclorometano, 6,53 g (56,22 mmoles) de anhídrido diglicólico y 0,107 (0,56 mmoles) de DMAP. La disolución se calienta a 22°C toda la noche, después se lava dos veces con 50 ml de agua. Tras secar la disolución orgánica con MgSO₄, la disolución se concentra hasta sequedad a 40°C a presión reducida. El extracto seco se trata con 4 volúmenes de éter diisopropílico, y la suspensión se agita durante 30 minutos, después se filtra, y el sólido se lava dos veces con 2 volúmenes de éter diisopropílico. Tras secar a 40°C a presión reducida, se obtienen 5,04 g de un polvo blanco.

20 Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 0,96 (s, 3 H); 0,98 (s, 3 H); 1,37 (m, 9 H); 1,44 a 1,58 (m, 2 H); 1,51 (s, 3 H); 1,80 (s ancho, 4 H); 2,23 (s, 3 H); 2,67 (m, 1 H); 3,21 (s, 3 H); 3,28 (s, 3 H); 3,58 (d, J=7,3 Hz, 1 H); 3,75 (dd, J=6,8 y 10,5 Hz, 1 H); 4,02 (s, 2 H); 4,13 (s, 2 H); 4,31 (d, J=17,0 Hz, 1 H); 4,38 (d, J=17,0 Hz, 1 H); 4,51 (s, 1 H); 4,70 (s, 1 H); 4,95 (d, J=10,5 Hz, 1 H); 5,06 (m, 1 H); 5,16 (d, J=8,5 Hz, 1 H); 5,37 (d, J=7,3 Hz, 1 H); 5,82 (t ancho, J=9,4 Hz, 1 H); 7,19 (t, J=7,8 Hz, 1 H); 7,36 (d, J=7,8 Hz, 2 H); 7,43 (t, J=7,8 Hz, 2 H); 7,66 (t, J=7,8 Hz, 2 H); 7,73 (t, J=7,8 Hz, 1 H); 7,88 (d, J=9,3 Hz, 1 H); 7,97 (d, J=7,8 Hz, 2 H); 12,78 (s muy ancho, 1 H)

Conjugación de diglicolil-cabazitaxel con copolímero (VI')



25 En un matraz de 25 ml se añaden, en nitrógeno, 0,2 g de copolímero mPEG-PLA-Y-OH (VI') (0,0157 mmoles), 32,3 mg (2,2 eq.) de diglicolil-cabazitaxel en 4 ml de DCM, después 100 mg de tamices moleculares activados 4A en polvo. Tras 10 min. de agitación, se añaden 4,4 mg (2,3 eq.) de DMAP y 4,3 mg (2,2 eq.) de DIPC. La suspensión se agita durante 24 h a 35°C, después se filtra (0,22 micrómetros). La fase orgánica se concentra hasta sequedad, y el extracto se trata con 40 ml de metanol y 2 gotas de diclorometano. La suspensión se agita durante 2 h a RT, después se filtra, y el sólido se seca a RT a presión reducida para obtener 184 mg del compuesto esperado.

30 Espectro de RMN ¹H (500 MHz, δ en ppm, CDCl₃-d): 1,21 (s, 3 H); 1,22 (s, 3 H); 1,26 (m, 3 H); 1,35 (s, 9 H); 1,40 a 1,70 (m, 486 H); 1,72 (s, 3 H); 1,80 (m, 1 H); 2,01 (s ancho, 3 H); 2,13 (s, 3 H); 2,21 (m, 1 H); 2,32 (m, 1 H); 2,45 (s ancho, 3 H); 2,71 (m, 1 H); 3,31 (s, 3 H); 3,38 (s, 3 H); 3,45 (s, 3 H); 3,48 a 3,81 (m, 180 H); 3,86 (d, J=7,3 Hz, 1 H); 3,91 (dd, J=6,6 y 11,0 Hz, 1 H); 4,08 a 4,40 (m, 8 H); 4,83 (s, 1 H); 5,02 (d, J=10,7 Hz, 1 H); 5,03 a 5,33 (m, 162 H);

5,40 a 5,57 (m, 3 H); 5,67 (d, $J=7,3$ Hz, 1 H); 6,29 (t ancho, $J=9,0$ Hz, 1 H); 7,31 (m, 3 H); 7,40 (t, $J=7,7$ Hz, 2 H); 7,50 (t, $J=7,7$ Hz, 2 H); 7,60 (t, $J=7,7$ Hz, 1 H); 8,11 (d, $J=7,7$ Hz, 2 H)

SEC $M_w = 14830$ g/mol, $M_n = 11920$ g/mol, $D = 1,24$

Formulación de nanopartículas:

- 5 Se disuelven 30 mg de PLA-PEG-Y-diglicolil-cabazitaxel en 1,5 ml de acetona. La disolución se añade gota a gota en 3 ml de WFI, con agitación (500 rpm durante 20 minutos). Después, la acetona se evapora a 37°C a vacío usando un Rotavapor (desde 300 a 45 mbares durante 30 minutos).

El volumen final de la nanodispersión se ajusta entonces a 3 ml, para compensar cualquier pérdida de agua durante la evaporación.

- 10 Concentración final de la nanodispersión: 10 mg/ml

Diámetro medio (usando DLS) = 52 nm, PDI = 0,18

Estudios de liberación *in vitro* de formulaciones de nanopartículas de conjugados de cabazitaxel

- 15 La cinética de liberación *in vitro* de cabazitaxel libre a partir de las tres formulaciones de nanopartículas de conjugados de cabazitaxel, es decir, PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel, PEG-Y-glutaril-cabazitaxel, y PLA-PEG-Y-diglicolil-cabazitaxel se ha evaluado en plasma (amortiguada previamente con un amortiguador de fosfato 500 mM hasta una concentración final de 10 mM en plasma) obtenido de rata Sprague Dawley, usando una técnica de cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC). A los viales que contienen alícuotas de plasma, se han añadido formulaciones estándar de nanopartículas de cabazitaxel o de conjugados de cabazitaxel (1 mg/ml) usando una micropipeta para lograr un volumen final de 800 μ l. Los viales se colocan entonces a 37°C en un agitador
- 20 (velocidad de agitación 250 rpm). El análisis de las muestras se llevó a cabo a 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 16 h y 24 h.

En cada intervalo de tiempo, se recogen 100 μ l de muestra en un vial que contiene 0,3 ml de acetonitrilo:agua 85:15 v/v, y se agita durante 5 min. para permitir la precipitación de proteínas y la extracción de cabazitaxel libre. Los contenidos se sometieron entonces a centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min., y el sobrenadante transparente se recogió y se sometió a cuantificación usando HPLC.

- 25 Las condiciones de HPLC empleadas fueron como sigue:

Columna: 150 mm Zorbax SB-Fenil 3,5 μ m

Caudal: 1 ml/min.; la temperatura de la columna fue 30°C

Modo de detección dual de radiación ultravioleta (UV) a 230 nm (principal usada para titulación) y 210 nm

Fase móvil isocrática: acetonitrilo 60%/agua 40%/ácido trifluoroacético 0,006%

- 30 Tiempo de retención para cabazitaxel = 4,1 min.

Los resultados se resumen en la tabla a continuación:

Tabla: Datos *in vitro* de formulaciones de nanopartículas de conjugados de cabazitaxel (es decir, PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel, PLA-PEG-Y-glutaril-cabazitaxel, y PLA-PEG-Y-diglicolil-cabazitaxel) en plasma de rata

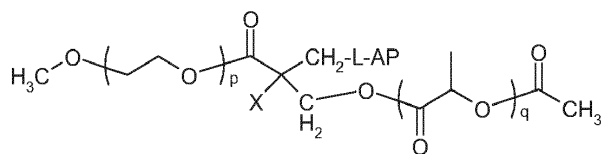
Tiempo (h)	PLA-PEG-Y-succ-cbz NPs	PLA-PEG-Y-glutaril-cbz NPs	PLA-PEG-Y-diglicolil-cbz NPs
0	0	0	2,20
1	0,84	1,31	5,36
2	1,68	2,30	8,67
4	3,30	5,29	14,81
18	17,35	23,51	49,39
24	20,16	31,72	55,09

- 35 Los estudios de liberación *in vitro* en plasma de rata han revelado que todas las formulaciones de conjugados de cabazitaxel mostraron un perfil de liberación sostenida del fármaco, y los conjugados sintetizados usando diferentes enlazadores han dado como resultado diferentes perfiles de liberación (Figura 3). El conjugado que contiene el enlazador succinilo ha mostrado el perfil de liberación más lenta (~17% de cabazitaxel libre liberado en 24 h), seguido del conjugado que contiene el enlazador glutarilo (~27% de cabazitaxel libre liberado en 24 h), mientras que
- 40 se observó una liberación relativamente rápida en el caso del conjugado que contiene el enlazador diglicolilo (~47% de cabazitaxel libre liberado en 24 h). Particularmente, en el caso de PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel, la liberación de succinil-cabazitaxel se ha cuantificado usando HPLC. Los resultados revelaron la liberación de una concentración despreciable de succinil-cabazitaxel (<1% de cabazitaxel presente inicialmente en las nanopartículas) a partir de la formulación. En general, el orden de la liberación del fármaco fue como sigue: nanopartículas de PLA-PEG-Y-

diglicolil-cabazitaxel > PLA-PEG-Y-glutaril-cabazitaxel > PLA-PEG-Y-succinil-cabazitaxel. Estos resultados indican que los conjugados de cabazitaxel con diferentes enlazadores permiten diferentes perfiles de liberación *in vitro*.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de un principio activo y de un copolímero de polietilenglicol y poliácido láctico de fórmula (Ia):



(Ia),

en la que:

- 5 - p está comprendido entre 1 y 340;
 - q está comprendido entre 10 y 700;
 - AP es un resto de principio activo;
 - L es un enlazador,
 10 - X es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de átomos de halógeno, grupos OR, CN, CF₃, NRR' y COOR, en los que R y R', que son idénticos o diferentes entre sí, son un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo,

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Conjugado según la reivindicación 1, de manera que el resto AP está enlazado a L por medio de un grupo OH presente en el AP.

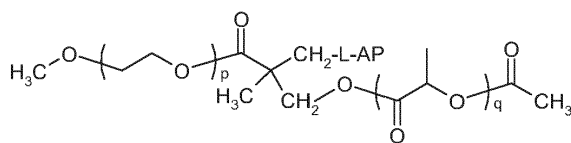
15 3. Conjugado según la reivindicación 1 o 2, de manera que el mencionado AP es un taxoide.

4. Conjugado según la reivindicación 3, de manera que el mencionado taxoide se selecciona de paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel y larotaxel.

5. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que el mencionado principio activo de cabazitaxel, injertado en la posición 2'.

20 6. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que el mencionado PLA exhibe, en su extremo hidroxilo libre opcionalmente restante, un grupo protector.

7. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que corresponde a la siguiente fórmula (Ib):

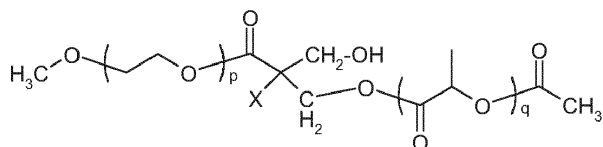


(Ib)

en la que L, p, q, y AP son como se definen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

25 8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que L representa un derivado de dicarboxilato de ácido succínico, ácido glutárico o ácido diglicólico.

9. Procedimiento para la preparación de un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende acoplar un compuesto de fórmula (IIIa):



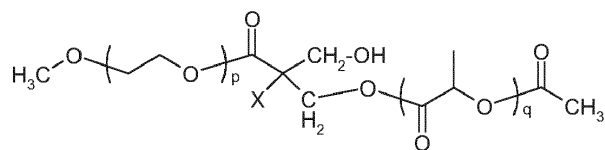
(IIIa)

30 con un derivado del mencionado principio activo que corresponde a la fórmula:



en la que p, q, X, AP y L se definen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Compuesto de fórmula (IIIa):

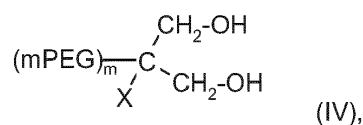


(IIIa)

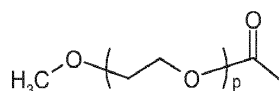
en la que p, q, y X se definen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5 11. Procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (IIIa) según la reivindicación 10, que comprende:

1. la etapa de monoproteger selectivamente un grupo hidroxilo del compuesto de fórmula (IV):

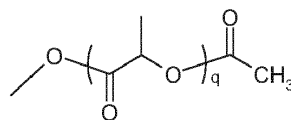


en la que (mPEG)_m representa:



10 por medio de un grupo protector apropiado,

2. el acoplamiento del compuesto monoprotegido así obtenido con un precursor de fórmula:

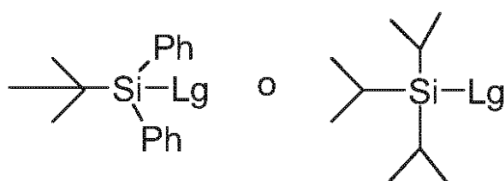


y

3. la desprotección del grupo protector introducido durante la etapa 1,

15 en las que p, q y X se definen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, de manera que la monoprotección se lleva a cabo por medio de



en los que Lg representa un grupo saliente, tal como un átomo de halógeno o un grupo trifluorometanosulfonato.

20 13. Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, de manera que la etapa 2 se lleva a cabo mediante polimerización de apertura del anillo (ROP) por medio del precursor 3,6-dimetil-[1,4]-dioxano-2,5-diona.

14. Nanopartículas que comprenden un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

16. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento y/o prevención de cánceres.

25

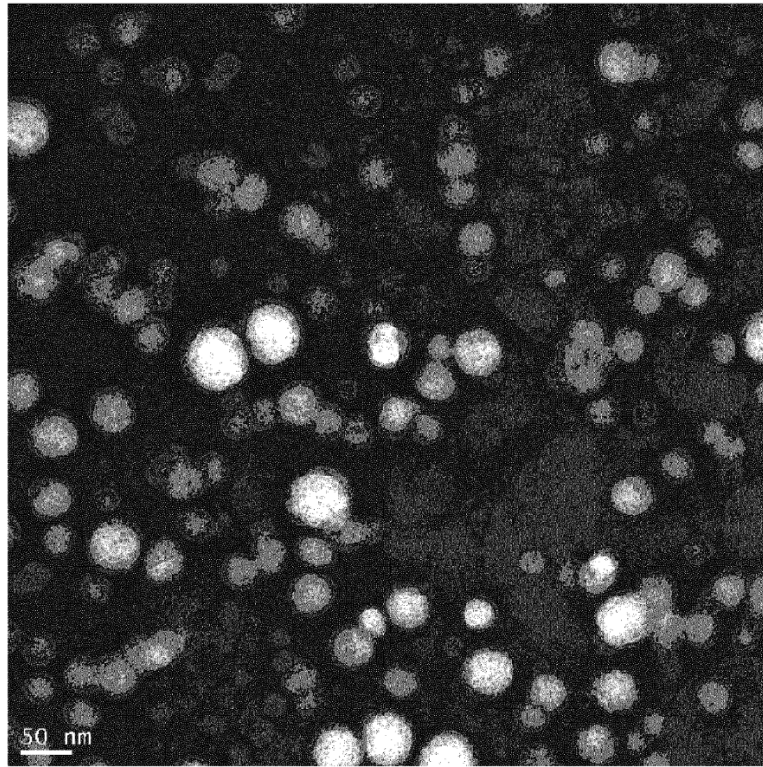


FIG.1

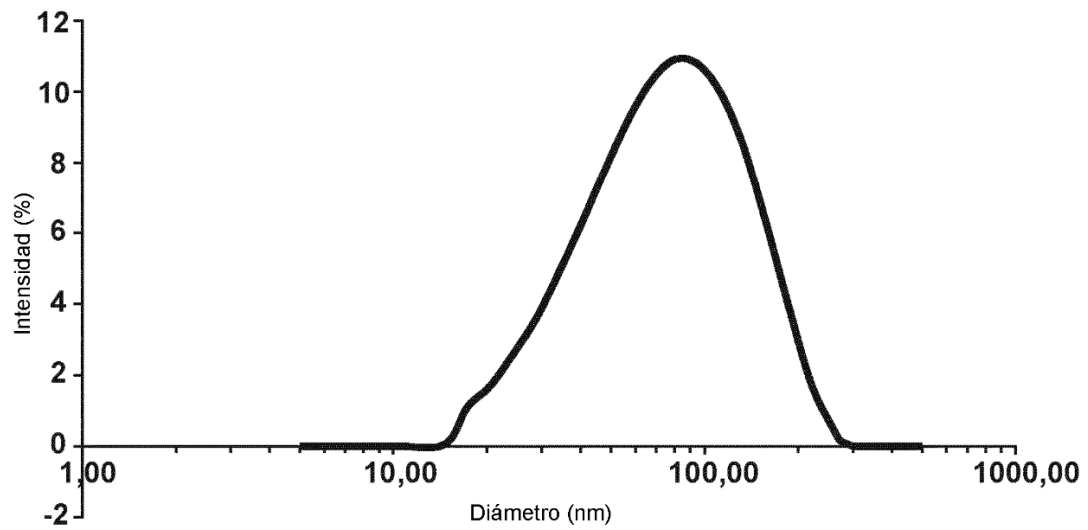


FIG.2

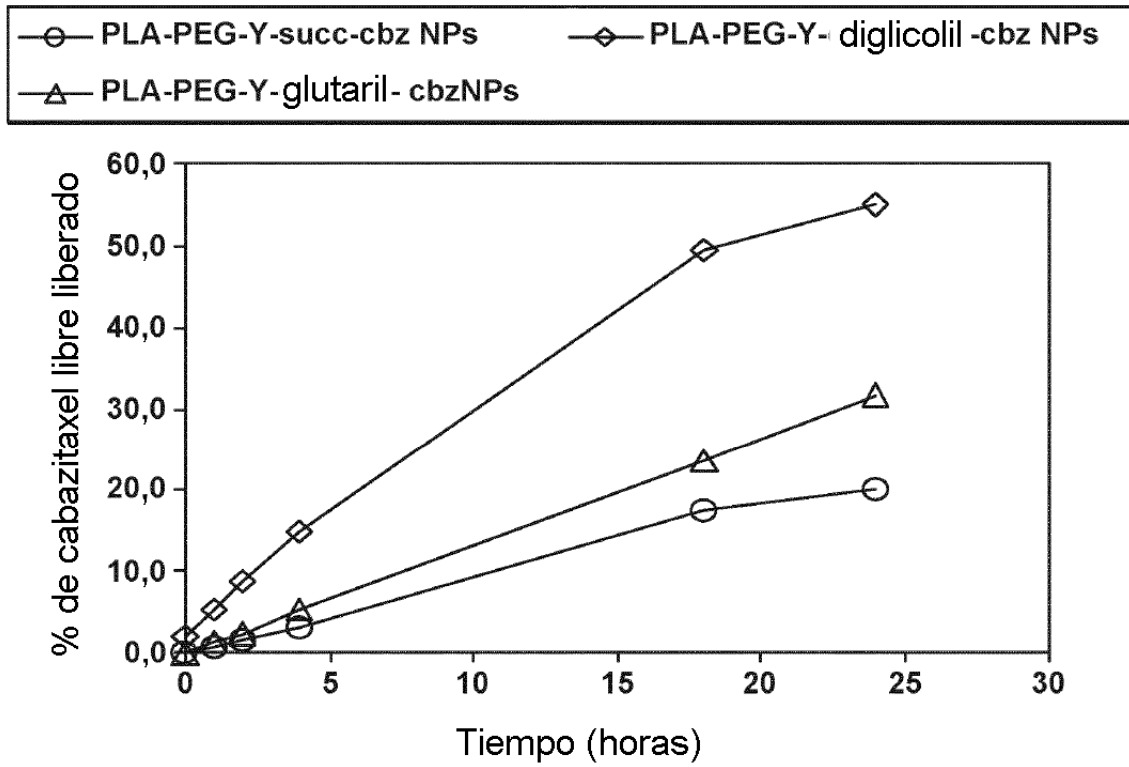


FIG.3