

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 481**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2009 PCT/IB2009/006532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09141738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 09750195 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2282724**

54 Título: **Fármacos modificados para su uso en nanopartículas liposomales**

30 Prioridad:

23.05.2008 US 55929 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
(100.0%)
University-Industry Liaison Office, 103-6190
Agronomy Road
Vancouver, BC V6T 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**CULLIS, PIETER;
BALLY, MARCEL;
CIUFOLINI, MARCO;
MAURER, NORBERT y
JIGALTSEV, IGOR**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 694 481 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

Fármacos modificados para su uso en nanopartículas liposomales5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a métodos de modificación química de fármacos que son resistentes o no susceptibles de ser encapsulados en liposomas para formar derivados que pueden cargarse eficazmente en nanopartículas liposomales (NL) que presentan un pH transmembrana o un gradiente de iones. En algunos aspectos preferidos, los derivados son profármacos que se convierten fácilmente en el fármaco libre al ser liberados de la NL. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tales derivados.

Antecedentes

15 Muchas estrategias de descubrimiento de fármacos existentes se basan en la búsqueda de compuestos "aptos para fármacos" que son solubles en agua y biodisponibles. Como resultado, los compuestos recientemente descubiertos con escasa solubilidad y biodisponibilidad limitada rara vez avanzan al estado de líder, a menudo a pesar de tener propiedades terapéuticas prometedoras.

20 Se ha desarrollado una variedad de formulaciones de fármacos y métodos de administración en un esfuerzo por superar las limitaciones de los compuestos no aptos para fármacos. Las nanopartículas liposomales (NL) son un sistema de administración de fármacos líder para la administración sistémica (intravenosa) de fármacos, y actualmente existen varios fármacos liposomales en el mercado y en ensayos clínicos. Las NL generalmente tienen baja toxicidad y se pueden diseñar para proporcionar una amplia gama de propiedades farmacéuticas beneficiosas, tales como una mejor semivida en suero, biodisponibilidad, permeabilidad y similares. Las formulaciones de NL han sido particularmente exitosas en relación con los agentes quimioterapéuticos, que tienen una eficacia limitada cuando se administran en su forma convencional (libre) debido a su baja solubilidad en agua, corta semivida en suero y acumulación indiscriminada en tejidos normales y con enfermedad por igual.

30 Las NL de largo tiempo en circulación típicamente tienen diámetros de aproximadamente 100 nm o menos, y permanecen en la circulación sanguínea durante largos períodos de tiempo. La vida útil prolongada de la NL de largo tiempo en circulación les permite acumularse en o cerca de los sitios de infección, inflamación, crecimiento del tumor y otras dianas farmacológicas asociadas a la enfermedad. Esta acumulación se ve facilitada por la estructura local de la vasculatura en estas regiones (denominada vasculatura "permeable"), caracterizada por grandes poros a través de los cuales los liposomas pueden alcanzar las dianas terapéuticas (Jain, *Microcirculation*, 4: 1-23 (1997), Hobbs et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 95: 4607-4612 (1998)). La asociación estable de un agente quimioterapéutico u otro fármaco con NL de larga circulación puede aumentar la cantidad de fármaco que alcanza las dianas terapéuticas, prolongar la exposición de las dianas a niveles terapéuticos del fármaco a través de la liberación controlada (sostenida) de la NL, y reducir la acumulación en tejidos sanos y no elegidos como diana, lo que aumenta la eficacia y reduce la toxicidad. En el caso de tumores sólidos, las formulaciones de NL de agentes quimioterapéuticos han producido mejoras drásticas en el índice terapéutico, la tolerabilidad, la eficacia y otras propiedades, tanto en modelos animales como en estudios clínicos.

45 La aplicación de la tecnología de NL a un fármaco de interés requiere que el fármaco sea susceptible de ser cargado en un portador liposomal y liberado a una velocidad apropiada en o cerca de las dianas terapéuticas. La capacidad de cargar un fármaco en los liposomas depende de las propiedades químicas del fármaco, la membrana liposomal y el entorno interior del liposoma. En general, tanto los fármacos solubles en agua como los solubles en lípidos se pueden cargar en liposomas utilizando técnicas de carga pasiva que dependen de la asociación de los fármacos solubles en agua con los fosfolípidos polares que recubren la membrana liposomal interna y/o el interior liposomal acuoso, y la asociación de los fármacos solubles en lípidos con la bicapa lipídica. Sin embargo, muchos fármacos útiles tienen perfiles de solubilidad más complejos que son menos propicios a los métodos de carga pasiva.

Un enfoque para cargar fármacos poco solubles en liposomas es modificar el fármaco para facilitar la carga pasiva. Por ejemplo, se han desarrollado formulaciones liposomales en las que los taxanos se modifican mediante la adición de una cadena hidrocarbonada que contiene un "grupo promotor de hidrólisis" (HPG) electronegativo para formar derivados de ácidos grasos con solubilidad mejorada en la bicapa lipídica, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.482.850 y solicitudes relacionadas. Sin embargo, los métodos de carga pasiva generalmente tienen malas eficacias de carga y producen liposomas con escasa retención y liberación de fármacos, lo que limita la utilidad de las formulaciones resultantes.

60 Para superar las limitaciones relacionadas con la carga pasiva, se han desarrollado varias técnicas de carga activa que permiten que los fármacos se carguen con alta eficacia y retención. Un enfoque particularmente eficaz implica la carga de fármacos que son bases débiles formando un gradiente de pH a través de la membrana liposomal para producir liposomas con un interior liposomal ácido y un ambiente exterior con un pH más alto que el interior del

liposoma (p.ej., pH neutro) (p.ej., Maurer, N., Fenske, D., and Cullis, P.R. (2001) Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opinion in Biological Therapy* 1, 923-47; Cullis et al., *Biochim Biophys Acta.*, 1331: 187-211 (1997); Fenske et al., *Liposomes: A practical approach*. Segunda Edición. V. Torchilin and V. Weissig, eds., Oxford University Press, p. 167-191 (2001)). Los fármacos débilmente alcalinos pueden existir en dos formas coexistentes (equilibrio); una forma de carga neutra (permeable a la membrana) y una forma cargada/protonada (impermeable a la membrana). La forma neutra del fármaco tenderá a difundirse a través de la membrana del liposoma hasta que las concentraciones interiores y exteriores sean iguales. Sin embargo, un ambiente interior ácido produce una protonación de la forma neutra, lo que impulsa la captación continua del compuesto que lo atrapa en el interior del liposoma. Otro enfoque implica el uso de gradientes de iones metálicos (p.ej., Cheung BC, Sun TH, Leenhouts JM, Cullis PR: Loading of doxorubicin into liposomes by forming Mn²⁺-drug complexes. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1414:205-216). La concentración de iones metálicos es alta en el interior del liposoma; el entorno exterior está libre de iones metálicos. Este método de carga se basa en los mismos principios básicos que la técnica de gradiente de pH. La forma neutra del fármaco de base débil puede penetrar a través de la membrana y se retiene en el interior acuoso de los liposomas a través de la formación de un complejo de fármaco-iones metálicos. En este caso, la formación del complejo de fármaco-iones metálicos impulsa la absorción continua del fármaco.

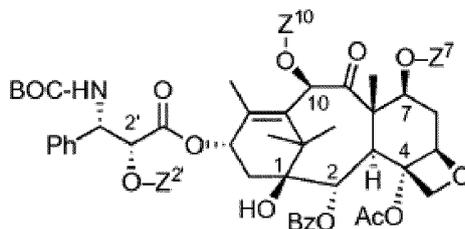
Algunos fármacos contra el cáncer y antimicrobianos, tales como vincristina, vinorelbina, doxorubicina, ciprofloxacina y norfloxacina, se pueden cargar fácilmente y mantener de forma estable en la NL utilizando técnicas de carga activa con gradiente de pH (p.ej., Drummond et al., *Pharmacol. Rev.*, 51: 691-743 (1999), Cullis et al., *Biochim Biophys Acta.*, 1331: 187-211 (1997); Semple et al., *J. Pharm. Sci.*, 94 (5): 1024-38 (2005)). Sin embargo, una serie de fármacos clínicamente importantes no son bases débiles y, por lo tanto, no son susceptibles de tales técnicas de carga activa (p.ej., Soepenberget al., *European J. Cancer*, 40: 681-688 (2004)). Por ejemplo, muchos fármacos contra el cáncer, incluidos ciertos fármacos basados en taxanos (p.ej., paclitaxel y docetaxel), y derivados de podofilotoxina (p.ej., etopósido) no pueden formularse fácilmente como NL usando métodos convencionales.

Taxotere® (docetaxel) y Taxol® (paclitaxel) son los fármacos contra el cáncer más recetados en el mercado, y están asociados con una serie de problemas farmacológicos y toxicológicos, entre ellos farmacocinética altamente variable (docetaxel) y no lineal (paclitaxel), reacciones de hipersensibilidad grave asociadas con el vehículo de formulación (Cremophor EL, Tween 80) y mielosupresión y neurotoxicidad limitantes de la dosis. En el caso de Taxotere®, la gran variabilidad en la farmacocinética causa una variabilidad significativa en la toxicidad y la eficacia, así como la toxicidad hematológica relacionada con la exposición sistémica al fármaco no unido. Además, dado que la actividad terapéutica de los taxanos aumenta con la duración de la exposición al fármaco de las células tumorales, la toxicidad limitante de la dosis de las formulaciones de taxanos comerciales limita sustancialmente su potencial terapéutico. El documento US 4.960.790 describe derivados de taxol y composiciones farmacéuticas de los mismos.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de estrategias para permitir que se formule una amplia variedad de fármacos en forma de NL y, de este modo, obtener los beneficios de la tecnología de administración liposomal.

Compendio

En un aspecto, se proporciona un derivado de fármaco, que es un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde los grupos Z conectados a los átomos de oxígeno C-2', C-7 y/o C-10 son, independientemente, H, o un grupo de fórmula IIA:



Fórmula IIA

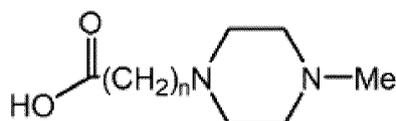
en donde

la línea ondulada representa el enlace que conecta la fórmula IIA con los átomos de oxígeno C-2', C-7 y/o C-10;

[N] es N-metil-piperazino, siempre que al menos un Z sea un grupo de la fórmula IIA; y
[S] es un Espaciador seleccionado de:

- 5
- (a) una cadena del tipo $(CH_2)_n$, donde n puede variar de 1 a 10, o
- 10 (b) un derivado del anterior $(CH_2)_n$ donde uno o más átomos de H se reemplazan por: un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene de 1 a 10 átomos de C, un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, un átomo de halógeno; o
- 15 (c) un derivado del anterior $(CH_2)_n$ donde uno o mas CH_2 se reemplazan por: un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, una estructura anular que consta de 3 a 10 átomos de carbono e incorpora facultativamente uno o más heteroátomos tales como N, O, S, Si, o halógeno, así como múltiples enlaces entre pares de átomos; o
- 20 (d) un derivado del anterior $(CH_2)_n$ donde uno o más pares de átomos de C adyacentes comparten un enlace doble de geometría E o Z, o un enlace triple.

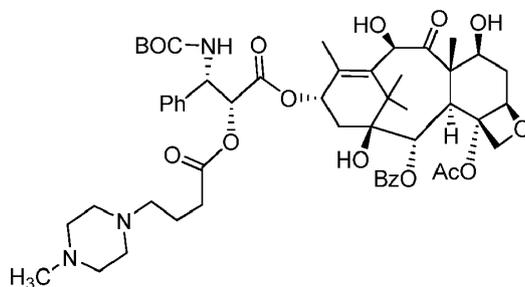
En una realización del compuesto descrito anteriormente, Z es



donde n está entre 1 y 10.

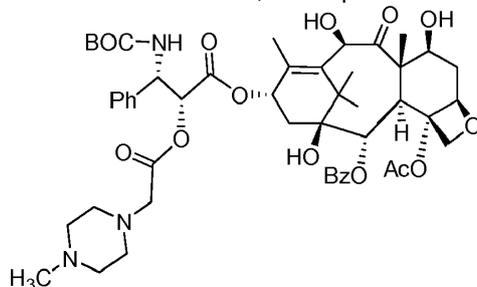
En una realización del compuesto descrito anteriormente, n está entre 1 y 4.

En una realización del compuesto descrito anteriormente, el compuesto tiene la fórmula:



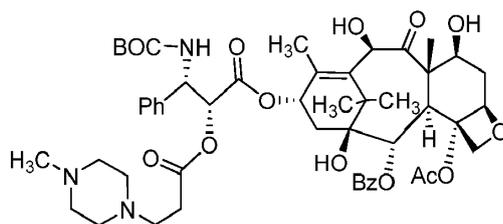
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización del compuesto descrito anteriormente, el compuesto tiene la fórmula:



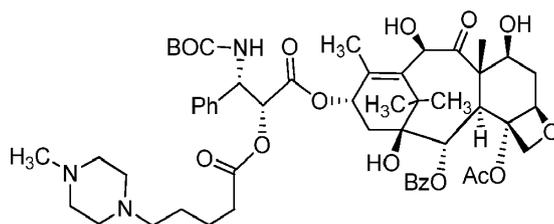
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización del compuesto descrito anteriormente, el compuesto tiene la fórmula:



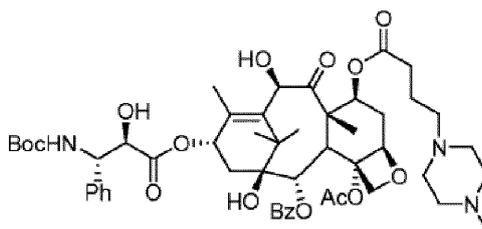
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En una realización del compuesto descrito anteriormente, el compuesto tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una realización del compuesto descrito anteriormente, el compuesto tiene la fórmula:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende un compuesto como se describe anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización de la composición descrita anteriormente, el portador farmacéuticamente aceptable comprende un liposoma.

El derivado de fármaco es adecuado para cargarse activamente en nanopartículas liposomales que tienen un interior acuoso.

25 El derivado de fármaco es adecuado para cargarse activamente en el interior acuoso de las nanopartículas liposomales. El interior acuoso de las nanopartículas liposomales puede tener un pH ácido con respecto al medio externo. El derivado de fármaco se puede protonar dentro del interior acuoso de las nanopartículas liposomales.

30 El derivado de fármaco puede residir en el interior acuoso de las nanopartículas liposomales.

Una composición farmacéutica puede comprender una formulación liposomal de nanopartículas del derivado de fármaco proporcionado en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 El derivado de fármaco puede cargarse activamente de manera que resida dentro o esté asociado de manera estable con la membrana liposomal de nanopartículas.

La composición farmacéutica puede ser útil para tratar una enfermedad o afección, en donde se administra en una cantidad eficaz a un paciente que necesita tratamiento.

40 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Cinética de la hidrólisis del profármaco en tampón acuoso de pH 7,4 y plasma de ratón tamponado con fosfato (pH 7,4) a 37°C.

Figura 2. Carga de derivados de docetaxel en NL. Los derivados se cargaron mediante incubación a 60°C en NL de DSPC/col a través de un gradiente de pH (ion amonio) formado por sulfato de amonio 300 mM dentro de NL y un medio externo sin sulfato de amonio tamponado a pH 5. (A) Eficacia de carga del profármaco de docetaxel TD1 en proporciones de profármaco a lípido de 0,1 peso/peso (■), 0,2 peso/peso (◆) y 0,4 peso/peso (▲). (B) Eficacia de carga de C-2'-piperazinil éster (TD1-TD3), C-2'-piperidin éster (TD7) y C-7-aminoéster (TD10) de docetaxel incubado con NL de DSPC/Col a una razón de profármaco a lípido de 0,2 peso/peso.

Figura 3. Carga de derivados de prednisona comparativos en NL. Los derivados se cargaron a 60°C en NL de DSPC/Col a través de un gradiente de pH (ion amónico) formado por sulfato de amonio 300 mM dentro de NL y un medio externo libre de sulfato de amonio tamponado a pH 5. (A): Eficacia de carga de un derivado éster del ácido N-metil-piperazinil butanoico de prednisona (◆) con respecto al fármaco original (■) en una razón de fármaco a lípido de 0,12 peso/peso. El derivado de prednisona no se dividió espontáneamente en la bicapa de la NL; por lo tanto, no hubo una cantidad medible del derivado asociado con el portador NL en ausencia del gradiente de sulfato de amonio (pH). (B): Eficacias de carga de derivados de prednisona con longitudes de enlace variables después de 15 minutos de incubación a 60°C: comparación de éster de ácido N-metil-piperazinil butanoico (B) y derivados éster de ácido N-metil-piperazinil acético (E). El derivado éster de ácido N-metil-piperazinil butanoico mostró 100% de eficacia de carga, mientras que el derivado éster de ácido N-metil-piperazinil acético mostró aproximadamente 75% de eficacia de carga.

Figura 4. Carga de un derivado etopósido comparativo en NL. El derivado éster de ácido N-metil-piperazinil butanoico se cargó a 60°C en NL de DMPC/Col a través de un gradiente de pH (ion amónico) formado por sulfato amónico 300 mM dentro de NL y un medio externo libre de sulfato amónico tamponado a pH 5. El derivado mostró una eficacia de carga de 100% en el plazo de 15 minutos después de la incubación a 60°C con una razón de fármaco a lípido de 0,16 peso/peso.

Figura 5. Estabilidad de la formulación. La estabilidad de las formulaciones derivadas de NL-docetaxel con diferentes composiciones lipídicas (DSPC/Col, DPPC/Col y DMPC/Col) se siguió durante un período de 4 meses tras el almacenamiento en frío (7°C). Las razones de profármaco a lípido de las formulaciones fueron de 0,2 peso/peso. (A) hidrólisis del profármaco; el aumento del fármaco original (docetaxel) se determinó mediante UHPLC, (B) porcentaje del profármaco retenido en NL, (C) tamaño de NL y polidispersidad medida mediante dispersión dinámica de la luz.

Figura 6. Perfiles de eliminación de plasma de Taxotere™ (▲), TD1 formulado de la misma manera que Taxotere™ (etanol/polisorbato 80/solución salina fisiológica) (■) y formulación de NL de DSPC/Col de TD1 (razón de profármaco a lípido 0,2 (peso/peso)) (◆) después de la administración iv en ratones. A los ratones Swiss Webster hembra se les inyectó por vía intravenosa una dosis única de las diversas formulaciones a dosis de docetaxel equimolares (20 mg/kg de docetaxel). Los niveles de profármacos en plasma se determinaron mediante UHPLC-MS. Los puntos de datos representan valores medios ± desviación típica de cada grupo de ratones (n = 4).

Figura 7. Perfiles de retención de fármacos en plasma. Se determinó la retención del derivado de docetaxel TD1 en formulaciones de NL de DSPC/Col (◆), DPPC/Col (■) y DMPC/Col (A) *in vitro* (A) e *in vivo* (B). La retención *in vitro* de TD1 en NL de DSPC/col se comparó con otros derivados de docetaxel (TD2-3 y TD7) formulados en NL de DSPC/col en la misma razón de fármaco a lípido en plasma de ratón (C). Las formulaciones de NL que contenían cantidades traza del lípido radiomarcado [³H]-CHE se inyectaron por vía intravenosa a ratones Swiss Webster hembra a una dosis equivalente de docetaxel de 20 mg/kg o se incubaron *in vitro* a 37°C en plasma de ratón. Las muestras de plasma tomadas en los puntos de tiempo indicados se analizaron para determinar el contenido de lípidos y profármacos mediante recuento de centelleo líquido y UHPLC, respectivamente. Para los estudios de retención *in vitro* se retiró el fármaco no atrapado (liberado) de las muestras de plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando columnas giratorias Sephadex G50 antes del análisis del contenido de lípidos y fármacos. Los puntos de datos representan medias ± desviaciones típicas (n = 4).

Figura 8. Eficacia contra el cáncer. Respuesta de xenoinjertos de carcinoma de mama humano MDA435/LCC6 subcutáneo al tratamiento con Taxotere™ y TD1 encapsulado con NL en ratones Rag2M. (A) Tratamiento con diversas formulaciones de NL para determinar el efecto de la composición lipídica sobre la eficacia. Las formulaciones de NL (razón de profármaco a lípido de 0,2 peso/peso) estaban compuestas por DSPC/Col (■), DPPC/Col (▲) y DMPC/Col (✱) y se administraron a una dosis equivalente de docetaxel de 40 mg/kg. El control no tratado recibió una inyección de solución salina (◆). (B) Dosis-respuesta para la formulación de NL de DSPC/Col (razón de profármaco a lípido 0,2 p/p) administrada a dosis equivalentes de docetaxel de 25 (x), 40 (✱) y 88 (▲) mg/kg. Los controles no tratados recibieron una inyección de solución salina (◆). Se incluyó Taxotere™ a 25 mg/kg de docetaxel para la comparación (■). (C) Comparación de Taxotere™ con la formulación de NL de DSPC/Col de 88 mg/kg. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran con desviaciones típicas. El tratamiento se inició el día 35 con un solo tratamiento i.v. de inyección en embolada. Los puntos representan la media de los volúmenes tumorales relativos (razón entre el volumen del tumor medido en un punto de tiempo dado y el volumen del tumor medido el día del tratamiento); Se

presentan valores medios para 6 ratones por grupo.

Figura 9. Cinética comparativa *in vivo* y actividad anticancerosa de vincristina libre (VCR) (2 mg/kg) y vincristina (2 mg/kg) encapsuladas en 100 nm de NL de esfingomiélin de huevo/colesterol inyectados i.v. en ratones SCID portadores de tumores A431. (8A) Perfil de concentración de VCR libre (□) y VCR formulada con NL (●) en plasma sanguíneo a lo largo del tiempo. La VCR libre se elimina rápidamente de la circulación, mientras que la VCR formulada en NL tiene una semivida de circulación prolongada. (8B) Liberación de VCR libre (●) de formulaciones de NL (% de retención) a lo largo del tiempo. La VCR formulada con NL presenta un perfil de liberación sostenida en circulación. (8C) Concentración tumoral (µg/mL) de VCR a lo largo del tiempo después de la administración de VCR libre (□) y VCR formulada con NL (●). La semivida prolongada y el perfil de liberación sostenida de la VCR formulada con NL dan como resultado un aumento de la acumulación tumoral de la VCR a lo largo del tiempo. (8D) Actividad contra el cáncer de VCR libre (□) y VCR formulada con NL (●) con respecto al control salino (■). La VCR formulada con NL tiene una actividad contra el cáncer significativamente mayor que el compuesto libre. Las formulaciones nanoliposomales aumentan la cantidad de fármaco que llega a los sitios de crecimiento tumoral y prolonga la duración de la exposición a niveles terapéuticamente activos del fármaco, lo que produce un aumento de la actividad antitumoral.

Figura 10. Ilustración esquemática de la estrategia química empleada para la síntesis de derivados de fármacos de base débil basada en la esterificación de grupos hidroxilo localizados en el fármaco.

Descripción detallada

Según se utiliza en la presente memoria, el término "liposoma" o "nanopartícula liposomal" o "NL" se refiere a una estructura de autoensamblaje que comprende una o más bicapas lipídicas, cada una de las cuales comprende dos monocapas que contienen moléculas lipídicas anfipáticas con orientación opuesta. Los lípidos anfipáticos comprenden un grupo de cabeza polar (hidrófilo) unido covalentemente a una o dos o más cadenas de acilo o alquilo no polares (hidrófobas). Los contactos energéticamente desfavorables entre las cadenas de acilo hidrófobas y un medio acuoso circundante inducen a las moléculas lipídicas anfipáticas a organizarse de tal manera que los grupos de cabeza polar estén orientados hacia la superficie de la bicapa y las cadenas de acilo estén orientadas hacia el interior de la bicapa, protegiendo eficazmente las cadenas de acilo del contacto con el entorno acuoso.

Los liposomas útiles con respecto a los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden tener una única bicapa lipídica (liposomas unilamelares) o bicapas lipídicas múltiples (liposomas multilamelares) que rodean o encapsulan un compartimento acuoso. Por ejemplo, Cullis et al., en *Biochim. Biophys Acta*, 559: 399-420 (1987) describen varios tipos de liposomas.

Los lípidos anfipáticos comprenden típicamente el elemento estructural primario de las vesículas lipídicas liposomales. Las características hidrófilas de los lípidos derivan de la presencia de fosfato, carboxilo, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro y otros grupos polares similares. El carácter hidrófilo se puede conferir mediante la inclusión de grupos que incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga, que pueden estar sustituidos con uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos de compuestos anfipáticos preferidos son fosfoglicéridos y esfingolípidos, cuyos ejemplos representativos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dilinoleoilfosfatidilcolina y esfingomiélin de huevo. Otros lípidos, tales como esfingolípidos y glicosfingolípidos, también son útiles en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria. Además, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos, tales como triacilglicérols y esteroides.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo C₁-C₁₀" se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada en donde la cadena más larga tiene de uno a diez átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, etc.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "halógeno" o "halo" incluye cloro, flúor, que son preferidos, y yodo y bromo.

La presente invención se refiere en general a fármacos que se modifican para facilitar la carga de los fármacos en nanopartículas liposomales (NL). Por ejemplo, los fármacos lipófilos/insolubles en agua pueden ser resistentes o no susceptibles de ser encapsulados en liposomas utilizando técnicas convencionales y se modifican para formar derivados de fármacos que pueden cargarse de manera eficaz en NL que presenta un gradiente de pH a través de la membrana liposomal.

Los derivados de fármaco pueden cargarse de manera eficaz en NL que presenta un gradiente de pH o de iones transmembrana, así como formulaciones de NL y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos derivados de fármaco. En diversas realizaciones, los derivados del fármaco se preparan modificando químicamente un fármaco conocido, es decir, docetaxel, que tiene una o más propiedades, tales como, entre otras, la escasa solubilidad en

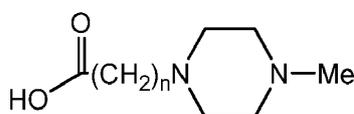
agua, que evita que se carguen de manera eficaz en liposomas. En la invención, el fármaco es docetaxel, que es un agente quimioterapéutico.

5 Los derivados de fármaco proporcionados en la presente memoria se forman derivatizando el fármaco con una "unidad solubilizadora" que posee una o más características que facilitan la carga del fármaco derivado en la NL. La unidad de solubilización está adaptada fisicoquímicamente para facilitar la carga eficaz de un fármaco derivado en la NL y/o la liberación eficaz del fármaco desde la NL en condiciones preferidas en o cerca de una diana terapéutica.

10 La unidad de solubilización comprende un grupo amino débilmente alcalino que facilita la carga activa del derivado de fármaco en la NL en presencia de un gradiente de pH o de iones transmembrana. Según se utiliza en la presente memoria, el término "derivado de base débil" se refiere a un fármaco modificado de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria para contener un radical débilmente alcalino.

15 En la invención, el radical de base débil es N-metil-piperazino (p.ej., como en el fármaco contra el cáncer Glivec®).

En algunos aspectos, el grupo amino débilmente alcalino es:



20 donde n está entre 1 y aproximadamente 10, o más preferiblemente 1 y 4.

La unidad de solubilización comprende una unidad conectora que facilita el anclaje de la unidad de solubilización al fármaco. El conector comprende un grupo carbonilo reactivo (p.ej., un radical ácido carboxílico) que reacciona con un grupo OH libre en el fármaco para formar una conexión carboxiléster.

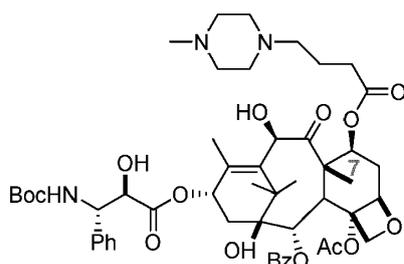
25 La unidad de solubilización está diseñada para facilitar la carga activa del derivado de fármaco en ubicaciones específicas dentro de la NL. Por ejemplo, en algunos aspectos, el fármaco se derivatiza con una unidad solubilizadora de agua que facilita la carga activa del derivado de fármaco al interior acuoso de la NL. La adición de un grupo amina es una estrategia común de modificación de fármacos para mejorar la solubilidad en agua (p.ej., Capdeville et al., Nature Reviews Drug Discovery, 1: 493-502 (2002); Pizzolato y Saltz, Lancet, 361: 2235-2242 (2003)), y en la técnica se conocen diversos métodos para elaborar derivados de fármacos de amina, incluidos los productos conjugados de fármacos reversibles (p.ej., grupos eliminados *in vivo* por acción de la enzima). Los ejemplos no limitantes de fármacos modificados con amina con solubilidad en agua mejorada incluyen los agentes anticancerosos Glivec (N-metil-piperazina), irinotecan (bis-piperidina) y topotecan (grupo etildimetilamino).

35 Los derivados de base débil pueden cargarse en la NL mediante la imposición de un gradiente de pH a través de la membrana del liposoma (ácido en el interior) e incubando el liposoma con el fármaco que se va a encapsular. Dependiendo del pH, los derivados de base débil pueden existir en forma cargada (protonada) (p.ej., donde el pH está por debajo del pKa) o en forma neutra (p.ej., donde el pH es igual al pKa o está por encima del mismo). Solo la forma neutra puede penetrar rápidamente a través de la membrana del liposoma. Al llegar al interior del liposoma ácido, se adopta la forma impermeable a la membrana cargada, lo que impulsa la captación y retención continuada del compuesto en el interior del liposoma.

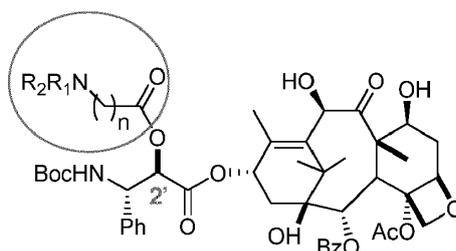
45 Las propiedades de carga de fármaco de un derivado de base débil proporcionado en la presente memoria pueden ajustarse seleccionando y/o modificando una o más propiedades de grupos de amina derivados y/o grupos lipófilos derivados. Por ejemplo, el pKa de un grupo amino derivado se puede seleccionar de manera tal que el grupo amina esté protonado en el interior acuoso de la preparación de NL que se está usando (p.ej., a bajo pH) y sin protonar en el medio externo (p.ej., a pH neutro o alcalino).

50 Una unidad solubilizadora que comprende un radical de base débil puede unirse a cualquier grupo funcional adecuadamente reactivo en el fármaco elegido como diana para la modificación. En la invención, la unidad solubilizante está unida a través de un grupo OH libre en el fármaco mediante un enlace carboxiléster.

55 En algunos aspectos, los fármacos se derivatizan en una región que no es esencial para la actividad terapéutica deseada, de modo que la actividad del derivado es sustancialmente equivalente a la del fármaco libre. Por ejemplo, en algunos aspectos, el derivado de base débil comprende el taxano docetaxel derivatizado en el grupo 7-OH del esqueleto de bacatina.



5 En aspectos adicionales, los fármacos se derivatizan en una región que es esencial para la actividad, de manera que los derivados son profármacos que deben convertirse en el compuesto parental u otra forma activa para ejercer el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, en algunos aspectos, se proporcionan derivados de docetaxel en la presente memoria que se derivatizan en el grupo 2'-OH que es esencial para la actividad del docetaxel.



10 Los derivados profármacos proporcionados en la presente memoria preferiblemente se convierten rápidamente en el fármaco libre tras la liberación del portador NL y la exposición a condiciones fisiológicas *in vivo*. Por ejemplo, en algunos aspectos preferidos, el grupo amino derivado de un derivado de base débil proporcionado en la presente memoria se elimina rápidamente del fármaco después de la liberación desde el liposoma, por ejemplo a través de la acción de enzimas endógenas y/o mediante hidrólisis espontánea.

15 Por lo tanto, la unidad solubilizante puede conjugarse de manera reversible con el derivado de fármaco para formar un profármaco que es estable en ciertas condiciones (p.ej., durante la carga, formulación, almacenamiento y/o administración de una composición de NL) y se disocia para liberar el fármaco libre en o cerca de su diana o dianas terapéuticas, por ejemplo, por medio de la acción de enzimas endógenas y/o bajo ciertas condiciones fisiológicas (p.ej., pH, fuerza iónica).

20 Los derivados de base débil también se pueden diseñar para ser estables dentro del nanotransportador liposomal (p.ej., a un pH bajo) pero se "auto-liberan" a un pH fisiológico, de manera que el profármaco se convierte rápidamente en su forma activa al liberarse del liposoma. Esto se puede lograr, por ejemplo, anclando un grupo aminobutirilo a docetaxel, que en su forma no protonada (pH 7,4) puede desencadenar la liberación a través del ataque nucleófilo en el éster carbonilo.

25 La estabilidad hidrolítica de un enlace éster de un derivado de base débil se puede modular explotando uno o más de los siguientes efectos:

30 i) *Efectos inductivos*: Los ésteres pueden estabilizarse o desestabilizarse hacia la escisión a pH fisiológico, ya sea con ayuda de proteasas o mediante hidrólisis espontánea, o colocando el grupo amino solubilizante más cerca (desestabilización) o más lejos (estabilización) del centro carbonilo. El pKa del grupo amino también desempeña un papel en este contexto: una amina cargada (protonada) promueve la hidrólisis del éster en condiciones fisiológicas. Mediante la elección apropiada de los grupos R en el grupo amino, el centro N se puede modular para lograr una tasa ideal de escisión del éster.

35 ii) *Efectos químicos y de proximidad*. La esterificación con, por ejemplo, un grupo 4-aminobutirilo en el que la unidad amino tiene un pKa ~6 produce una entidad que existirá en su forma protonada a bajo pH, tal como el pH encontrado dentro de la NL cargada con sulfato de amonio. La liberación de dichos derivados del portador NL y la exposición a condiciones fisiológicas (p.ej., pH 7,4) promueve la formación de una forma de base libre, permitiendo que la amina libre provoque la "auto-liberación" de la unidad de derivatización a través del ataque nucleófilo en el éster carbonilo. Ventajosamente, esto permite que los derivados profármaco se conviertan rápidamente en la forma activa tras la liberación de la NL.

40 La estabilidad hidrolítica de un enlace silil éter de un derivado de base débil puede modularse para facilitar la hidrólisis espontánea. A diferencia de los conectores de éster, no hay enzimas desillantes endógenas. Por lo tanto, los derivados que comprenden un enlace silil éter comprenden preferiblemente un grupo conector que permite la hidrólisis en condiciones fisiológicas. El principal determinante de la tasa de escisión del grupo sililo es el volumen

estérico alrededor del átomo de Si. La modulación de esta propiedad fisicoquímica implica variar el tamaño de los grupos R y R' en los haluros de sililo, por ejemplo, a través de la serie Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu, Ph, etc. Como en el caso de los ésteres, el pKa del grupo amino también desempeña un papel en la definición de la estabilidad de los derivados. Por ejemplo, un grupo amino con un pKa ~6 existirá predominantemente como la base libre a pH fisiológico, facilitando así la escisión del grupo sililo.

El tamaño y/o la composición química de un grupo derivado lipófilo se pueden seleccionar para mejorar la solubilidad en la membrana liposomal y/o la estabilidad del fármaco dentro del liposoma (p.ej., anclando el fármaco en la membrana liposomal).

Ventajosamente, los derivados de base débil del fármaco proporcionado en la presente memoria pueden cargarse en liposomas de manera más eficaz que el fármaco libre. En algunos aspectos, un derivado de base débil proporcionado en la presente memoria puede cargarse en liposomas con una eficacia de carga de al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85% o más en un amplio intervalo de razones de fármaco a lípido (p.ej., de aproximadamente 0,01 mg/mg, a aproximadamente 10 mg/mg o más).

En aspectos adicionales, las formulaciones de NL de derivados de base débil proporcionadas en la presente memoria pueden optimizarse para lograr la liberación sostenida del derivado de fármaco a través de, por ejemplo, la modificación de la composición lipídica de la membrana del portador NL. Por ejemplo, en varios aspectos, las formulaciones de NL proporcionadas en la presente memoria tienen una semivida de liberación *in vivo* de aproximadamente 1 a aproximadamente 96 horas, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 72 horas, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 48 horas.

La enseñanza de la presente invención se puede utilizar para modificar cualquier fármaco o agente terapéutico para el que sea deseable una formulación liposomal. En algunos casos preferidos, el fármaco es lipófilo y/o poco soluble en agua. Ventajosamente, la modificación de dichos fármacos da como resultado una mejor solubilidad, una reducción de la toxicidad, una mayor eficacia y/u otros beneficios con respecto al fármaco libre.

En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos no limitantes de fármacos alternativos, además del docetaxel, que pueden modificarse y cargarse en NL de una manera similar a la presente invención.

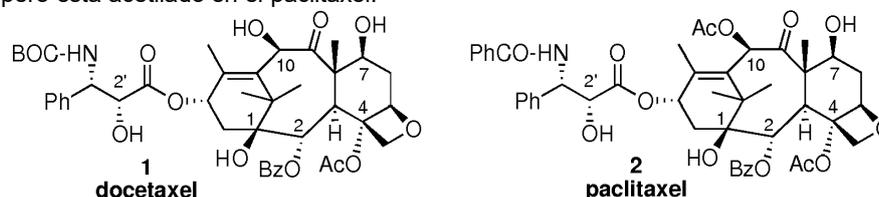
Tabla 1. Fármacos ilustrativos para su derivatización.

Fármaco	Indicación	Solubilidad en agua (µg/mL)
Amprenavir	VIH	36 (49 pred.)
Bexaroteno	Antineoplásico	0,15 (pronost.)
Calcitrol	Regulador de calcio	6,7 (pronost.)
Ciclosporina A	Inmunosupresor	9,5 (pronost.)
Digoxina	Insuficiencia cardíaca	127 (pronost.)
Doxercalciferol	Hiperparatiroidismo	relativamente insoluble
Paricalcitol	Hiperparatiroidismo	6,8
Dronabinol	Anorexia	2800 (pronost.) insoluble en agua, aceite a temperatura ambiente.
Etopósido	Antineoplásico	58,7, 200
Tenipósido	Antineoplásico	59,8 (pronost.)
Isotretinoína	Antiacné	4,8 (pronost.)
Sirolimus	Antineoplásico	1,7 (pronost.), insoluble en agua
Tretinoína	Antineoplásico	1000, 4,7 (pronost.)
Ácido valproico	Antiepiléptico	1300
Anfotericina B	Antimicótico	750
Docetaxel	Antineoplásico	12,7 (pronost.)
Paclitaxel	Antineoplásico	5,5 (pronost.)

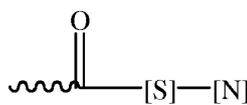
Fármaco	Indicación	Solubilidad en agua (µg/mL)
Fulvestrant	Antineoplásico	6,7 (pronost.)
Tacrolimus	Inmunosupresor	4 (pronost.), insoluble
Valrubicina	Antineoplásico	32,5 (pronost.), insoluble
Propofol	Anestésico	124
Prednisona	Antiinflamatorio	312
Prednisolona	Antiinflamatorio	223
Dexametasona	Antiinflamatorio	89
Tacrolimus (fk-506)	Inmunosupresor	4 (pronost.), insoluble
Acido micofenólico	Inmunosupresores, antiproliferativos.	35,5 (pronost.), insoluble
Lovastatina	Anti-colesterémico	24 (pronost.)

pronost. = pronosticada
 Fuentes: R.G. Strickley, Pharm. Res. 21(2): 201 (2004); DrugBank en <http://www.drugbank.ca/>

- 5 Los taxanos, que incluyen docetaxel (Taxotere) y paclitaxel (Taxol), son una familia importante de fármacos que tienen un amplio uso en oncología clínica. Como la mayoría de los fármacos contra el cáncer, los taxanos no son selectivos para las células cancerosas y también pueden causar daño a las células sanas. Debido a que los taxanos son poco solubles en solución acuosa, generalmente se formulan en vehículos tales como Cremophor y Polysorbate 80, que a su vez causan reacciones adversas en los pacientes. La medicación con esteroides y antialérgicos a menudo se utiliza para minimizar los efectos secundarios del vehículo. Ventajosamente, las formulaciones de taxanos en NL proporcionadas en la presente memoria, es decir, derivados de docetaxel, permiten la administración de taxanos sin el uso de un vehículo tóxico. Además, debido a que la NL puede salir del torrente sanguíneo y acumularse preferentemente a altas concentraciones en tumores debido a la naturaleza "permeable" de los vasos sanguíneos en estos sitios, las formulaciones de taxanos en NL pueden ofrecer una actividad contra el cáncer superior con menos efectos secundarios (p.ej., un índice terapéutico mejorado) en comparación con Taxotere, la formulación aprobada del compuesto parental.
- 10 En algunos aspectos, las formulaciones de NL proporcionadas en la presente memoria aumentan la cantidad de un agente quimioterapéutico que alcanza específicamente un sitio de crecimiento tumoral y/o prolongan la duración de la exposición de un tumor a niveles terapéuticamente activos de fármaco, por ejemplo, a través de una semivida en plasma prolongada de la NL y/o la liberación sostenida del agente quimioterapéutico del portador NL.
- 15 En la invención, el fármaco es docetaxel (Taxotere®). Las estructuras de docetaxel y paclitaxel se muestran a continuación. Los dos fármacos difieren a nivel del grupo acilo presente en el átomo de nitrógeno de la cadena lateral (terc-butoxicarbonilo, o BOC, en el docetaxel; benzilo en el paclitaxel) y en que el grupo C-10 OH está libre en el docetaxel, pero está acetilado en el paclitaxel.
- 20



- 25 La modificación de docetaxel de acuerdo con la presente invención implica la derivatización del OH C-2', C-7 y/o C-10 para producir los siguientes derivados, en donde los grupos Z conectados al OH C-2', C-7 y/o C-10 son, independientemente, H, o un residuo de fórmula IIA, en donde:



Fórmula IIA

- 30 (i) la línea ondulada representa el enlace que conecta la Fórmula IIA con el átomo o los átomos de O libres, en el fármaco;

(ii) [S] es un "espaciador" seleccionado entre:

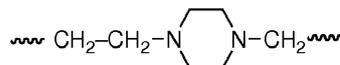
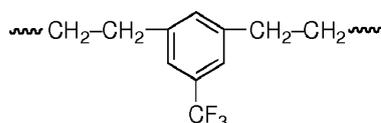
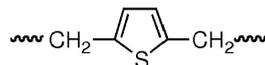
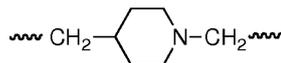
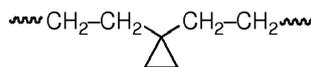
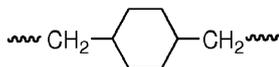
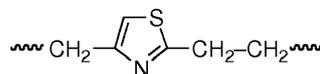
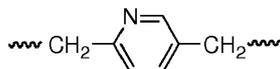
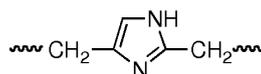
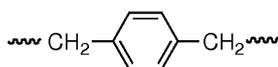
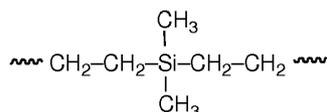
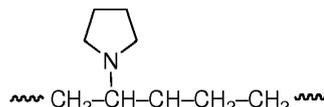
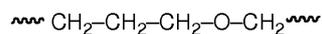
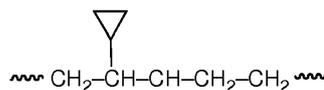
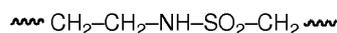
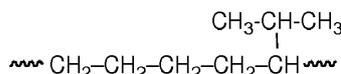
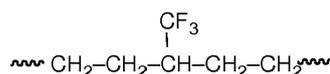
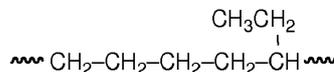
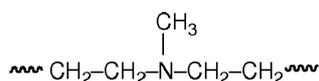
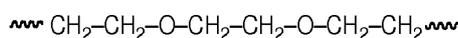
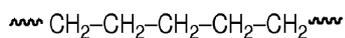
a) una cadena del tipo $(CH_2)_n$, donde n puede variar de 1 a 10, o

(b) un derivado del anterior $(CH_2)_n$ donde uno o más átomos de H se reemplazan por: un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene de 1 a 10 átomos de C, un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a los átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, un átomo de halógeno; o

(c) un derivado de lo anterior $(CH_2)_n$ donde uno o mas CH_2 se reemplazan por: un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a los átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, una estructura anular que consta de 3 a 10 átomos de carbono e incorpora facultativamente uno o más heteroátomos tales como N, O, S, Si, o halógeno, así como múltiples enlaces entre pares de átomos; o

(d) un derivado del anterior $(CH_2)_n$ donde uno o más pares de átomos de C adyacentes comparten un enlace doble de geometría E o Z, o un enlace triple.

Los ejemplos de dichos espaciadores [S] incluyen, pero no se limitan a:



5

10

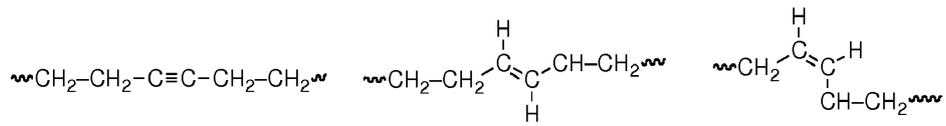
15

20

25

30

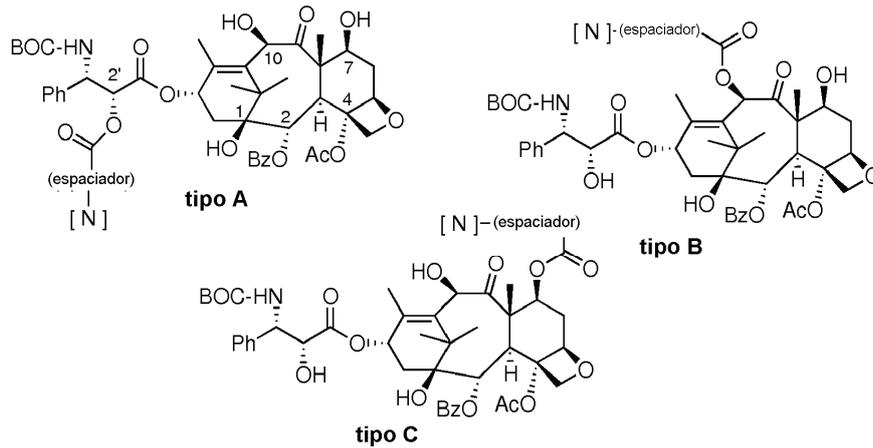
35



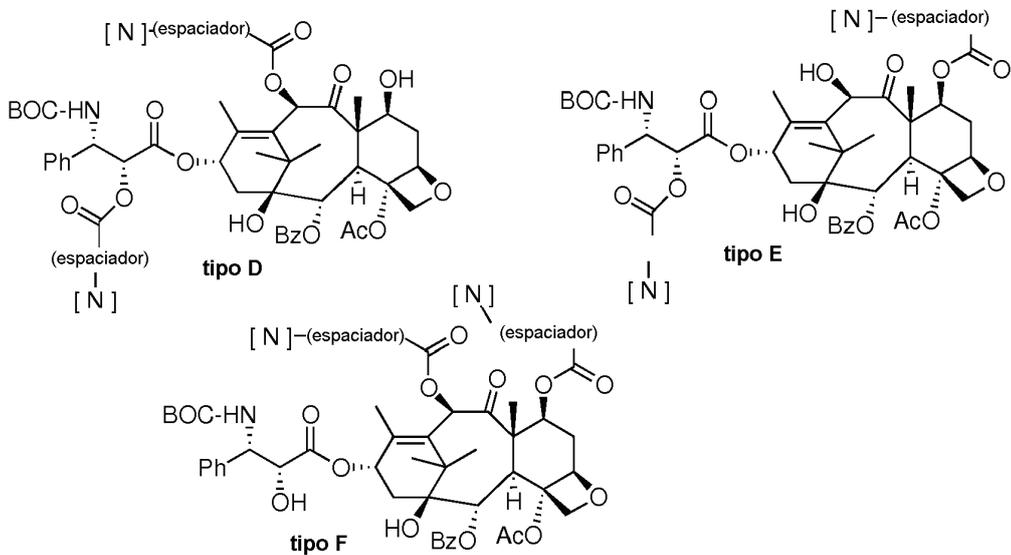
(iii) [N] es N-metil-piperazino.

1.

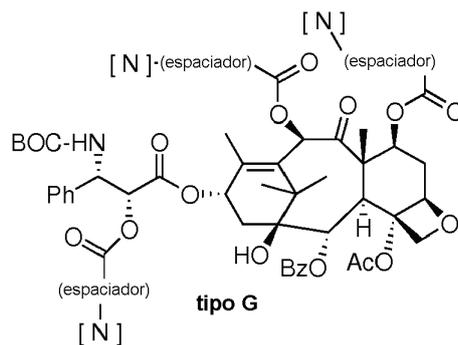
5 La derivatización de docetaxel con hasta tres unidades de Fórmula IIA, que pueden ser diferentes o idénticas, produce los mono, bis o triésteres del tipo A, B, C, D, E, F y G que se muestran a continuación.



derivados monoéster de docetaxel

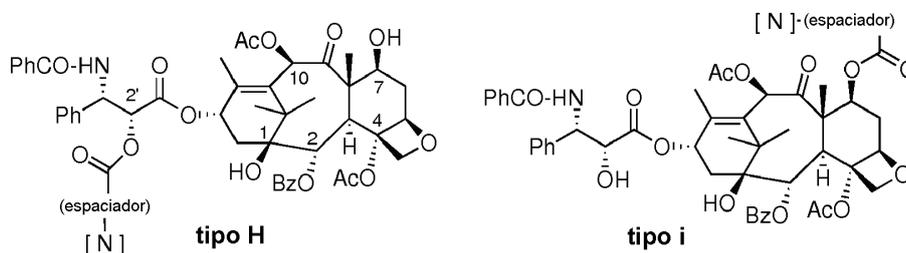


derivados diéster de docetaxel

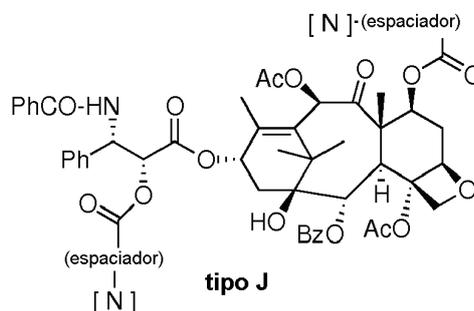


derivado triéster de docetaxel

- 5 De manera similar, el paclitaxel se puede convertir en los derivados de mono y diéster de tipo H, I y J que se muestran a continuación:

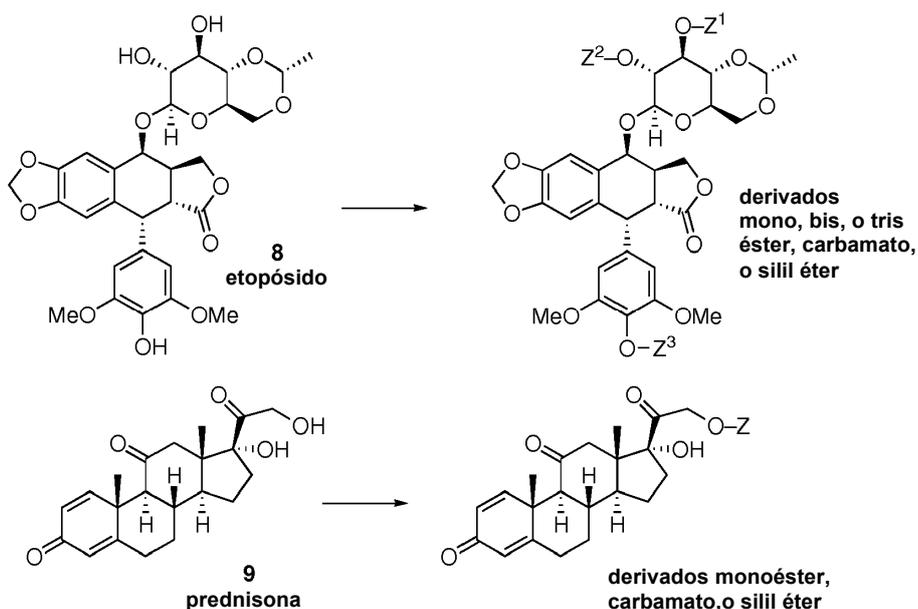


derivados monoéster de paclitaxel

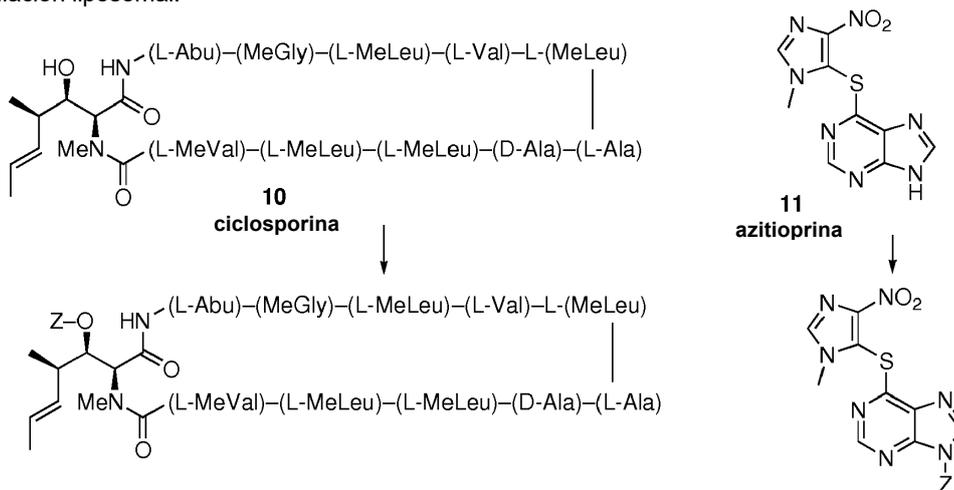


derivado diéster de paclitaxel

- 10 La elaboración de docetaxel o de paclitaxel a tales derivados implica, por ejemplo, el acoplamiento del fármaco original no protegido o parcialmente protegido con una forma de ácido carboxílico de 5 mediante el uso de técnicas convencionales de química orgánica moderna que son bien conocidas por los expertos en la técnica.
- 15 La tecnología ilustrada anteriormente con taxanos puede ser aplicable a cualquier fármaco que posea sitios de anclaje adecuados, tales como grupos OH, COOH (carboxilo) o NH, para unidades solubilizantes, [Z], de Fórmula IIA.
- 20 En enfoques alternativos, el fármaco puede ser etopósido, que es un agente anticanceroso ampliamente utilizado y aprobado para el tratamiento de los cánceres de tipo linfoma, de pulmón y testicular. El etopósido exhibe una escasa solubilidad en agua, experimenta inactivación metabólica y tiene importantes efectos secundarios tóxicos. Dichas formulaciones de etopósido en NL reducen sustancialmente la toxicidad, mejoran la solubilidad y la biodisponibilidad y aumentan la eficacia.
- 25 Para ilustrar, el etopósido, **8**, y la prednisona corticosteroide, **9**, se pueden convertir en derivados éster, carbamato o silil éter. [Z] en estos derivados puede ser el que se definió anteriormente para compuestos en la serie del taxol



De una manera similar, la ciclosporina, **10**, azatioprina **11**, etc., pueden convertirse en derivados que son adecuados para la formulación liposomal:



5

En enfoques alternativos, el fármaco puede ser una nueva entidad química (NEQ) seleccionada, por ejemplo, de una biblioteca combinatoria, por su eficacia terapéutica y una o más propiedades, tales como el carácter lipófilo y/o la baja solubilidad en agua, que interferirían en la utilidad farmacéutica del fármaco ausente en los presentes métodos.

10

En enfoques adicionales, los derivados de fármacos pueden prepararse modificando un fármaco recientemente descubierto y/o caracterizado (p.ej., una nueva entidad química (NEQ)). A menudo, los resultados farmacológicamente potentes de los escrutinios de las bibliotecas químicas resultan ser candidatos menos que ideales para el desarrollo y uso farmacéuticos. Por ejemplo, los problemas de solubilidad son las razones principales por las que la mayoría de las NEQ no avanzan en el desarrollo y se descartan. La enseñanza descrita en la presente memoria permite el desarrollo y uso de dichos compuestos al modificarlos específicamente con radicales químicos de base débil que promueven la formulación en NL utilizando métodos conocidos. La integración de los métodos de química combinatoria de alto rendimiento para generar y seleccionar los candidatos a fármacos con la enseñanza descrita en la presente memoria proporciona un enfoque alternativo para el desarrollo de fármacos (y agentes de diagnóstico) que pueden reemplazar las estrategias de desarrollo de fármacos existentes basadas en la búsqueda de compuestos con propiedades similares al fármaco.

15

25

Por consiguiente, tales métodos se pueden utilizar para identificar fármacos candidatos que tienen una actividad terapéutica de interés y baja solubilidad en agua, carácter lipófilo y/u otras propiedades que podrían prevenir o interferir en el uso del compuesto libre y/o prevenir la carga eficaz del compuesto en la NL. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender las etapas de: seleccionar una población de compuestos producidos a través de la

química combinatoria para identificar los candidatos a fármacos que tienen una actividad terapéutica de interés, y seleccionar los candidatos a fármacos para una o más propiedades adicionales para identificar candidatos para la derivatización de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Los candidatos para la derivatización se pueden derivatizar con un grupo débilmente alcalino, cargar activamente en NL, y la NL se puede escrutar para identificar candidatos de formulación que tengan una actividad terapéutica deseada. Ventajosamente, tales métodos de escrutinio pueden identificar fármacos candidatos para su uso en formulaciones de NL que de otra manera no serían detectados utilizando métodos convencionales.

Los liposomas utilizados en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria se pueden formar a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativa o positivamente y un esteroles, tal como el colesterol. La selección de lípidos se guía generalmente considerando, p.ej., el tamaño de los liposomas, la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo, la velocidad de liberación deseada y otros factores conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, el componente lipídico principal de los liposomas utilizados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es la fosfatidilcolina. Se pueden utilizar fosfatidilcolinas que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de longitud de cadena y grado de saturación variables. En algunos aspectos, son preferidas las fosfatidilcolinas que contienen ácidos grasos saturados con cadenas de carbono en el intervalo de C₁₄ a C₂₂. Las fosfatidilcolinas saturadas de cadena larga son menos permeables y más estables in vivo que sus contrapartes insaturadas. También se pueden utilizar fosfatidilcolinas con ácidos grasos mono- o di-insaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Otros lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, los éterlípidos en los que los ácidos grasos están conectados a glicerol a través de enlaces éter en lugar de enlaces éster. Los liposomas utilizados en la presente memoria también pueden estar compuestos de esfingomielina o fosfolípidos con grupos de cabeza distintos de la colina, tales como etanolamina, serina, glicerol, ácido fosfatídico e inositol.

En algunas realizaciones preferidas, los liposomas incluyen un esteroles, preferiblemente colesterol, a razones molares de 0,1 a 1,0 (colesterol:fosfolípido). Los ejemplos de composiciones de liposomas preferidas incluyen distearoilfosfatidilcolina/colesterol, dipalmitoilfosfatidilcolina/colesterol, dimirisilfosfatidilcolina/colesterol y esfingomielina de huevo/colesterol.

En otras realizaciones, los liposomas pueden contener lípidos cargados negativa o positivamente. Los ejemplos de lípidos cargados negativamente útiles incluyen, pero no se limitan a dimiristoil-, dipalmitoil- y diestearoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoil-, dipalmitoil- y dipalmitoilfosfatídico, dimiristoil-, dipalmitoil- y dipalmitoilfosfatidiletanolamina, su diacilo insaturado y contrapartes de cadena de acilo mixtas así como cardiolipina. Los ejemplos no limitantes de lípidos cargados positivamente incluyen bromuro de N,N'-dimetil-N,N'-dioctacil-amonio (DDAB) y cloruro DDAC), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetil)carbamoil]colesterol (DC-col), 1,2-dioleoiloxi-3-[trimetilamonio]-propano (DOTAP), 1,2-dioctadeciloxi-3-[trimetilamonio]-propano (DSTAP), y cloruro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethylamonio (DORI) y lípidos catiónicos descritos, por ejemplo, por B. Martin, M. Sainlos, A. Aissaoui, N. Oudrhiri, M. Hauchecorne, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn y P. Lehn en *The design of cationic lipids for gene delivery*. *Current Pharmaceutical Design* 2005, 11, 375-394.

En realizaciones adicionales, los liposomas utilizados en la presente memoria se recubren con una capa de polímero para mejorar la estabilidad de la NL in vivo (p.ej., liposomas estabilizados estéricamente). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las NL se forman a partir de liposomas que contienen lípidos conjugados con poli(etilenglicol) (PEG-lípidos) que forman una capa superficial hidrófila que mejora la semivida de la circulación de NL y aumenta la cantidad de NL que llega a la diana terapéutica, tales como un sitio de infección o un sitio de tumor. El enfoque general se describe, p.ej., por Working et al. en *J Pharmacol Exp Ther*, 289: 1128-1133 (1999); Gabizon et al., *J Controlled Release* 53: 275-279 (1998); AdlakhaHutcheon et al., *Nat Biotechnol* 17: 775-779 (1999); y Koning et al., *Biochim Biophys Acta* 1420: 153-167 (1999). Los ejemplos de PEG-lípidos útiles incluyen, pero no se limitan a, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-350] (mPEG 350 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-550] (mPEG 550 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-750] (mPEG 750 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-1000] (mPEG 1000 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-2000] (mPEG 2000 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-3000] (mPEG 3000 PE); 1,2-Diacil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietilenglicol)-5000] (mPEG 5000 PE); N-Acil-Esfingosina-1-[Succinil(Metoxi Polietilen Glicol) 750] (mPEG 750 Ceramida); N-Acil-Esfingosina-1-[Succinil(Metoxi Polietilenglicol) 2000] (mPEG 2000 Ceramida); y N-Acil-Esfingosina-1-[Succinil(Metoxi Polietilen Glicol) 5000] (mPEG 5000 Ceramida).

Se dispone de una variedad de métodos para preparar liposomas como se describe, por ejemplo, en Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980); Patentes de Estados Unidos Núm. 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028; *Liposomes*, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983, Capítulo 1; y Hope, et al., *Chem. Phys. Lip.* 40:89 (1986). En algunos aspectos preferidos, los liposomas son liposomas pequeños, de aproximadamente 100 nm

de diámetro, generados por extrusión de dispersiones de lípidos hidratados a través de filtros con poros de 100 nm, como describen en general Hope et al., en *Biochim. Biophys. Acta*, 812: 55-65 (1985).

5 En un método, se producen vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos disolviendo los lípidos formadores de vesículas en un disolvente o sistema disolvente orgánicos adecuados y secando la mezcla a vacío o en un gas inerte para formar una película delgada de lípidos. Alternativamente, los lípidos se pueden disolver en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario, y a continuación liofilizar para formar una mezcla lipídica más homogénea. La película o el polvo se cubren con una solución acuosa tamponada de un ión metálico monovalente o divalente y se deja hidratando, típicamente durante un período de 15 a 60 minutos con agitación. La distribución de tamaños de las vesículas multilamelares resultantes se puede cambiar a tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o agregando detergentes solubilizantes tales como el desoxicolato. En otro método, los lípidos se disuelven en un disolvente orgánico miscible con agua tales como el etanol y a continuación se combinan con el tampón acuoso para formar una suspensión de liposomas multilamelares. Alternativamente, los lípidos se disuelven en un disolvente orgánico inmiscible en agua, se mezclan con el medio acuoso y los liposomas se forman por evaporación del disolvente orgánico.

20 Se dispone de varias técnicas para clasificar por tamaño los liposomas a un tamaño deseado. Un método de clasificación por tamaño se describe en Patente de Estados Unidos Núm. 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas, mediante sonicación ya sea por baño o sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta pequeñas vesículas unilamelares de menos de aproximadamente 0,05 micras de tamaño. La homogeneización o microfluidización son otros métodos que se basan en la energía de cizallamiento para fragmentar los liposomas grandes a otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilamelares se entrecruzan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula puede controlarse mediante la discriminación del tamaño de partícula por haz láser convencional.

30 La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica es un método muy eficaz para reducir los tamaños de los liposomas a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de liposoma deseada. Los liposomas pueden extraerse a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños, para lograr una reducción gradual del tamaño de los liposomas.

35 En algunos aspectos, se proporcionan métodos para cargar un derivado de base débil en liposomas utilizando una técnica de carga activa. En algunos aspectos, los liposomas se cargan imponiendo un gradiente de pH a través de la membrana del liposoma (en donde el interior del liposoma es ácido) e incubando el liposoma con el fármaco que se deba encapsular, como describen, por ejemplo, Maurer, N., Fenske, D. y Cullis, P.R. (2001) *Developments in liposomal drug delivery systems. Expert Opinion in Biological Therapy* 1, 923-47; N.L. Boman, D. Masin, L.D. Mayer, P.R. Cullis y M.B. Bally (1994) "Liposomal Vincristine Which Exhibits Increased Drug Retention and Increased Circulation Longevity Cures Mice Bearing P388 Tumors", *Cancer Res.* 54, 2830-2833; D.N. Waterhouse, T.D. Madden, P.R. Cullis, M.B. Bally, L.D. Mayer, M. Webb, Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine. *Methods Enzymol.* 391 (2005) 40-57. En algunos aspectos preferidos, el gradiente de pH es un gradiente de sulfato de amonio, como describen en general G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz, Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim. Biophys. Acta* 1115 (1993) 201-215 y Patente de Estados Unidos Núm. 5.316.771. Una vez que el fármaco se ha cargado en los liposomas, las composiciones se pueden utilizar directamente, o la composición se puede tratar adicionalmente para eliminar cualquier fármaco descargado.

50 Las técnicas de carga de pH generalmente implican dos etapas, la generación del gradiente de pH con un pH intraliposomal bajo y la posterior carga del fármaco. Los gradientes de protones transmembrana se pueden generar de varias maneras. Los liposomas se pueden preparar en un tampón de pH bajo, tal como un tampón de citrato de pH 4, seguido de un intercambio de la solución tampón externa contra un tampón de pH 7,5 (p.ej., Madden et al., *Chem. Phys. Lipids*, 53: 37-46 (1990)). Alternativamente, se pueden utilizar ionóforos junto con gradientes de cationes (altas concentraciones de cationes internos) (p.ej. Fenske et al., *Biochim Biophys. Acta*, 1414: 188-204 (1998)). Ionóforos tales como la nigericina y A23187 acoplan el movimiento hacia afuera de los cationes monovalentes o divalentes, respectivamente, al movimiento hacia adentro de los protones, acidulando así el interior del liposoma. Además, los liposomas se pueden preparar en presencia de altas concentraciones de una base débil tal como el sulfato de amonio (Haran et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1151: 201-215 (1993)). La eliminación de la solución de sal de amonio externa da como resultado la generación de un gradiente de pH de acuerdo con el mismo principio, que también es responsable del proceso posterior de carga del fármaco. La técnica de carga de sulfato de amonio no requiere un gran gradiente de pH para lograr una carga eficaz, ya que el procedimiento de carga se sostiene mediante un intercambio de las dos aminas diferentes (el fármaco entra, el amoníaco sale) y, por lo tanto, funciona bien con un pH externo muy bajo. Esto es una ventaja si, por ejemplo, el fármaco es inestable o insoluble a pH

neutro. Además de los gradientes de pH, se pueden utilizar gradientes de iones metálicos para la carga activa (p.ej., Cheung et al., *Biochim Biophys Acta*, 1414: 205-216 (1998)). Este método de carga se basa en los mismos principios básicos que la técnica de gradiente de pH. La forma neutra del fármaco de base débil puede penetrar a través de la membrana y se retiene en el interior acuoso de los liposomas a través de la formación de un complejo de ión metal-fármaco.

Para cargar fármacos de bases débiles solubles en agua en NL, el fármaco se puede disolver en una solución acuosa (p.ej., sacarosa 300 mM o soluciones tampón isotónicas con el pH apropiado), combinar con la suspensión de liposomas y a continuación incubar a la temperatura adecuada. La solución del fármaco puede contener una pequeña cantidad (no permeabilizante de la membrana) de un disolvente orgánico miscible en agua para aumentar la solubilidad del fármaco (p.ej., <10% de etanol). La temperatura y el tiempo de incubación dependen de la composición lipídica y de la naturaleza del fármaco. Típicamente, los liposomas compuestos de colesterol y ácidos grasos saturados de cadena larga tales como NL de DSPC/col son menos permeables que las NL formadas a partir de lípidos saturados de cadena corta (p.ej., DMPC/col) o lípidos insaturados y requieren temperaturas más altas para lograr una carga rápida y eficaz. Por ejemplo, la NL de DSPC/col normalmente requiere temperaturas iguales o superiores a 60°C; la carga generalmente se completa después de 5 a 15 minutos, pero puede llevar hasta 2 horas.

Para la carga de fármacos de base débil lipófilos, el fármaco se puede tratar como un lípido. Por ejemplo, los lípidos y el fármaco se pueden mezclar y los liposomas se pueden formar como se ha descrito anteriormente; el fármaco lipófilo se distribuye a continuación entre las dos monocapas de la bicapa liposómica. El fármaco en la monocapa externa se carga a continuación al interior del liposoma (se desplaza a la monocapa interna de la bicapa de la NL) en respuesta a un pH trans-membrana u otro gradiente iónico utilizando los métodos descritos anteriormente.

En realizaciones adicionales, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una formulación de NL proporcionada en la presente memoria. Los métodos para tratar una enfermedad o afección pueden comprender administrar una composición de NL proporcionada en la presente memoria. Los kits pueden comprender una composición de NL descrita en la presente memoria y material instructivo que ilustra las metodologías y usos de la invención, tal como se describe en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los liposomas y compuestos de la invención se preparan de acuerdo con técnicas convencionales, así como con las técnicas descritas anteriormente. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, es decir, por vía intraarticular, intravenosa, subcutánea o intramuscular. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa mediante una inyección o infusión en embolada. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17ª ed. (1985).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa. Por lo tanto, esta invención proporciona composiciones para administración intravenosa que comprenden liposomas suspendidos en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Se puede utilizar una variedad de vehículos acuosos, p.ej., agua, agua tamponada, solución salina isotónica al 0,9% y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o se pueden esterilizar mediante filtración. La suspensión acuosa resultante se puede envasar para su uso tal cual, o liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tampones, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, fosfato de sodio, polietilenglicol (PEG₄₀₀), etc.

La concentración de liposomas en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,5 mg/mL de lípido, generalmente en o al menos aproximadamente 10-50 mg/mL de lípido hasta tanto como 100 mg/mL de lípido o más y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluidos, viscosidades, estabilidad, dosis de fármaco requerida, etc., de acuerdo con el modo concreto de administración seleccionado.

La carga de liposomas es un determinante importante en la eliminación de la sangre de los liposomas, ya que los liposomas cargados negativamente son absorbidos más rápidamente por el sistema reticuloendotelial (Juliano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63:65 1 (1975)) y por lo tanto tienen semividas más cortas en el torrente sanguíneo. Los liposomas con semivida de circulación prolongada son típicamente deseables para usos terapéuticos y de diagnóstico, donde los liposomas tienen que acumularse en sitios de enfermedades distales como los tumores. Por ejemplo, los liposomas que tienen semividas en circulación de 2, 8, 12 o hasta 24 horas son particularmente preferidos.

Además, la suspensión de liposomas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra los daños de radicales libres y peroxidativos de lípidos durante el almacenamiento. Son adecuados los inhibidores de

los radicales libres lipófilos, como el alfa-tocoferol y los quelantes específicos del hierro solubles en agua, tales como la ferrioxamina, o un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no son limitantes.

5

Ejemplos

Ejemplo 1 - Métodos de síntesis química

10 Los derivados de base débil y los fármacos no modificados se cuantificaron mediante cromatografía líquida de
rendimiento ultraalto (UPLC). El instrumento consistía en un sistema UPLC Waters® Acquity™ equipado con un
detector de matriz de fotodiodos (PDA) y un detector MS de cuadrupolo triple (TQ); se utilizó el soporte lógico de
adquisición de datos Empower™ versión 2.0 (Waters, EE.UU.). Las separaciones se realizaron utilizando una
15 columna Waters® Acquity™ BEH C18 (1,7 µm, 2,1x100 mm) a un caudal de 0,25 mL/min, consistiendo las fases
móviles A y B en agua con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y acetonitrilo con TFA al 0,1%, respectivamente. Para
los derivados de prednisona y etopósido y los fármacos no modificados, las fases móviles consistieron en agua con
ácido fórmico al 0,1% (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (B). Las fases móviles se suministraron en un
gradiente lineal programado a una temperatura de columna de 23°C.

20 Para los derivados de docetaxel y docetaxel, la separación se inició con una razón de fase móvil de 50:50 (A:B). La
razón se cambió a 10:90 (A:B) durante un período de 2 minutos utilizando una curva lineal y a continuación se
mantuvo a 10:90 (A:B) durante un período de 0,5 minutos. Posteriormente, la fase móvil se cambió nuevamente a
50:50 (A:B) durante un período de 0,1 min y esta razón se mantuvo durante 0,4 min antes de inyectar la siguiente
muestra. Para los derivados de prednisona y prednisona, la separación se inició con una razón de fase móvil de
25 80:20 (A:B). La razón se cambió a 40:60 (A:B) durante un período de 4 minutos utilizando una curva lineal y a
continuación a 10:90 (A: B) durante un período de 0,1 minutos. La última razón se mantuvo durante 0,4 min. La fase
móvil se cambió de nuevo a 80:20 (A:B) durante un lapso de 0,1 min y esta razón se mantuvo durante 0,9 min antes
de inyectar la siguiente muestra. Para el derivado de etopósido y etopósido, la separación se inició con una razón de
fase móvil de 80:20 (A:B). La razón se cambió a 72,5:27,5 (A:B) durante un período de 1 minuto utilizando una curva
30 lineal, a continuación a 60:40 (A:B) durante un período de 3 minutos y 10:90 (A:B) durante un periodo de 0,1 min.
Esta razón se mantuvo durante 0,4 min. La fase móvil se cambió de nuevo a 80:20 (A:B) durante un lapso de 0,1
min y esta razón se mantuvo durante 0,4 min antes de inyectar la siguiente muestra.

35 El analito fue detectado mediante un detector de PDA y TQ-MS a una longitud de onda de 230 nm (en el caso de los
derivados de docetaxel y docetaxel) y 254 nm (para los derivados de prednisona y etopósido) y ES⁺ modo ion con
una tensión de cono de 30V, respectivamente. Los derivados formulados con NL se solubilizaron en etanol acidulado
con TFA o ácido fórmico (0,1% vol.). Para la detección de fármacos formulados con NL en muestras de plasma
sanguíneo, se añadieron 50 µl de plasma a 150 µl de metanol acidula con TFA o ácido fórmico (0,1% v/v) y la
mezcla se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 10.000 xg para sedimentar las proteínas precipitadas. La
40 acidulación del metanol fue necesaria para estabilizar los profármacos. El límite de detección de MS (LOD) para el
docetaxel y el derivado de docetaxel (TD-1) estaba entre aproximadamente 1-50 ng/mL cuando se utilizó metanol
acidulado con TFA. El límite se puede reducir a concentraciones sub nM, si fuera necesario, utilizando ácido fórmico
en lugar de TFA.

45 A menos que se indique lo contrario, los espectros de RMN H¹ y C¹³ se registraron a temperatura ambiente en los
modelos AV-300 de Bruker (300 MHz para H¹ y 75 MHz para C¹³) y AV-400 (400 MHz para H¹ y 100 MHz para C¹³).
Los cambios químicos son referidos en partes por millón (ppm) en la escala δ y las constantes de acoplamiento, J,
están en hertzios (Hz). Las multiplicidades se describen como "s" (singlete), "d" (doblete), "t" (tripleto), "q" (cuarteto),
"dd" (doblete de dobletes), "dt" (doblete de tripletes), "m" (multiplete), "b" (ancho). Los espectros de masas de baja
50 resolución (m/z) se obtuvieron en el modo de electrospray (ESI).

Los derivados formulados de NL fueron observados mediante Cryo-TEM realizado con un Microscopio electrónico de
transmisión Tecnai G2 20 TWIN Mk. 2 (CDRD Imaging, Vancouver, Canadá). El aparato estaba funcionando a
200kV en modo de campo claro. Las imágenes digitales se registraron en condiciones de dosis bajas con una
55 cámara FEI Eagle 4k HR CCD y el soporte lógico de análisis FEI TIA. Se utilizó un enfoque insuficiente de 1-3 µm
para mejorar el contraste de la imagen. La preparación de la muestra se realizó con un robot de vitrificación Vitrobot
Mark IV en gradillas Lacey Formvar 300 (núm. 01890 de Ted Pella).

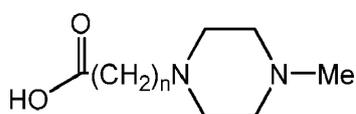
60 Todos los reactivos y disolventes fueron productos comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. La
cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice de malla 230 - 400 Silicycle. La TLC analítica y preparativa se
llevó a cabo con placas de gel de sílice Merck 60 con indicador fluorescente. Las manchas se visualizaron con luz
UV, KMnO₄ o p-anisaldehído.

Estrategia de síntesis general

Una estrategia general proporcionada en la presente memoria (Figura 10) implica la derivatización de un fármaco 1 insoluble en agua que contiene un sitio de anclaje apropiado, OH en la presente invención, con una unidad solubilizante debidamente adaptada representada por la estructura general 2, es decir, correspondiente al grupo de Fórmula IIa. El esquema general también se aplica a la síntesis de derivados de fármacos de bases débiles lipófilas. El producto conjugado soluble en agua resultante 3 se puede cargar en NL utilizando un pH o un gradiente de iones como fuerza motriz. El derivado 3 es activo por sí mismo y/o es convertido rápidamente en el fármaco principal activo 1 en condiciones fisiológicas.

La tecnología se basa en una serie de propiedades físicas de 3, tal como (i) solubilidad en agua; (ii) pKa de la funcionalidad de nitrógeno protonado; (iii) estabilidad en condiciones de carga de liposomas; (iv) tasa de liberación del fármaco libre en condiciones fisiológicas. A su vez, estas propiedades son una función de la naturaleza del conector, del espaciador y de los grupos R¹ y R² en 2.

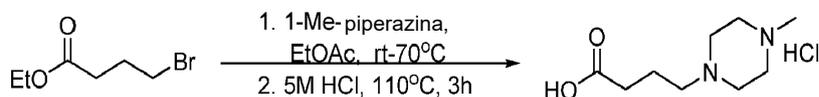
Las unidades solubilizantes comprenden un grupo conector carboxi, un espaciador tal como una cadena n-C₁ - C₄, y el grupo amina N-metilpiperazina. Las unidades solubilizantes ejemplares incluyen:



donde n está entre 1 y aproximadamente 10, o más preferiblemente 1 y 4.

Ejemplo 2 - Derivados de taxano

El docetaxel se derivatizó en el grupo hidroxilo en la posición C-2' con ácido N-metil-piperazinil butanoico para formar un profármaco aminoéster (TD1), como se describe a continuación.

Derivado 2'-O-(éster de ácido N-metil-piperazinil butanoico) de docetaxel (TD1)**Síntesis del conector: Hidrocloruro de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico**

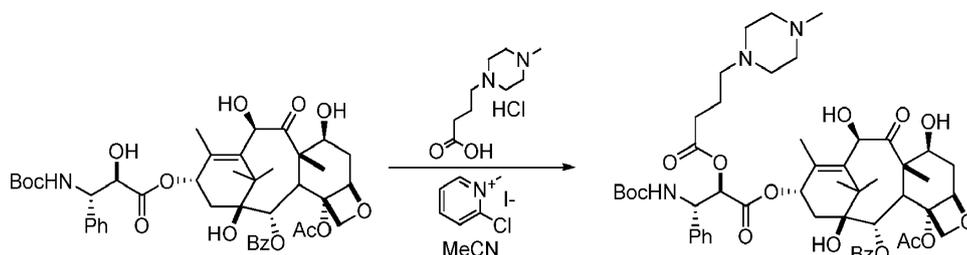
Se añadió 1-metil piperazina (7,68 mL, 70 mmoles, 4 equivalentes) a una solución agitada de 4-bromobutanonato de etilo (2,5 mL, 17,3 mmoles) en acetato de etilo (50 mL) a temperatura ambiente. La solución se agitó a 25°C durante 1 h con evolución de un precipitado de color blanco, y a continuación se calentó en un baño de aceite a 70°C durante 1 h. El análisis mediante TLC (acetato de etilo al 20% (EtOAc) en hexanos, R_f = 0,9 (sustancia de partida), 0,1 (producto), visualizado con yodo, 12) indicó el consumo completo del reactivo de bromuro. La reacción se diluyó con EtOAc (100 mL), se transfirió a un embudo de decantación y la fase orgánica se lavó con agua (100 mL), bicarbonato de sodio (NaHCO₃, saturado, 2 x 100 mL), salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de magnesio (MgSO₄) y se concentra para proporcionar un aceite de color ligeramente amarillo. El aceite se disolvió en cloruro de metileno (20 mL) y se cargó en un tapón pre-equilibrado de gel de sílice (EtOAc al 20% en hexanos, 150 mL de SiO₂). El producto deseado se eluyó de la sílice con eluyente cada vez más polar (primero con EtOAc al 20% en hexanos, a continuación con MeOH al 5-25% (que contenía NH₄OH al 5%) en EtOAc).

Las fracciones que contenían la sustancia deseada se agruparon y se concentraron para proporcionar butanoato de etil-4-(4-metilpiperazin-1-ilo) (3,63 g, cuantitativo). Se añadieron agua (20 mL) y ácido clorhídrico (HCl, 10 M, 20 mL, 10 equivalentes) al matraz que contenía el aceite resultante. El matraz se equipó con un condensador de reflujo y se calentó a 110°C durante 3 h. A continuación, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se concentró a vacío hasta que solo quedó un residuo oleoso. El residuo se volvió a disolver en agua destilada y se repitió el procedimiento de concentración. El jarabe restante se disolvió en etanol (50 mL) a 85°C. Se requirió la adición de una pequeña cantidad de agua (~1 mL) para disolver todos los sólidos (la adición de volúmenes más grandes de agua afectará adversamente al rendimiento). La solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas y a continuación se transfirió a un refrigerador (5°C) durante 16 horas. El precipitado se separó mediante filtración, se transfirió a un vial previamente pesado y se colocó en un desecador sobre Drierite a alto vacío durante 16 h para obtener hidrocloruro de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico en forma de una sustancia cristalina y no higroscópica (3,02 g, 80% basado en la sal mono HCl).

RMN H¹ (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) = 3,60 (s ancho, 8H), 3,26-3,22 (m, 2H), 2,93 (s, 3H), 2,43 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 1,99-

1,91 (m, 2H), RMN C13 (D₂O, 100 MHz) (ppm) = 176,5, 55,9, 50,2, 48,7, 42,8, 30,3, 18,7.

Esterificación y formación de sal. Sal hidrocloreto de TD-1



5

Se añadió trietilamina (NEt₃, 10,0 mL, 5 equivalentes) a una solución agitada de docetaxel (3,997 g, 4,95 mmoles) e hidrocloreto de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico (1,213g, 5,44 mmoles, 1,1 equivalentes) en diclorometano (CH₂Cl₂, 60 mL). El recipiente de reacción se enfrió a continuación en un baño de hielo y se añadió reactivo de Mukaiyama (yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio, 1,667 g, 6,53 mmoles, 1,32 equiv.). La solución viró a color amarillo con la disolución de la sal de piridinio. El matraz se retiró del baño de hielo después de 30 minutos y la reacción se dejó continuar durante 16 h adicionales. La TLC indicó una buena conversión, pero incompleta, de la sustancia de partida al producto deseado (MeOH al 8% (con NH₄OH al 5%) en CH₂Cl₂, teñido con H₂SO₄ al 5% en etanol). Se añadieron 0,5 equivalentes adicionales de la sal de piridinio (0,632 g, 0,5 equiv.) y se añadió aminoácido (0,120 g, 0,1 equiv.) a la solución enfriada con hielo mientras se agitaba. Después de 3 h, la mezcla de reacción se concentró en un evaporador rotativo a alto vacío para proporcionar un sólido de color ligeramente naranja. El sólido se disolvió en CH₂Cl₂ (150 mL) y EtOAc (20 mL), se transfirió a un embudo de separación y se repartió entre la fase orgánica y una solución saturada de NaHCO₃ (100 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera (100 mL) y se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para proporcionar un jarabe ligeramente dorado. El jarabe se disolvió en CH₂Cl₂ (20 mL), se cargó en una columna de gel de sílice pre-equilibrada (MeOH al 4% (con NH₄OH al 5%) en CH₂Cl₂, 250 mL, 40 mm de diámetro) y se eluyó con un disolvente cada vez más polar (MeOH al 4-10% (con NH₄OH al 5%) en CH₂Cl₂, incrementos de 2%, 500 mL/incremento).

Las fracciones que contenían la sustancia deseada se recogieron y se concentraron para producir 3,8909 g (80,5%) de compuesto. El análisis de RMN H¹ del compuesto indicó una buena pureza, con la presencia (-10%) de picos atribuidos a un regioisómero. El sustancia se volvió a disolver en CH₂Cl₂ y se sometió a las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente, utilizando incrementos de MeOH al 1% en CH₂Cl₂ del 5-10% (500 mL/incremento). Las fracciones que contenían la sustancia pura se identificaron mediante TLC, se recogieron y se concentraron para proporcionar 2,96 g de compuesto con un espectro de RMN limpio.

La sustancia se disolvió en 2-propanol (45 mL) y se añadió HCl (6,3 mL, 1 M en dietiléter (Et₂O), gota a gota 2,05 equivalentes) enfriando (0°C) para generar la sal hidrocloreto. La suspensión se concentró hasta sequedad y el sólido de color crema resultante se secó a alto vacío y se recrystalizó en 2-propanol (45 mL) mediante la adición de Et₂O (10 mL). El producto precipitado se separó mediante filtración en un embudo Buchner y se secó a alto vacío durante 18 h, obteniéndose aproximadamente 2,5 g. El derivado de docetaxel (TD-1) se caracterizó mediante RMN, espectroscopia de masas, análisis elemental y UHPLC-UV para confirmar la identidad y la pureza. La pureza cromatográfica mediante UHPLC-UV fue de 96,7%.

RMN H¹ (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8,11 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,65 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,56 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,43-7,37 (m, 4H), 7,25 (t ancho, J = 6,2 Hz, 1H), 6,09 (m, 1H), 5,61 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,27-5,24 (m, 2H), 4,99 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,22-4,13 (m, 3H), 3,83 (d ancho, J = 6,8 Hz, 1H), 3,61 (s, 1H), 3,21-3,09 (m, 2H), 2,67-2,33 (m, 6H), 2,23-2,17 (m, 1H), 2,12-1,98 (m, 2H), 1,97-1,76 (m, 5H), 1,68 (s, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H).

RMN C¹³ (100 MHz, D₂O) □: δ (ppm) = 211,22, 173,26, 172,48, 170,57, 167,58, 157,22, 138,72, 136,13, 134,48, 129,96, 129,29, 129,00, 128,77, 126,95, 84,49, 80,87, 78,51, 75,55, 75,54, 74,26, 72,65, 71,28, 57,39, 55,59, 50,32, 48,78, 46,29, 42,83, 42,68, 35,25, 34,73, 30,13, 29,83, 29,60, 27,51, 25,900, 23,69, 22,43, 20,75, 18,77, 16,78, 13,60, 9,55.

Análisis elemental: calculado basándose en TD-1 + 2HCl + 1H₂O: C, 58,53; H, 6,90; Cl, 6,65; N, 3,94; Obs.: C, 58,50; H, 6,97; Cl, 6,58; N, 4,13; HPLC/MS (m/z); 977.4 (m + H), área de 96,7% mediante UPLC-UV.

Análogos de TD1

TD1 contiene un éster de aminoácido dibásico en O-2' que se cree que ayuda en la liberación dirigida del compuesto parental (docetaxel) a través de la participación del grupo vecino. Se sintetizaron una serie de análogos de TD1

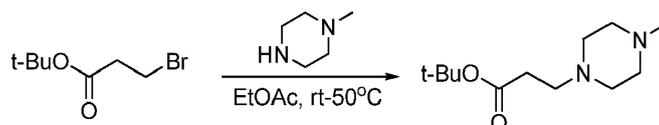
como se describe a continuación. Los análogos tienen variaciones en la longitud de la cadena del conector aminoacilo y la estructura del radical aminoacilo alcalino diseñado para modular la velocidad de hidrólisis del éster a través de ayuda anquimérica (Pop et al., *Pharmaceutical Research*, 13(3): 469-475 (1996); Rautio y col., *J. Med. Chem.*, 43(3): 1489-1494 (2000)), permitiendo que la velocidad a la que se libera el compuesto parental se ajuste para diversas aplicaciones terapéuticas.

Para una reacción de cierre de anillo, se favorecen los estados de transición de anillo de 3-7 miembros cuando el centro de reacción es sp^2 hibridado, como en el caso de hidrólisis de éster intramolecular. Existen dos modos posibles de hidrólisis: Modo A, en el que la amina actúa directamente en el carbonilo para generar el fármaco parental y un intermedio acil-amonio activado; y el Modo B, en el que la amina actúa como una base general para aumentar el carácter nucleófilo del disolvente (agua en este caso), aumentando así la velocidad de hidrólisis y expulsando el aminoácido bipolar. Los análogos de TD1 sintetizados más abajo permiten todos la hidrólisis mediante el Modo A. Solo los ésteres de aminoácidos más cortos ($n = 1-3$) permiten la hidrólisis mediante el Modo B.

En la primera serie de análogos, la unidad de solubilización de base débil comprende un radical piperazinilamino con un conector alquílico de longitudes variables con respecto a TD1. En la siguiente serie de análogos, se utilizaron los mismos conectores alquílicos y el radical amino se varió para incluir los sustituyentes morfolino y piperidinilo. El carácter nucleófilo de los radicales amino varía de acuerdo con el orden: *n*-metilpiperazina > morfolina > piperidina (p.ej., Baldwin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 734-736 (1976); Baldwin et al., *J. Org. Chem.*, 42(24):3846-3852 (1977)). La alcalinidad es invertida, teniendo la *n*-metilpiperidina un pK_a 2 unidades mayor que la *n*-metilpiperazina. Como tal, se espera que los compuestos de *N*-metilpiperazina sean más susceptibles de hidrólisis en Modo A y requieran valores de pH más bajos para lograr la protonación.

***N*-alquilación a amino-éster (procedimiento general)**

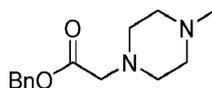
3-(4-Metilpiperazin-1-il)propanoato de *tert*-butilo



Se añadió 4-metilpiperazina (7,68 mL, 70 mmoles, 4 equiv.) a una solución agitada de 3-bromopropionato de *tert*-butilo (3,0 mL, 18 mmoles) en acetato de etilo (15 mL) a 0°C. La solución se agitó a 25°C durante 1 h con evolución de un precipitado blanco, a continuación se calentó en un baño de aceite a 55°C durante 2 h. El análisis de TLC (EtOAc al 20% en hexanos, $R_f = 0,9$ (sustancia de partida), 0,1 (producto)) indicó el consumo completo del reactivo bromuro. La reacción se diluyó con EtOAc (100 mL) y se transfirió a un embudo de decantación, y la fase orgánica se lavó con agua (100 mL), NaHCO_3 (sat., 2 x 100 mL) y salmuera (100 mL), se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar un aceite de color ligeramente amarillo. El aceite se disolvió en cloruro de metileno (20 mL), se cargó en un tapón de gel de sílice previamente equilibrado (20% de EtOAc en hexanos, 150 mL de SiO_2) y el producto deseado se eluyó de la sílice con eluyente cada vez más polar (EtOAc en hexanos, comenzando en 20%, incrementando los volúmenes de 200 mL en incrementos de 15% a 100%). Las fracciones que contenían la sustancia deseada se concentraron para proporcionar 3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoato de *tert*-butilo (4,1 g, cuantitativo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3,45 (d, $J = 3$ Hz, 2H), 2,64 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,47 (s ancho, 6H), 2,38 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 1,42 (s, 9H).

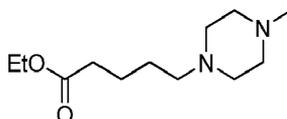
Se utilizó el mismo procedimiento general para preparar los siguientes análogos:

2-(4-Metilpiperazin-1-il)acetato de bencilo



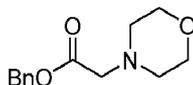
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,33-7,27 (m, 5H), 5,15 (s, 2H), 3,25 (s, 2H), 2,60 (s ancho, 4H), 2,48 (s ancho, 4H), 2,27 (s, 3H).

5-(4-Metilpiperazin-1-il)pentanoato de etilo



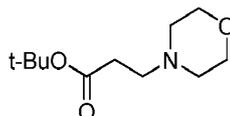
RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,43 (s ancho, 6H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,26 (s, 3H), 1,79 (s ancho, 2H), 1,62 (p, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,54-1,46 (m, 2H), 1,23 (t, 7,2 Hz).

5 **2-Morfolinoacetato de bencilo (Comparativo)**



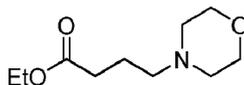
10 RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7,46-7,30 (m, 5H), 5,16 (s, 2H), 3,74 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H), 3,25 (s, 2H), 2,58 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H).

3-Morfolinopropanoato de *terc*-butilo (Comparativo)



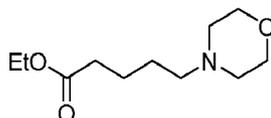
15 RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 3,68 (t, $J = 4,5$, 5H), 2,63 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,44 (t, $J = 4,5$ Hz, 4H), 2,39 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,44 (s, 9H).

20 **4-Morfolinobutanoato de etilo (Comparativo)**



25 RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 4,11 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,68 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H), 2,42-2,38 (m, 4H), 2,37-2,31 (m, 4H), 1,80 (p, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,24 (q, $J = 7,1$ Hz, 3H).

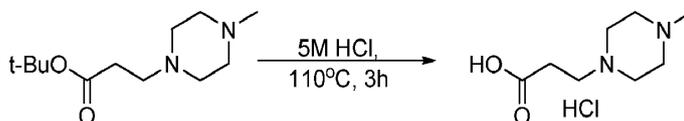
5-Morfolinopentanoato de etilo (Comparativo)



30 RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 4,11 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,68 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H), 2,42-2,38 (m, 4H), 2,37-2,27 (m, 4H), 1,80-1,73 (m, 2H), 1,53-1,45 (m, 2H), 1,24 (q, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Hidrólisis a aminoácido (procedimiento general)

35 **Hidrocloreto de ácido 3-(4-metilpiperazin-1-il) propanoico (TD11)**



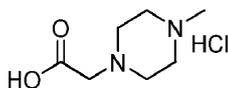
40 A un matraz de fondo redondo que contenía 3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoato de *terc*-butilo (4,1 g, 18 mmoles), se le añadieron una barra de agitación magnética, agua (20 mL) y HCl (10M, 20 mL, 10 equiv.). El matraz se equipó con un condensador de reflujo, se colocó en un baño de aceite y se calentó a una temperatura del baño de 110°C durante 3 h. No se realizó un análisis de TLC de esta reacción. La reacción se retiró del baño de aceite y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez que la reacción se había enfriado lo suficiente, se transfirió a un evaporador rotativo conectado a una bomba de alto vacío accionada por aceite. Los contenidos del matraz se concentraron hasta que la presión fue de 0,1 mm Hg y solo quedó un residuo oleoso. A continuación se retiró el matraz, el contenido se volvió a disolver en agua destilada y se repitió el procedimiento de evaporación, esta vez produciendo un jarabe que formaba espuma cuando se sometía a alto vacío después de la eliminación del agua. Se debe tener en cuenta que si la sustancia bruta tiene una cantidad significativa de HCl residual, el ácido se reesterificará cuando se lo someta a las siguientes condiciones de cristalización, lo que afectará negativamente al rendimiento. Se añadieron etanol (50 mL) y una barra de agitación magnética y el matraz se sumergió en un baño de aceite a 85°C

para disolver el jarabe. Incluso a reflujo, no se disolvería toda la sustancia, por lo que se añadió gota a gota una pequeña cantidad de agua (1 mL) hasta que se disolvieron todos los sólidos. Si se agregan cantidades excesivas de agua en este momento, esto afectará negativamente al rendimiento.

- 5 La solución resultante se retiró del baño de aceite y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 h antes de transferirla a un refrigerador (5°C) durante 16 h. Los sólidos se suspendieron mediante sonicación para desprenderlos de los lados del matraz y se filtraron en un embudo Buchner forrado de papel de filtro. A continuación, los cristales se transfirieron a un vial previamente pesado que se colocó en un desecador sobre Drierite, a alto vacío durante 16 h para obtener una sustancia sólida, resistente al aire, cristalina y no higroscópica (3,07 g, 82% basado en la sal mono-HCl). RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,6 (s ancho, 8H), 3,48 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,93 (s, 3H), 2,83 (t, J = 6,8 Hz, 2H).

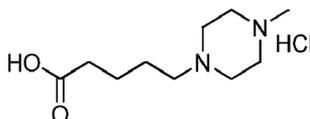
Se utilizó el mismo procedimiento general para preparar los siguientes análogos:

15 **Hidrocloruro de ácido 2-(4-metilpiperazin-1-il) acético (TD2)**



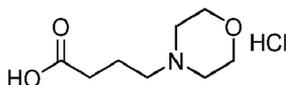
- 20 RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,87 (s, 2H), 3,85-3,35 (m ancho, 8H), 2,93 (s, 3H).

Hidrocloruro de ácido 5-(4-metilpiperazin-1-il) pentanoico (TD3)



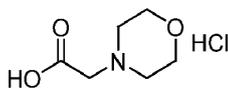
- 25 RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,59 (s ancho, 8H), 3,22 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,93 (s, 3H), 2,36 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,75-1,69 (m, 2H), 1,57 (p, J = 7,8 Hz).

Hidrocloruro de ácido 4-morfolinobutanoico (TD4) (Comparativo)



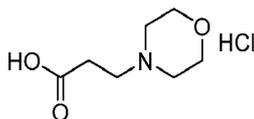
- 30 RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 4,02 (d ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,73 (t ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,46 (d ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,15-3,06 (m, 4H), 2,41 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,97-1,89 (m, 2H).

35 **Hidrocloruro de ácido 2-morfolinoacético (TD5) (Comparativo)**



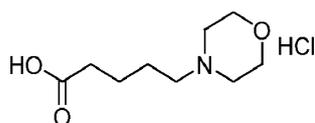
- 40 RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 4,10-3,70 (m, 6H), 3,50 (s ancho, 2H), 3,2 (s ancho, 2H).

Hidrocloruro de ácido 3-morfolinopropanoico (TD6) (Comparativo)



- 45 RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 4,02 (d ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,73 (t ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,46 (d ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 3,39 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,13 (t ancho, J = 12,3 Hz, 2H), 2,79 (t, J = 7,0 Hz, 2H).

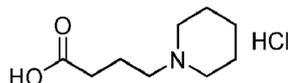
Hidrocloruro de ácido 5-morfolinopentanoico (TD12) (Comparativo)



RMN H^1 (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 4,02 (d ancho, $J = 12,3$ Hz, 2H), 3,73 (t ancho, $J = 12,3$ Hz, 2H), 3,46 (d ancho, $J = 12,3$ Hz, 2H), 3,15-3,06 (m, 4H), 2,41 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,72-1,66 (m, 2H), 1,60-1,52 (m, 2H).

5

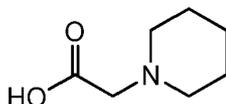
Hidrocloruro de ácido 4-(piperidin-1-il)butanoico (TD7) (Comparativo)



RMN H^1 (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,43 (d ancho, $J = 12,1$ Hz, 2H), 3,04-2,99 (m, 2H), 2,88 (td, $J = 2,7, 12,1$ Hz, 2H), 2,38 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,95-1,80 (m, 4H), 1,76-1,55 (m, 3H), 1,45-1,32 (m, 1H).

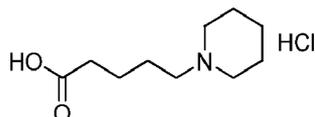
10

Hidrocloruro de ácido 2-(piperidin-1-il)acético (TD8) (Comparativo)



15

Hidrocloruro de ácido 5-(piperidin-1-il)pentanoico (TD9) (Comparativo)

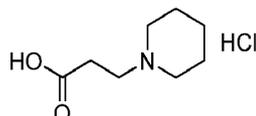


20

RMN H^1 (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,43 (d ancho, $J = 12,1$ Hz, 2H), 3,04-2,99 (m, 2H), 2,80 (td, $J = 2,7, 12,1$ Hz, 2H), 2,38 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,88-1,78 (m, 2H), 1,76-1,49 (m, 7H), 1,45-1,32 (m, 1H).

Hidrocloruro de ácido 3-(piperidin-1-il)propanoico (TD13) (Comparativo)

25

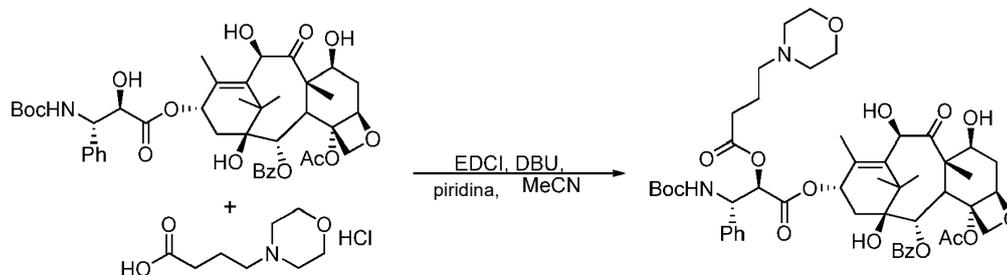


RMN H^1 (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) = 3,43 (d ancho, $J = 12,1$ Hz, 2H), 3,29 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,88 (td, $J = 2,7, 12,1$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,85-1,80 (m, 2H), 1,76-1,62 (m, 3H), 1,45-1,32 (m, 1H).

30

2'-O-acilación (procedimiento general)

TD4: Éster de ácido morfolinobutanoico (Comparativo)



35

Una solución agitada de hidrocloreuro de ácido 4-morfolinobutanoico (0,095 g, 0,45 mmoles, 1,2 equiv.) en piridina (4 mL) y DBU (0,140 mL, 3 equiv) en un matraz de fondo redondo de 25 mL se enfrió en un baño de hielo a $0^{\circ}C$ y se añadió acetonitrilo (2 mL), seguido de **Taxotere®** (0,303g, 0,375 mmoles, 1 equiv. Se añadió 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 0,180 g, 2,5 equiv.) en porciones durante 15 minutos. La suspensión

40

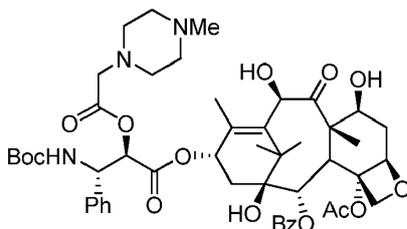
resultante se agitó, calentando gradualmente a temperatura ambiente a medida que el baño de hielo se fundía en el transcurso de 16 h. El análisis de TLC (hexanos al 30% en EtOAc/MeOH al 6% (enriquecido con NH₄OH al 5%) reveló una conversión casi completa en este momento. Se añadió etanol (2 mL) y el matraz se transfirió a un evaporador rotativo y se concentró a alto vacío. El aceite resultante se volvió a disolver en etanol y se concentró de nuevo. El residuo seco se disolvió en cloruro de metileno (~4 mL) y se cargó en una columna de gel de sílice previamente equilibrada (60 mL de sílice, hexanos al 30% en EtOAc/MeOH al 2% (enriquecido con NH₄OH al 5%) y se eluyó con mezclas disolventes cada vez más polares (MeOH al 2-8%, incrementos de 2%, 100 mL/incremento). Las fracciones que contenían la sustancia deseada se agruparon y se concentraron para proporcionar el compuesto deseado (0,255 g, 71%).

RMN H¹ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 8,11 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,71-7,48 (m, 3H), 7,48-7,31 (m, 4H), 7,25 (m, 1H), 6,09 (m, 1H), 5,63 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,40-5,16 (m, 3H), 4,99 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,28-4,13 (m, 3H), 3,86 (d ancho, *J* = 6,8 Hz, 1H), 3,64 (m, 4H), 2,67-2,10 (m, 14H), 1,99-1,72 (m, 7H), 1,68 (s, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H).

El sustancia se recristalizó en EtOAc/hexanos y se utilizó para pruebas biológicas y de solubilidad. Después de la recristalización, HPLC/MS (m/z); 963,2 (m + H) 99,8% de área mediante UV.

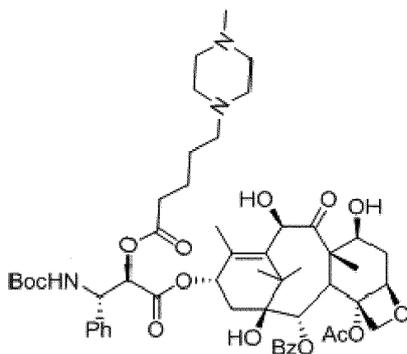
Se utilizó el mismo procedimiento general para generar los siguientes análogos:

TD2: Éster de ácido N-metil-piperazinilacético



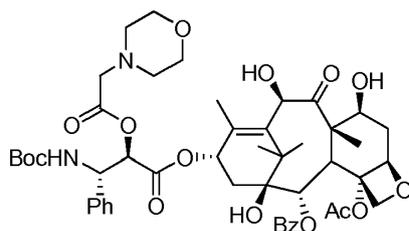
RMN H¹ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 8,11 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,66 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,41 (m, 4H), 7,25 (m, 1H), 6,08 (m, 1H), 5,62 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,42 (d, 2H), 5,27 (s, 1H), 4,99 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,29-4,13 (m, 3H), 3,85 (d ancho, *J* = 6,8 Hz, 1H), 3,42-3,33 (m, 3H), 2,71-2,27 (m, 16H), 2,03 (q, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,68 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 949,4 (m + H) 95% de área mediante UV.

TD3: Éster de ácido N-metil-piperazinil pentanoico



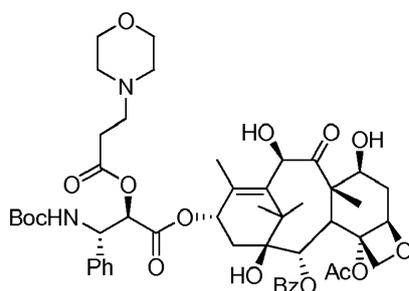
RMN H¹ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 8,11 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,66 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,41 (m, 4H), 7,25 (m, 1H), 6,08 (m, 1H), 5,62 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,37-5,18 (m, 3H), 4,99 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,29-4,13 (m, 3H), 3,85 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 3,63-3,48 (m, 5H), 2,80-2,27 (m, 24H), 2,27-2,13 (m, 1H), 2,03 (q, 2H), 1,97-1,54 (m, 19H), 1,57-1,49 (m ancho, H), 1,39 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 990,6 (m + H) 96% de área mediante UV.

TD5: Éster de ácido morfolinoacético (Comparativo)



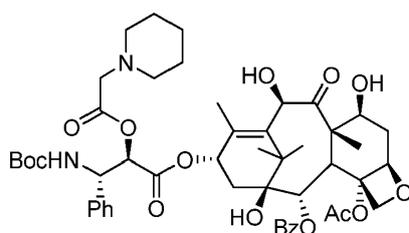
5
 RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8,12 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,64 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,59-7,50 (m, 2H), 7,44-7,34 (m, 4H), 7,32-7,20 (m, 1H), 6,16 (m, 1H), 5,64 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 5,42 (d ancho, 2H), 5,27 (s, 1H), 5,01 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,27-4,15 (m, 3H), 3,89 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 3,71-3,58 (m, 4H), 3,38 (d, 1H), 2,54-2,26 (m, 9H), 2,12-2,01 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,87- 1,76 (m, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 936,1 (m + H) 98% de área mediante UV.

10
TD6: Éster de ácido morfolinopropiónico (Comparativo)



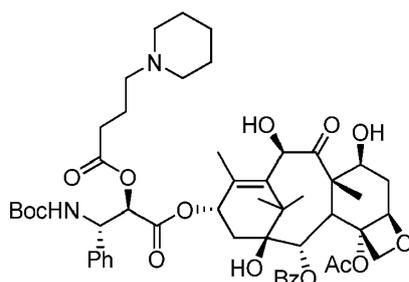
15
 RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,66 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,61-7,50 (m, 2H), 7,45-7,33 (m, 4H), 7,30-7,20 (m, 1H), 6,09 (m, 1H), 5,63 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 5,39-5,16 (m, 3H), 5,00 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,27-4,13 (m, 3H), 3,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 3,70-3,54 (m, 4H), 2,72-2,56 (m, 4H), 2,52-2,29 (m, 8H), 2,29-2,14 (m, 1H), 1,99-1,86 (m, 4H), 1,86-1,75 (m, 2H), 1,68 (m, 13H), 1,39 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 950,9 (m + H) 94% de área mediante UV.

20
TD8: Éster de ácido piperidinilacético (Comparativo)



25
 RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8,16 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,54 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,44-7,34 (m, 4H), 7,27 (m, 1H), 6,17 (m, 1H), 5,65 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 5,49-5,38 (m, 2H), 5,28 (s, 1H), 5,01 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,24-4,15 (m, 3H), 3,90 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 3,36-3,32 (m, 1H), 3,19-3,11 (m, 1H), 2,57-2,25 (m, 9H), 2,16-2,06 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,87-1,76 (m, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,65-1,50 (m, 4H), 1,40-1,22 (m, 11H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 933,8 (m + H) 94% de área mediante UV.

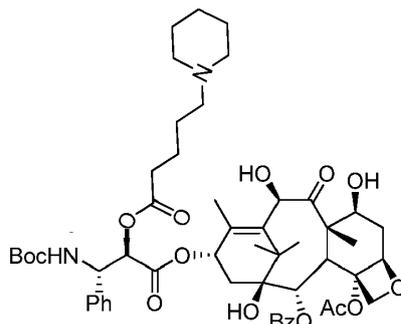
30
TD7: Éster de ácido piperidinilbutanoico (Comparativo)



RMN H^1 (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,65 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,56 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,44-7,33 (m, 4H), 7,29-7,20 (m, 1H), 6,09 (m, 1H), 5,63 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 5,36-5,30 (m, 1H), 5,29-5,26 (m, 2H), 5,03-4,95 (m, 1H), 4,27-4,14 (m, 3H), 3,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,59-2,16 (m, 15H), 2,01-1,75 (m, 8H), 1,68 (s, 3H), 1,64-1,54 (m, 5H), 1,47 (m, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 962,5 (m + H) 94% de área mediante UV.

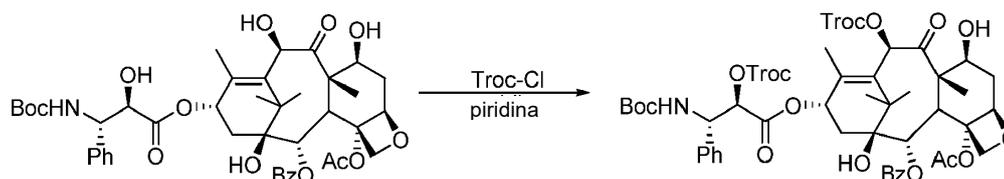
TD9: éster de ácido pentanoico piperidinil (Comparativo)

RMN H^1 (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,66 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,57 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,45-7,33 (m, 4H), 7,25 (s ancho, 1H), 6,08 (m, 1H), 5,62 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 5,31 (m, 1H), 5,28-5,18 (m, 2H), 4,99 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,27-4,15 (m, 3H), 3,85 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,51-2,18 (m, 17H), 1,97-1,75 (m, 5H), 1,75-1,46 (m, 20H), 1,43-1,38 (m, 10H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 976,2 (m + H) 96% de área mediante UV.



Acilación de 7-OH (procedimiento general)

Protección: GCW00006-09

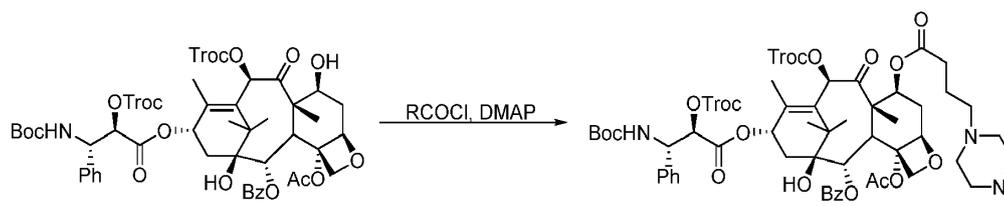


A una solución agitada, enfriada ($-45^\circ C$) de docetaxel (0,746 g, 0,923 mmoles) en cloruro de metileno (20 mL) y piridina (1,6 mL) se le añadió cloroformiato de tricloroetilo (Troc-Cl, 0,137 mL, 1,01 mmoles, 1,1 equiv) gota a gota. La reacción se dejó agitando durante 1 h a temperatura reducida, y se añadió gota a gota una segunda porción igual de Troc-Cl (0,137 mL, 1,01 mmoles, 1,1 equiv.). La reacción se dejó calentando gradualmente a temperatura ambiente con agitación durante el transcurso de las siguientes 16 h. En ese momento, el análisis de TLC (EtOAc al 30% en hexanos) indicó que quedaba una cantidad mínima de sustancia de partida y la formación de tres nuevas manchas que se supone son los compuestos protegidos con 2',10-di-Troc, 2',7-di-Troc y 2',7,10-tri-Troc. La reacción se diluyó con una cantidad mínima de etanol y se concentró hasta sequedad en un evaporador rotativo equipado con alto vacío. El residuo se disolvió entonces en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 y se cargó en una columna pre-equilibrada de gel de sílice (3 cm x 20 cm, EtOAc al 20% en hexanos). La elución cuidadosa de los productos deseados de la columna utilizando mezclas solventes cada vez más polares (EtOAc al 20-60% en hexanos, volúmenes de 100 mL, incrementos de 5%), y la recolección y concentración de las fracciones limpias produjo el isómero deseado en forma de un sólido amorfo de color blanco (0,433 g, 40%).

RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8,11 (d, 2H), 7,61 (t, 1H), 7,51 (t, 2H), 7,45-7,33 (m, 5H), 6,29 (m, 1H), 6,16 (s, 1H), 5,69 (d, 1H), 5,59-5,56 (m, 1H), 5,55-5,42 (m, 2H), 5,35 (s ancho, 1H), 4,96 (d ancho, 1H), 4,89 (d, 1H), 4,76 (q, 2H), 4,69 (d, 1H), 4,41-4,37 (m, 1H), 4,32 (d, 1H), 4,18 (d, 1H), 3,96-3,91 (m, 3H), 3,78 (d, 1H), 2,61-2,53 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,39-2,18 (m, 3H), 2,11-1,76 (m, 11H), 1,73 (s ancho, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,32 (s, 9H), 1,28-1,17 (m, 6H).

Se utilizó el mismo procedimiento general para generar los siguientes análogos:

Esterificación: GCW00006-10

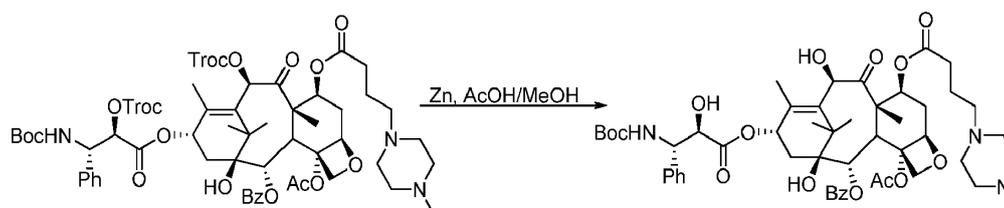


A un matraz de fondo redondo que contenía hidrocloreto de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico (0,58 g, 2,61 mmoles) y una barra de agitación magnética se le añadió cloruro de tionilo (15 mL). La solución resultante se calentó a reflujo durante 1,5 h, se enfrió a temperatura ambiente, se concentró en un evaporador rotativo, se suspendió en tolueno anhidro (10 mL), se concentró nuevamente en un evaporador rotativo para producir un sólido de color blanco y se secó en una línea de alto vacío para 3 horas hasta un peso constante que no desprendió olor a cloruro de tionilo o ácido clorhídrico.

A una solución de GCW00006-09 (0,433 g, 0,375 mmoles) en cloruro de metileno (Dri-Solve, 8 mL), que contenía un agitador magnético, se le añadió N,N-dimetilamino-piridina (DMAP, 0,229 g, 5 equiv.). La solución se enfrió a 0°C y se añadió en porciones el hidrocloreto de cloruro de aminoacilo descrito anteriormente (0,100 g, 1,1 equiv.) durante el transcurso de un par de minutos. La reacción se siguió basándose en el análisis de TLC del consumo de sustancia de partida, ya que la DMAP tendía a eluirse conjuntamente con el producto mono-amino acilado. Después de 2 h, todavía se observó algo de sustancia de partida restante mediante TLC y se añadió una porción adicional del hidrocloreto de cloruro de aminoacilo (0,05 g, 0,55 equiv.). Después de una hora adicional con agitación a temperatura ambiente, la TLC indicó un consumo casi completo de la sustancia de partida. La reacción se concentró en un evaporador rotativo para proporcionar un aceite que se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ (5 mL) y se cargó en una columna de sílice pre-equilibrada (3 cm x 20 cm, 4: 1 CH₂Cl₂/Hexanos) y se sometió a cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂/Hexanos 4:1 con MeOH al 1-10% (que contenía NH₄OH al 5%). Las fracciones que contenían la sustancia deseada se recogieron y se concentraron para proporcionar un cristal incoloro (0,284 g, 57%).

RMN H¹ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 8,11 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,61 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,43-7,39 (m, 4H), 7,28-7,26 (m, 1H), 6,13-6,05 (m, 2H), 5,64 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 5,60-5,56 (m, 1H), 5,55-5,42 (m, 2H), 5,36-5,34 (m, 1H), 4,99 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 4,83 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 4,19 (dd, J = 8,2, 19,0 Hz, 1H), 3,85 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 2,67-2,22 (m, 20H), 2,05-1,89 (m, 4H), 1,82-1,71 (m, 6H), 1,40 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), HPLC/MS (m/z); 1325,7 (m + H) 83% de área mediante UV (contaminado con 10% de carbonato de metilo (m/z = 1210,4)).

Desprotección para formar TD10: éster de ácido 7-O-(N-metil-piperazinilbutanoico)



A una solución agitada vigorosamente de GCW00006-10 (0,276 g, 0,2 mmoles) en metanol y ácido acético (50 mL, AcOH al 10%) se le añadió polvo de cinc elemental (~0,1 g). La reacción se controló mediante TLC y en 1 h se consumió toda la sustancia de partida y se convirtió en una mancha de baja migración singular (MeOH al 10% (NH₄OH al 5% en peso) en CH₂Cl₂). La reacción se diluyó con MeOH (50 mL) y se filtró en un embudo Buchner revestido con papel de filtro. La solución resultante se concentró hasta sequedad en un evaporador rotativo para proporcionar un jarabe espeso que se disolvió en CH₂Cl₂ (5 mL) y se cargó en una columna de gel de sílice previamente equilibrada (3 cm x 15 cm, MeOH al 2% (con NH₄OH al 5%) en CH₂Cl₂) y se eluyó al aumentar el disolvente polar (MeOH al 2-10% (con NH₄OH al 5%) en CH₂Cl₂, incrementos de 2%, 150 mL/incremento). Las fracciones que contenían la sustancia limpia, según se determinó mediante TLC, se recogieron y se concentraron para proporcionar un sólido de color blanco (0,0764, 39%). La HPLC/MS indica una contaminación mínima (-10%) que contenía un sustituyente carbonato de metilo en una ubicación no determinada en el compuesto parental.

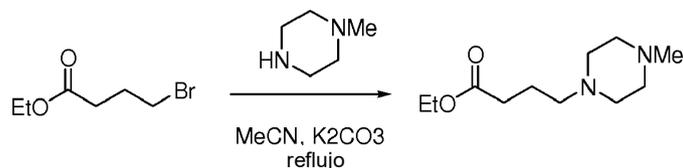
(m/z = 1035,3) RMN H¹ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 8,12 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,68 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,58 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,43-7,39 (m, 4H), 7,28-7,26 (m, 1H), 6,13-6,05 (m, 2H), 5,67 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 5,60-5,56 (m, 1H), 5,38 (s, 1H), 5,14 (s ancho, 1H), 5,01 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 4,52 (s ancho, 1H), 3,98 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 2,67-2,22 (m, 18H), 2,10-1,71 (m, 10H), 1,40 (s, 9H), 1,15 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), RMN C¹³ (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 209,32, 173,04, 172,30, 170,61, 166,25, 156,36, 145,92, 139,27, 138,27, 136,40, 133,20, 129,98, 129,78, 128,31, 128,19, 127,38, 126,83, 83,70, 80,46, 79,32, 77,75, 76,78, 74,86, 74,24, 74,03, 71,68, 71,00, 57,16, 57,00, 56,14, 54,18,

52,14, 46,06, 44,51, 42,98, 37,97, 35,41, 32,98, 31,33, 31,19, 27,30, 21,30, 21,69, 21,43, 21,28, 21,28, HPLC/MS (m/z); 977,1 (m + H) 85% de área mediante UV.

Ejemplo 3 Derivados de prednisona solubles en agua (Comparativo)

Éster de ácido N-metil-piperazinil-butanoico

Síntesis del Conector

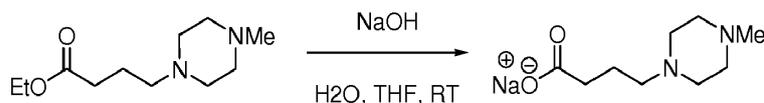


Una mezcla de 4-bromobutanoato de etilo (5,75 g, 29,5 mmoles; Aldrich Núm.167118) y 1-metilpiperazina (3,55 mL, 32,0 mmoles; Aldrich Núm. 130001) y K_2CO_3 anhidro (4,5 g, 32,5 mmoles; Fisher Núm. P208) en acetonitrilo (MeCN, 150 mL) se calentó a reflujo durante 18 h antes de concentrarse a *vacío*. La capa orgánica se separó a continuación y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (DCM, 3 x 150 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (150 mL) y se secaron (Na_2SO_4), y se concentraron a *vacío* para proporcionar 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoato de etilo (6,01 g, 96%) en forma de un aceite de color amarillo.

RMN H^1 ($CDCl_3$): 4,03 (q, 2H, J = 7,15 Hz), 2,29-2,44 (m, 7H), 2,21-2,28 (m, 5H), 2,18 (s, 3H), 1,67-1,75 (m, 2H), 1,18 (t, 3H, J = 7,14 Hz)

RMN C^{13} ($CDCl_3$): 174,4, 61,1, 58,5, 56,1, 54,0, 47,0, 33,2, 23,1, 15,2

ESI-MS: 215,1 [M + H] $^+$; 237,2 [M + Na] $^+$

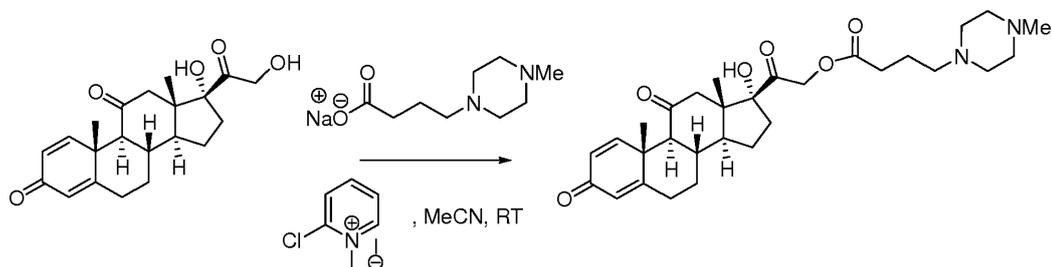


A una solución de 4-(4-metilpiperazin-1-il) butanoato de etilo (6,01 g, 28,1 mmoles) en tetrahidrofurano (THF, 150 mL) se le añadió una solución de NaOH (1,20 g, 30 mmoles) en agua (150 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h antes de concentrarla hasta sequedad para proporcionar 4-(4-metilpiperazin-1-il) butanoato de sodio (6,06 g, cuant.) Como un polvo blanco.

RMN C^{13} (MeOH- d_4): 181,0, 58,2, 54,2, 52,4, 44,8, 35,7, 23,2

ESI-MS: 187,3 [M + H] $^+$; 209,2 [M + Na] $^+$

Esterificación



A una suspensión de 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoato de sodio (128 mg, 0,615 mmoles) y prednisona (200 mg, 0,559 mmoles) en acetonitrilo (MeCN, 10 mL) se le añadió yoduro de 2-cloro-1-metil-piridinio (235 mg, 0,922 mmoles; Aldrich Núm. 198005). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h antes de sofocar con agua (30 mL). El producto se extrajo a continuación con acetato de etilo (EtOAc, 4 x 20 mL), se lavó con una solución ac. sat. de $NaHCO_3$ (3 x 20 mL) y salmuera (20 mL), se secó (Na_2SO_4), y se concentró a *vacío*. Se realizó una purificación adicional en una columna de gel de sílice (disolvente: NH_4OH al 1%, MeOH al 10%, diclorometano al 89%) para proporcionar la base libre de la prednisona derivatizada (108 mg, 36%) en forma de un sólido de color blanco.

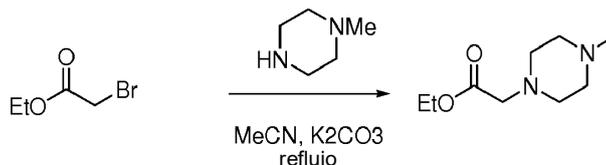
RMN ^1H (CDCl_3): 7,64 (d, 1H, $J = 10,40$), 6,08 (dd, 1H, $J = 10,40, 1,90$), 6,06 (t, 1H, $J = 2,90$), 5,06 (ABq, 2H, $J = 94,78, 17,81$), 2,85 (d, 1H, $J = 12,32$), 2,65 (t, 1H, $J = 12,57$), 2,56 - 1,06 (CM, 32H), 2,16 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 0,57 (s, 3H)

5 RMN ^{13}C (CDCl_3): 209,17, 205,05, 186,61, 172,86, 167,44, 155,93, 127,29, 124,31, 88,18, 67,78, 60,05, 57,30, 54,92, 52,73, 51,28, 49,97, 49,56, 45,89, 42,47, 36,00, 34,47, 33,64, 32,23, 31,63, 23,21, 21,93, 18,68, 15,30
MS: 527,4 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Éster del ácido n-metil-piperazinilacético

10

Síntesis del conector

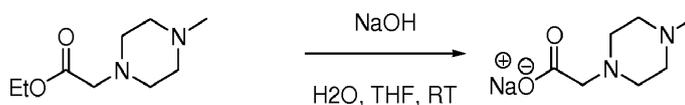


15 Una mezcla de 2-bromoacetato de etilo (4,93 g, 29,5 mmoles), 1-metilpiperazina (3,55 mL, 32,0 mmoles; Aldrich Núm.130001) y K_2CO_3 (4,5 g, 32,5 mmoles; Fisher Núm. P208) en CH_3CN (150 mL) se sometió a reflujo durante 18 h antes de concentrar a vacío. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con DCM (3 x 150 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (150 mL) y se secaron (Na_2SO_4), y se concentraron a vacío para proporcionar 4-(4-metilpiperzin-1-il)acetato de etilo (5,26 g, 96%) en forma de un aceite de color amarillo.

20

RMN ^1H (CDCl_3): 3,76 (q, 2H, $J = 7,14$ Hz), 2,76 (s, 3H), 2,30-1,90 (ancho, 4H), 0,85 (t, 3H, $J = 7,14$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3): 169,55, 59,90, 58,93, 54,44, 53,26, 52,47, 45,59, 13,84

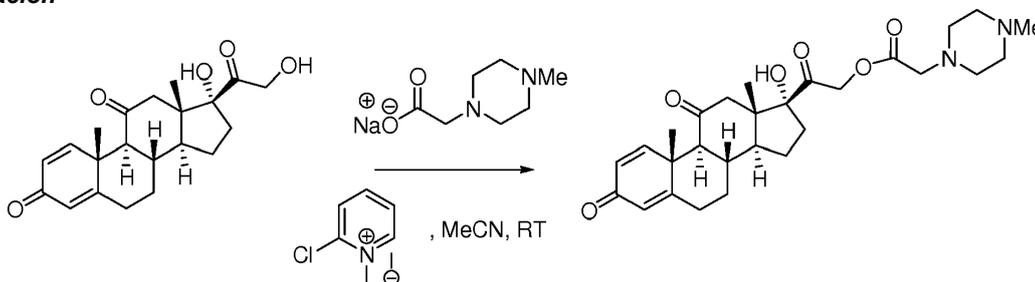
25 ESI-MS: 187 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 

30 A una solución de 2-4 (metilpiperazin-1-il)acetato de etilo (5,26 g, 28,3 mmoles) en THF (150 mL) se le añadió una solución de NaOH (1,20 g, 30 mmoles) en agua (150 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h antes de concentrarla hasta sequedad para proporcionar 4-(4-metilpiperazin-1-il)acetato de sodio (5,24 g, cuant.) en forma de un polvo de color blanco.

35 RMN ^{13}C (MeOH-d_4): 169,55, 59,90, 58,93, 54,44, 52,47, 45,59

ESI-MS: 187.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 209.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Esterificación



40

45 A una suspensión de 2-(4-metilpiperazin-1-il)acetato de sodio (111 mg, 0,615 mmoles) y prednisona (200 mg, 0,559 mmoles) en CH_3CN (10 mL) se le añadió yoduro de 2-cloro-1-metil-piridinio (235 mg, 0,922 mmoles; Aldrich Núm. 198005). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h antes de sofocar con agua (30 mL). El producto se extrajo a continuación con EtOAc (4 x 20 mL), se lavó con una solución ac. sat. de NaHCO_3 (3 x 20 mL) y salmuera (20 mL), se secó (Na_2SO_4), y se concentró a vacío. Se realizó una purificación adicional en una columna de sílice (disolvente: NH_4OH al 1%, MeOH al 10%, DCM al 89%) para proporcionar la prednisona derivatizada (154 mg, 38%) en forma de un sólido blanco.

RMN H^1 ($CDCl_3$): 7,71 (d, 1H, $J = 10,28$), 6,19 (dd, 1H, $J = 10,24, 1,96$), 6,07 (t, 1H, $J = 1,93$), 4,93 (ABq, 2H, $J = 124,45, 17,56$), 3,33 (s, 1H), 2,89 (d, 1H, $J = 13,36$), 2,84 - 1,17 (CM, 32H), 2,27 (s, 3H), 1,43 (s, 3H), 0,66 (s, 3H)

RMN C^{13} ($CDCl_3$): 208,88, 204,58, 186,58, 169,85, 167,06, 155,68, 127,49, 124,50, 88,38, 67,96, 60,22, 59,01, 54,73, 53,42, 52,71, 51,43, 49,67, 49,56, 46,00, 42,45, 36,06, 34,79, 33,73, 32,25, 23,26, 18,75, 15,45

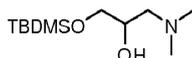
EM: 449,3 [M + H]⁺

Ejemplo 4 Derivados de prednisona lipófilos (Comparativo)

Conectores internos de Linoleilo

1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3-(dimetilamino)propan-2-ol

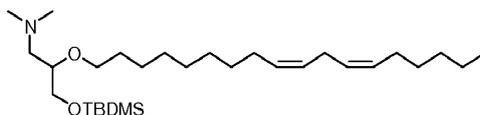
Una solución en diclorometano (10 mL) seco de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol (98%, 1,00 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) e imidazol (0,57 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) se agitó a 0°C bajo argón durante 15 minutos. Se añadió cloruro de *tert*-butildimetilsililo (1,26 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) a la mezcla y el producto resultante se agitó durante 2 horas a 0°C. La mezcla se diluyó a continuación con 20 mL de diclorometano y se vertió en agua desionizada (15 mL). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con dos porciones adicionales de diclorometano (20 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtró y se concentró para proporcionar 1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3-(dimetilamino)propan-2-ol bruto, un aceite claro espeso, que se utilizó sin purificación adicional.



RMN H^1 : 3,72-3,80 (m, 1H), 3,63 (d, 2H, $J = 5,19$), 2,34-2,46 (m, 2H), 2,33 (s, 6H), 0,91 (2, 9H), 0,08 (s, 6H)

3-(*tert*-butildimetilsililoxi)-N,N-dimetil-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-amina

Una solución en tolueno (10 mL) de 1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3-(dimetilamino)propan-2-ol bruto (1,0 g, 4,29 mmoles, 1,0 equiv.) se añadió cuidadosamente a una suspensión en tolueno (5 mL) de NaH (60%, 0,17 g, 4,29 mmoles, 1,0 equiv.) a 0°C bajo argón y el producto resultante se agitó durante 15 minutos. Se añadió gota a gota una solución en tolueno (5 mL) de metanosulfonato de linoleilo (1,47 g, 4,29 mmoles, 1,0 equiv.) a la mezcla en agitación y a continuación la reacción se agitó durante 18 horas a 90°C. La mezcla se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se detuvo mediante la adición lenta de etanol (10 mL). La mezcla se concentró y el residuo se recogió con agua desionizada (15 mL) y se extrajo tres veces con EtOAc (20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua desionizada (15 mL), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y concentraron. La purificación cromatográfica del residuo (MeOH al 0-5% en cloroformo) produjo 109 mg (rendimiento del 53%) de 3-(*tert*-butildimetilsililoxi)-N,N-dimetil-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-amina, un aceite espeso y claro.

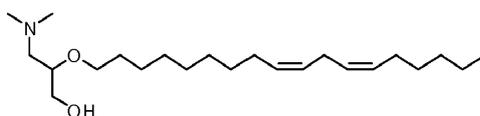


RMN H^1 : 5,28-5,42 (m, 4H), 3,47-3,62 (m, 4H), 3,37-3,42 (m, 1H), 2,77 (t, 2H, $J = 5,94$), 2,28-2,47 (m, 2H), 2,25 (s, 6H), 2,01-2,09 (m, 5H), 1,50-1,58 (m, 2H), 1,30 (ancho, 18H), 0,09 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

RMN C^{13} : 130,22, 130,01, 127,98, 127,88, 70,16, 63,07, 37,35, 32,79, 31,52, 29,59, 29,49, 29,39, 29,34, 29,32, 29,23, 29,15, 29,11, 29,00, 27,19, 25,72, 25,62, 25,40, 22,57, 14,07.

3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-ol

Se añadió TBAF (1,0 M en THF, 0,5 mL, 0,50 mmoles, 1,2 equiv.) en una porción a una solución en THF seco (100 μ L) de 3-(*tert*-butildimetilsililoxi)-N,N-dimetil-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-amina (0,2 g, 0,42 mmoles, 1,0 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentró y el residuo se repartió entre EtOAc (15 mL) y una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (10 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con 2 porciones adicionales de EtOAc (10 mL). Los extractos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron para proporcionar 3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-ol en bruto, un aceite espeso de color beige, que se usó sin más purificación.



RMN H¹: 5,29-5,43 (m, 4H), 3,77-3,82 (m, 1H), 3,65-3,71 (m, 1H), 3,42-3,51 (m, 3H), 2,78 (t, 2H, J = 5,97), 2,54-2,57 (m, 2H), 2,30 (s, 6H), 2,02-2,09 (m, 4H), 1,50-1,57 (m, 2H), 1,30 (ancho, 15H), 0,87-0,92 (m, 4H).

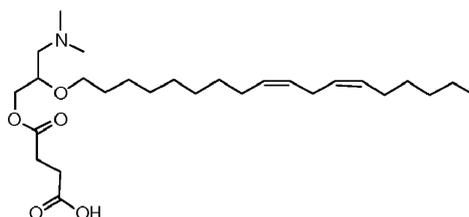
5

Ácido 4-(3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propoxi)-4-oxobutanoico

Se añadió anhídrido succínico (0,60 g, 5,99 mmoles, 1,1 equiv.) en una porción a una solución en THF seca (11 mL) de 3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propan-1-ol (2,0 g, 5,45 mmoles, 1,0 equiv.) y el resultante se sometió a reflujo durante 18 horas bajo argón. La mezcla se concentró y a continuación se disolvió en EtOAc (10 mL) y se vertió en agua desionizada (20 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con dos porciones adicionales de EtOAc (25 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron para proporcionar ácido 4-(3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)propoxi)-4-oxobutanoico bruto, un aceite espeso de color amarillo, que se usó sin purificación adicional.

10

15



RMN H¹: 5,29-5,43 (m, 4H), 4,28 (d, 1H, J = 11,25), 3,92-3,98 (m, 1H), 3,84 (ancho, 1H), 3,60-3,67 (m, 1H), 3,43-3,50 (m, 1H), 3,11-3,15 (d, 1H) J = 12,45), 2,75-2,79 (m, 2H), 2,67 (s, 6H), 2,53-2,65 (m, 5H), 2,01-2,08 (m, 4H), 1,53-1,57 (m, 2H), 1,29-1,30 (ancho, 18H), 0,87-0,91 (m, 3H).

20

RMN C¹³: 176,63, 172,55, 130,09, 129,98, 127,91, 127,84, 73,90, 69,90, 67,85, 62,54, 59,08, 44,11, 31,44, 30,53, 29,97, 29,93, 29,58, 29,42, 29,36, 29,27, 29,20, 27,14, 27,11, 26,04, 25,55, 22,50, 14,01.

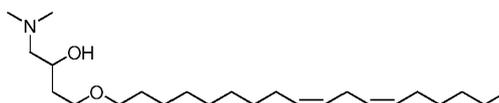
25 Conectores externos de Linoleilo

1-(dimetilamino)-4-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)butan-2-ol

Se añadió cuidadosamente gota a gota una solución en tolueno (10 mL) de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol (98%, 1,00 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) a una suspensión en tolueno (5 mL) de NaH (60%, 0,34 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) a 0°C bajo argón y el producto resultante se agitó durante 15 minutos. Se añadió gota a gota una solución de tolueno (5 mL) de metanosulfonato de linoleilo (2,87 g, 8,39 mmoles, 1,0 equiv.) a la mezcla en agitación y a continuación la reacción se agitó durante 18 horas a 90°C. La mezcla se enfrió a continuación a temperatura ambiente y se detuvo mediante la adición lenta de etanol (10 mL). La mezcla se concentró y el residuo se recogió con agua desionizada (20 mL) y se extrajo tres veces con EtOAc (30 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua desionizada (20 mL) y se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación cromatográfica del residuo (MeOH al 0-5% en cloroformo) proporcionó 1-(dimetilamino)-4-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)butan-2-ol, un aceite espeso, claro.

30

35



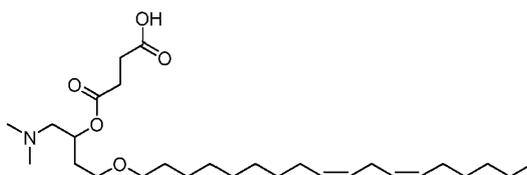
40

Ácido 4-(1-(dimetilamino)-4-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)butan-2-iloxi)-4-oxobutanoico

Se añadió anhídrido succínico (0,60 g, 5,99 mmoles, 1,1 equiv.) en una porción a una solución seca de THF (11 mL) de 1-(dimetilamino)-4-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)butan-2-ol (2,0 g, 5,45 mmoles, 1,0 equiv.) y el resultante se sometió a reflujo durante 18 horas bajo argón. La mezcla se concentró y el residuo se repartió entre EtOAc (10 mL) y agua desionizada (20 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con dos porciones adicionales de EtOAc (25 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtró y se concentró para proporcionar ácido 4-(1-(dimetilamino)-4-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxi)butan-2-iloxi)-4-oxobutanoico, un aceite espeso de color amarillo, que se utilizó sin purificación adicional.

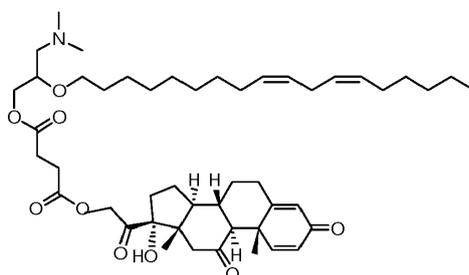
45

50



Esterificación de Prednisona con Conector Interno

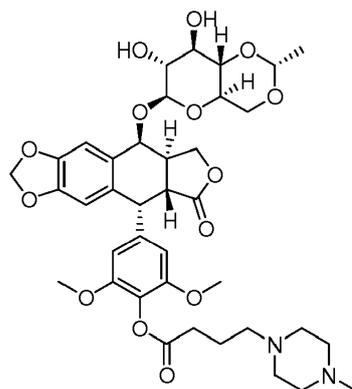
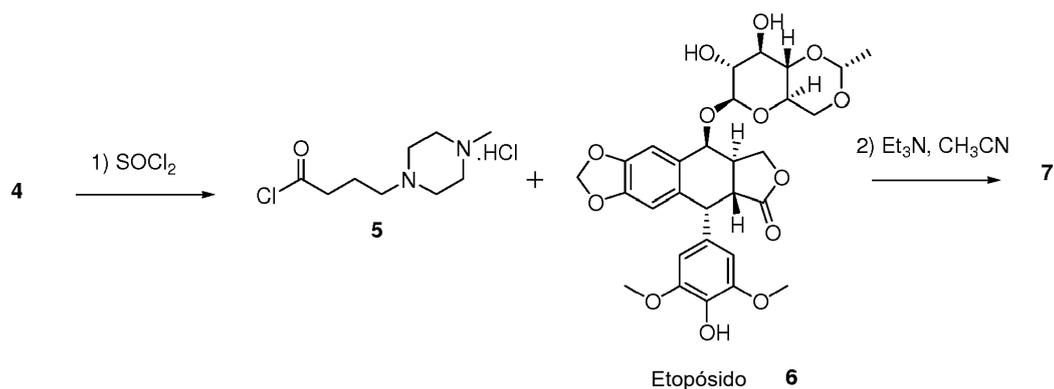
- 5 Se añadió gota a gota NEt_3 (100 μL , 0,74 mmoles, 1,0 equiv) a una solución en diclorometano (10 mL) de ácido 4-(3-(dimetilamino)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieniloxy)propoxi)4-oxobutanoico y el producto resultante se agitó durante 15 minutos bajo argón a temperatura ambiente. Se añadió PyBOP (0,48 g, 0,93 mmoles, 1,25 equiv.) en una porción y el resultante se agitó durante 10 minutos. Se añadió prednisona (0,32 g, 0,89 mmoles, 1,2 equiv.) a la mezcla y el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y a continuación se concentró para proporcionar un aceite espeso de color amarillo (puro en 90%). La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 5-15% en cloroformo y (MeOH al 0-15% en EtOAc) proporcionó el producto deseado.



- 15 RMN^1 (CDCl_3): 7,68 (d, 1H, $J = 10,23$), 6,20 (dd, 1H, $J_1 = 10,23$, $J_2 = 1,86$), 6,07 (s, 1H), 5,27-5,42 (m, 4H), 4,80 (dd, 1H, $J_1 = 17,70$, $J_2 = 5,61$), 4,09-4,36 (m, 3H), 3,54-3,69 (m, 3H), 3,34 (m, 1H), 3,07-3,22 (m, 1H), 2,94-2,98 (m, 1H), 2,88 (s, 6H), 2,74-2,78 (m, 3H), 2,65-2,68 (m, 3H), 2,37-2,50 (m, 3H), 2,25 (dd, 1H, $J_1 = 12,24$, $J_2 = 2,31$), 2,00-2,05 (m, 8H), 1,42 (s, 3H), 1,30 (ancho, 18H), 0,89 (m, 3H), 0,64 (s, 3H).
- 20 MS: 808.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Ejemplo 5 - Derivados de etopósido (Comparativo)

- 25 Se disolvió sal dihidrocloruro de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico (4, 20 mg, 0,09 mmoles) en SOCl_2 (0,5 mL), y se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 3 h. El SOCl_2 se evaporó y, sin purificación adicional, el cloruro de ácido bruto se disolvió en CH_3CN seco (1 mL) bajo atmósfera de argón. La solución se enfrió a 0°C , se añadió gota a gota etopósido (6,50 mg, 0,085 mmoles) disuelto en CH_3CN (1 mL), seguido de trietilamina (10 μl). Se continuó agitando durante 2 h, con el seguimiento de la reacción mediante TLC. Después, la solución se concentró al vacío y el producto bruto se recogió con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (malla 230-400) (gradiente MeOH al 5 - 10% en CH_2Cl_2) para proporcionar 30 mg de la base libre deseada del derivado etopósido 7 en forma de un sólido de color blanco.

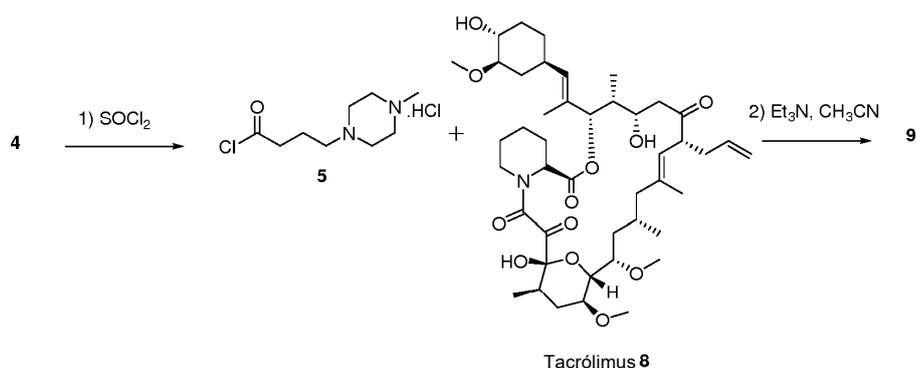


RMN ^1H (CDCl_3): 6,83 (s, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,27 (s, 2H), 5,98-6,00 (d, 2H, $J = 7,15$ Hz), 4,91-4,90 (d, 2H), 4,73-4,78 (q, 1H), 4,63-4,67 (t, 2H), 4,40-4,46 (t, 1H), 4,15-4,26 (m, 2H), 3,75-3,78 (t, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,55-3,62 (m), 3,49 (s, 3H), 3,25-3,47 (m), 2,81-2,93 (m), 2,44-2,64 (m), 2,31 (s, 3H), 1,87-1,97 (m), 1,39-1,40 (d, 3H).

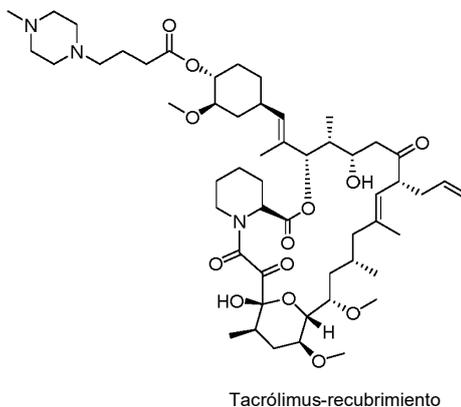
ESI-MS: 757,5 [M + H]⁺.

Ejemplo 6 - Derivados de tacrolimus (Comparativo)

La sal hidrocloreto de ácido 4-(4-metilpiperazin-1-il)butanoico (**4**, 25 mg, 0,12 mmoles) se disolvió en SOCl_2 (0,5 mL), y se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 3 h., a continuación el SOCl_2 se evaporó y sin purificación adicional el compuesto **5** se disolvió en CH_3CN (1 mL) bajo atmósfera de argón. La solución se enfrió a 0°C , a continuación se añadió tacrolimus (**8**, 80 mg, 0,1 mmoles) disuelto en CH_3CN (1 mL), seguido de trietilamina (10 μl), se continuó agitando durante 2 h, a continuación se concentró la solución a vacío. El producto bruto se recogió con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (malla 230-400) (gradiente de MeOH de 5-10% en CH_2Cl_2) para proporcionar 45 mg de la base libre deseada del derivado de tacrolimus **9** en forma de un sólido de color blanco.



Producto esperado:



5 RMN ^1H (CDCl_3): 5,63 (m, 1H), 5,20-5,32 (m, 2H), 6,27 (s, 2H), 4,98-5,10 (m), 4,80 (d, 1H), 4,63-4,63 (d, 1H), 4,41-4,46 (d, 1H), 4,25 (s), 3,87-3,92 (m, 2H), 3,67-3,75 (m), 3,56-3,60 (m), 3,30-3,44 (m), 2,97-3,06 (m ancho), 2,30-2,75 (m ancho), 0,81-2,28 (multipletes anchos continuos) (espectros adjuntos)

ESI-MS: 973.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Ejemplo 7 Derivados de ciclosporina y azatioprina (Comparativo)

10 Los derivados de ciclosporina y azatioprina, tales como los derivados que se muestran a continuación, se prepararán esencialmente de acuerdo con el método descrito para tacrolimus que involucra la reacción del fármaco parental con un cloruro de ácido. Está bien establecido que la azatioprina reacciona selectivamente en N-9 con agentes electrófilos (Mishra et al., Ind. J. Chem., Sec. B, 26B: 847-50 (1987)). Por lo tanto, en algunos aspectos, los
15 derivados de azatioprina proporcionados en la presente memoria se derivatizarán en N-9.

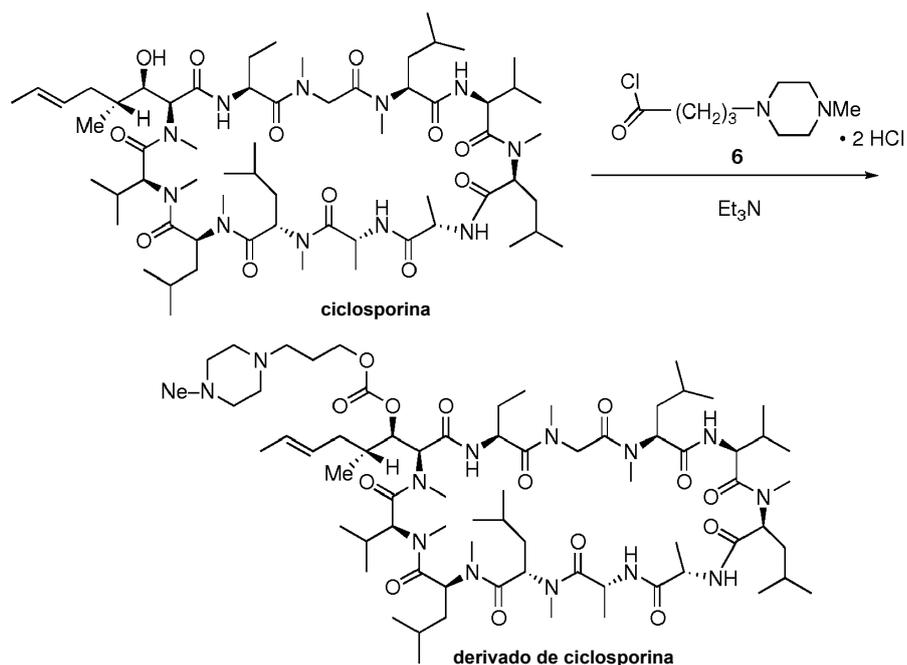
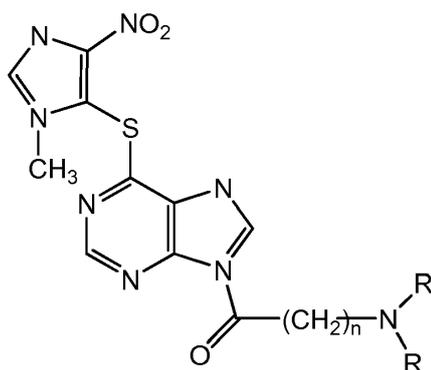


Figura 7



derivados de azatioprina

5 Ejemplo 8 - Solubilidad de Derivados de Base Débil

La solubilidad de los derivados de docetaxel se determinó en tampón de acetato a pH 5, que es el tampón utilizado para la carga activa en la LN. Los compuestos se disolvieron en etanol a 50 mg/mL (excepto TD2, que se disolvió a 25 mg/mL). Una alícuota se diluyó 10 veces con tampón de acetato 10 mM (pH 5) y el pH se comprobó y se volvió a ajustar según fue necesario para alcanzar un pH 5. Como alternativa, se pesaron 10 mg de cada compuesto en un vial de vidrio y se añadieron 2 mL de tampón de acetato 10 mM (pH 5) al compuesto, seguido de sonicación de la suspensión durante 10 minutos. El precipitado se eliminó a continuación utilizando filtros Microcon MY100 (corte de Peso Molecular de 100.000 Da) y el producto filtrado se analizó mediante UPLC-UV para determinar el contenido de fármaco. Las solubilidades medidas son solubilidades cinéticas determinadas en condiciones de no equilibrio.

Se pueden utilizar opcionalmente cantidades pequeñas (no permeabilizantes de membrana) de etanol para aumentar la solubilidad en agua durante la carga. Por lo tanto, los datos de solubilidad se generaron tanto en el tampón como en el tampón que contenía 10% (v/v) de etanol. La solubilidad en agua de los derivados de docetaxel (Tabla 2) varió significativamente, con valores que oscilaban entre 20 y 500 veces más que la de docetaxel (Du et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15:6323-30 (2007)). La solubilidad disminuyó en el orden N-metilpiperazino > piperidino >> morfolino. La solubilidad de los derivados morfolino fue significativamente menor que la de los derivados piperazino y piperidino.

Tabla 2. Solubilidad en agua de derivados de docetaxel a pH 5 en ausencia y presencia de etanol al 10%. Los profármacos TD4-TD9 son comparativos.

Profármaco	Solub. EtOH al 10% (mg/mL)	Solub. en acetato 10 mM pH 5 (mg/mL)
TD1	3,5	1,7
TD2	2,5	2
TD3	4,1	2,5
TD4	-	0,12
TD5	0,3	0,14
TD6	1,5	0,48
TD7	-	1,9
TD8	-	0,5
TD9	2,3	1
TD10	-	3

- 5 Se determinó que el pKa del grupo amino de TD1 mediante titulación ácido-base era 7,7, lo que lo hace muy adecuado para la carga en gradiente de pH en LN. Como se esperaba, la solubilidad en agua de la sal hidrocioruro de TD1 disminuyó al aumentar el pH (2,8 mg/mL a pH 4 y 1,7 mg/mL a pH 5).

10 Ejemplo 9 - Estabilidad de los derivados de base débil

10 La estabilidad química de los derivados de docetaxel se determinó en soluciones acuosas a diferentes valores de pH y temperaturas, y en medios biológicos (plasma de ratón). Las alícuotas de los derivados de docetaxel en acetonitrilo se mezclaron con soluciones tamponadas con citrato/HEPES (10 mM/10 mM) a pH 4,0 y 7,5, o en plasma de ratón en viales de muestra de HPLC de vidrio de 1 mL sellados con tapones revestidos de Teflón (volumen final 0,25 mL, concentración final del derivado de docetaxel 50 µg/mL). La estabilidad del fármaco se determinó 1, 4 y 24 horas después de la incubación a 37°C mediante UPLC-UV. En los puntos de tiempo indicados, se añadió un exceso de 3 veces de metanol/TFA al 0,1% a la muestra. Las muestras tamponadas con citrato/HEPES se analizaron mediante UHPLC como se describe anteriormente. Para las muestras de plasma, las proteínas precipitadas por la adición de metanol/TFA al 0,1% sedimentadas por centrifugación a 14.000 x g y los sobrenadantes se analizaron para determinar los derivados del fármaco. El plasma de ratón heparinizado se diluyó a 50% con tampón fosfato de sodio 20 100 mM para mantener el pH constante durante todo el experimento.

25 Para ser adecuados para la formulación en LN, los derivados deben ser estables a pH 4 (el pH presente dentro del portador LN). Además, los derivados de profármacos deben formar fácilmente el fármaco activo en condiciones fisiológicas (por ejemplo, a pH 7,4 y/o en presencia de enzimas endógenas) una vez liberados de la LN. La Tabla 3 muestra la estabilidad hidrolítica de los derivados de docetaxel a pH 4, pH 7,4, y en plasma de ratón después de 24 horas de incubación a 37°C. Entre los derivados de docetaxel C-2'-aminoéster, TD1-4, TD7 y TD9 tuvieron una estabilidad adecuada a pH 4. TD4 tiene una solubilidad extremadamente baja en agua y la incubación en plasma no parece tener ningún efecto sobre TD9. TD1-3 y TD7 se seleccionaron para su carga en LN y realizar pruebas de dichos LN para la liberación del fármaco *in vitro*.

30 Los resultados (Tabla 3 y Figura 1) indican que los derivados son estables a los valores de pH bajos que se encuentran dentro de la LN (pH de aproximadamente 4) y son capaces de experimentar una conversión rápida en fármaco activo después de la liberación del portador LN *in vivo*. La conversión en fármaco activo depende del pH (más rápida a un pH más alto) y se acelera significativamente en presencia de enzimas hidrolíticas presentes en fluidos biológicos tales como el plasma sanguíneo.

Tabla 3. Niveles de profármacos (% restante) después de 24 horas de incubación en pH 4 o 7,4 tampón o plasma de ratón. Los profármacos TD4-TD9 son comparativos.

	TD-1	TD-2	TD-3	TD-4	TD-5	TD-6	TD-7	TD-8	TD-9
pH 4	94	99	99	98	81	68	94	78	99
pH 7,4	23	59	69	92	64	18	13	36	65
Plasma	12	31	29	64	45	0	8	4	60

Ejemplo 10 - Eficacia de carga

Los derivados perazinil éster (TD1-TD3), piperidin éster (TD7) (Comparativo), y C-7 aminoéster (TD10) de docetaxel, el ácido N-metil-piperazinilbutanoico (Comparativo) y los derivados éster de ácido acético de prednisona (comparativo) y el derivado éster del ácido N-metil-piperazinilbutanoico de etopósido (Comparativo) se sometieron a ensayo para determinar la eficacia de la carga en LN.

Preparación de LN

Las LN se prepararon basándose en el procedimiento con etanol descrito por Boman et al., Cancer Res.; 54:2830-2833 (1994). Brevemente, los lípidos (fosfolípido/Col, razón molar 55/45) se disolvieron en etanol y se añadieron lentamente a una solución acuosa que contenía sulfato de amonio 350 mM a 60°C; las cantidades traza del marcador lipídico [³H]CHE (0,15 µCi/mg de lípidos totales) se disolvieron conjuntamente con los otros lípidos en etanol para preparar LN para estudios de liberación. La concentración final de etanol fue de 15% (v/v). Las dispersiones de LN resultantes se extruyeron a 60°C a través de dos filtros de policarbonato de 100 nm apilados (Nucleopore, Pleasanton, CA) utilizando un extrusor Thermobarrel calentado (Northern Lipids, Vancouver, Canadá), como describen Hope et al., en Biochim. Biofis Acta; 812: 55-65 (1985). El etanol residual y el sulfato de amonio externo se eliminaron mediante diafiltración de flujo tangencial a temperatura ambiente y se reemplazaron con una solución de sacarosa 300 mM utilizando un cartucho de ultrafiltración Midgee™ HOOP™ (corte de Peso Molecular de 100000; Amersham Biosciences). Se utilizó la dispersión de luz cuasi elástica (QELS) para evaluar la distribución de tamaño de la LN extruida (tamaño objetivo 100 ± 20 nm), utilizando un medidor de partículas submicrométricas NICOMP modelo 370 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA).

Carga de fármacos

Los derivados de docetaxel, etopósido y prednisona se cargaron en LN de DSPC/Col (55:45% en moles) utilizando el método de carga remota basado en sulfato de amonio descrito por Haran et al., Biochim. Biofis Acta; 1151:201-15 (1993). Brevemente, se disolvió TD1 a 2 mg/mL en sacarosa 300 mM tamponada con acetato de sodio 10 mM (pH 5), el derivado de etopósido se disolvió a 2,5 mg/mL de sacarosa 300 mM tamponada con acetato de sodio 10 mM (pH 5) y el derivado de prednisona se disolvió a 7 mg/mL en un tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 5,3). Los derivados disueltos se añadieron a suspensiones de LN precalentadas (60°C) y las mezclas se incubaron con agitación a 60°C durante los tiempos indicados (típicamente 30 minutos). Las formulaciones de LN se preparan típicamente a concentraciones de lípidos entre 5-10 mg/mL y razones en peso de fármaco a lípido de 0,1-0,4 mg/mg. Los derivados de docetaxel no encapsulados se eliminaron mediante diafiltración de flujo tangencial utilizando un cartucho de ultrafiltración Midgee™ HOOP™ (corte de Peso Molecular de 100000; Amersham Biosciences) o cromatografía de exclusión por tamaños. La solución externa se reemplazó con una solución salina fisiológica no tamponada y la muestra se concentró según fue necesario. Las formulaciones de LN cargadas de fármaco para los estudios *in vivo* se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,2 µm (Nalgene) y posteriormente se almacenaron a 4°C. También se cargó TD-1 en LN compuesta de DPPC/col (55:45% en moles) y DMPC/col (55:45% en moles).

Las eficacias de carga se determinaron mediante la cuantificación de los niveles de profármacos y lípidos antes y después de la separación del profármaco externo (no encapsulado) del profármaco encapsulado en LN mediante cromatografía de exclusión por tamaños utilizando columnas de centrifugación Sephadex G50 y comparando las respectivas proporciones de profármaco/lípido. Las concentraciones de fosfolípidos se determinaron mediante el ensayo de fósforo de Fiske y Subbarow, J. Biol. Chem.; 66: 375-379 (1925), y las concentraciones de colesterol se cuantificaron utilizando un ensayo colorimétrico enzimático (Wako Chemicals, Richmond, VA). Las concentraciones de los derivados se determinaron mediante cromatografía líquida de rendimiento ultra alto (UHPLC) como se describe en la presente memoria. También se controló la conversión del profármaco en el fármaco parental durante la carga. Los resultados se muestran en las Figuras 2 (derivados de docetaxel), 3 (derivados de prednisona) y 4 (derivado de etopósido).

Ejemplo 11 - Estabilidad de las formulaciones de LN

Se prepararon formulaciones de derivados de LN con diferentes composiciones lipídicas (DSPC/Col, DPPC/Col y DMPC/Col, cada una a 55/45% en moles y una razón derivado/lípido de 0,2 p/p) a una concentración de derivados de 3 mg/mL en solución salina fisiológica al 0,9%. Las formulaciones de LN se filtraron de forma estéril y se rellenaron de forma estéril en viales de vidrio de 5 mL y los viales se taponaron y se taparon y a continuación se almacenaron a 7°C. En varios puntos de tiempo (una vez a la semana durante el primer mes y a continuación mensualmente) durante un período de 4 meses, las formulaciones se analizaron para determinar el tamaño de LN (QELS), la retención de derivados (método de columna de centrifugación de Sephadex G-50) y la integridad de los derivados. Los resultados se resumen en la Figura 5A-C. Las tres formulaciones eran extremadamente estables; la liberación de profármacos no fue detectable (Figura 5B); el tamaño promedio y la distribución del tamaño de las formulaciones de LN se mantuvieron sin cambios (Figura 5C); y la hidrólisis del profármaco fue inferior a 4% (3,5-

3,8%, Figura 5A). No se observaron otros productos de degradación. Los datos demuestran la viabilidad de desarrollar formulaciones húmedas de LN. La congelación de formulaciones es otra alternativa.

Las LN preparadas utilizando una técnica de gradiente de sulfato de amonio tienen un pH intravesicular de aproximadamente 4,0 (Maurer-Spurej et al., Biochim. Biofis Acta, 1416:1-10 (1999)). A la luz de la estabilidad significativamente mayor de los derivados a pH 4 con respecto al pH 7,4 (véase la Tabla 2, más arriba), la encapsulación de LN mejora enormemente la estabilidad hidrolítica de los derivados atrapados en comparación con los derivados en solución acuosa. Por ejemplo, a pH 4, TD1 tiene una semivida de hidrólisis de aproximadamente 49 días (o 7 semanas). En contraste, menos del 3% de TD1 encapsulada se convirtió en docetaxel durante un período de 4 meses (16 semanas). La microscopía Cryo-TEM reveló que el profármaco precipita en el interior de la LN y, como consecuencia, tiene una estabilidad significativamente mayor.

La velocidad a la que se eliminan de la circulación sanguínea el TD1 (formulado de la misma manera que Taxotere™ y en la LN) y Taxotere™ se investigó después de la administración i.v. de las formulaciones a ratones Swiss Webster. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa una inyección de bolo de dosis equimolares (20 mg/kg de docetaxel) de las formulaciones, y los niveles plasmáticos de TD1 y docetaxel se determinaron mediante UHPLC-MS. Los resultados se muestran en la Figura 5. Tanto docetaxel/Taxotere™ como el derivado tenían semividas en circulación en plasma de minutos y concentraciones plasmáticas por debajo de los niveles detectables en 2 h (Figura 6). En contraste, la formulación del derivado en LN de DSPC/Col extendió la semivida de la circulación de minutos a 10-12 horas con concentraciones en plasma dos órdenes de magnitud más altas (Figura 6). Aproximadamente 24% de la dosis inyectada permaneció en la circulación a las 16 h. La eliminación del derivado formulado de LN parece estar determinada principalmente por la tasa de eliminación del portador de LN. Los datos demuestran que las formulaciones de LN del derivado son estables en circulación y pueden lograr semividas en circulación que favorecen la acumulación eficaz de fármacos en dianas terapéuticas.

Ejemplo 12 - Liberación de derivados de fármacos de las LN *in vitro*

La actividad de los fármacos basados en LN depende en gran medida de la tasa de liberación del fármaco del portador. Por ejemplo, si el fármaco se sale rápidamente del portador LN, el LN que llega al sitio de la enfermedad llevará poco o ningún fármaco y habrá un beneficio terapéutico insignificante sobre el fármaco libre. Por otro lado, si un fármaco se libera demasiado lentamente de la LN, la cantidad de fármaco que llega al sitio de enfermedad nunca alcanzará concentraciones terapéuticas. Los principales determinantes de la retención/liberación del fármaco son la composición lipídica del portador LN y la forma intravesicular del fármaco. El uso de lípidos insaturados o lípidos con cadenas de acilo más cortas favorece una liberación más rápida del fármaco. La precipitación de fármacos dentro de la LN puede aumentar la retención de fármacos. Se puede determinar si los derivados de fármaco precipitan dentro de LN viendo formulaciones de LN usando cryo-TEM y/u otros métodos conocidos en la técnica.

La liberación *in vitro* de derivados de docetaxel a partir de LN se evaluó en plasma de ratón. La retención del fármaco se determinó comparando la razón inicial de profármaco a lípido con las proporciones de profármaco a lípido encontradas en diferentes puntos temporales. Los derivados de docetaxel se encapsularon en LN de DSPC/col, DPPC/Col y DMPC/Col (55:45% en moles) que contenían trazas del marcador lipídico radiomarcado ³H-colesterilhexadeciléter (³H-CHE). Las formulaciones de LN se mezclaron con plasma de ratón a una concentración final de lípido de 0,75 mg/mL, seguido de incubación a 37°C. En varios puntos de tiempo, se tomaron alícuotas y se ejecutaron sobre columnas de centrifugación Sephadex G-50 para eliminar el profármaco no atrapado (Pick, Arch. Biochem. Biophys., 212:186-194 (1981)). Las concentraciones de derivados y lípidos en los productos eluidos se determinaron mediante UHPLC y recuento de centelleo líquido, respectivamente.

La Figura 7A muestra el porcentaje de retención de TD1 en LN, definido como la razón derivado/lípido (o profármaco/lípido) encontrada en la muestra en un punto de tiempo específico dividida por la razón inicial de fármaco a lípido. Las LN de DSPC/Col y de DPPC/Col muestran poca o ninguna liberación durante el transcurso de 16 h del experimento. La LN de DMPC/Col liberó el profármaco con un tiempo medio de aproximadamente 6 horas y el 16% del profármaco quedó atrapado 16 h después de la inyección. La comparación de los perfiles de retención de las formulaciones de LN de DSPC/Col cargadas a 0,1 y 0,2 mg/mg muestra que la retención del fármaco no depende de la razón de profármaco a lípido. Los estudios de liberación *in vitro* realizados en plasma de ratón están de acuerdo con los estudios *in vivo* (Figura 7B). El aumento en la liberación observado con la LN de DMPC/Col en comparación con las LN de DSPC y DPPC/Col es compatible con una disminución en la permeabilidad de la membrana al pasar de DMPC, que tiene las cadenas acílicas más cortas (C14) a los lípidos de la cadena más larga. La Figura 7C muestra las propiedades de retención de TD1 en LN de DSPC/col *in vitro* con respecto a otros derivados de docetaxel (TD2-3 y TD7) formulados en DSPC/col a la misma razón de profármaco a lípido. Todos los derivados fueron retenidos eficazmente. El TD7 se liberó a una velocidad que replicaba la de TD1, mientras que TD2 y el TD3 se liberaron a una velocidad ligeramente más rápida (el porcentaje de liberación se define como una retención en porcentaje de menos de 100). Los datos *in vitro* e *in vivo* demuestran que los derivados de bases débiles pueden retenerse eficientemente en las LN y que las velocidades de liberación pueden regularse variando la composición lipídica de los portadores LN.

Ejemplo 13 - Farmacocinética y liberación de fármacos *in vivo*

La farmacocinética (PK) de los derivados de docetaxel encapsulados en LN se comparó con la PK de Taxotere™, la formulación de docetaxel comercial, y los derivados se formularon de la misma manera que Taxotere™. Taxotere™ y los derivados formulados de manera similar se formularon como se describe en la información de prescripción para Taxotere™ (Sanofi-Aventis, EE.UU.) utilizando etanol/polisorbato 80/solución salina fisiológica para disolver el fármaco. El derivado de docetaxel se encapsuló en LN de DSPC/col, DPPC/col y DMPC/col (55:45% en moles) en una razón de fármaco a lípido de 0,2 p/p utilizando la técnica de carga con sulfato de amonio. Los componentes lipídicos contenían cantidades traza (0,15 µCi/mg de lípidos) del marcador lipídico [³H]CHE, que permite controlar la eliminación de la circulación tanto del profármaco como del portador LN.

La PK y los estudios de liberación *in vivo* se basaron en 4 puntos de tiempo (1, 4, 8 y 16 horas) y 4 ratones por punto de tiempo. Todas las formulaciones se administraron i.v. a través de la vena lateral de la cola a dosis de docetaxel (o docetaxel equivalente) de 20 mg/kg y volúmenes basados en el peso del sujeto (10 mL/kg). En diversos momentos, los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina y la sangre se recogió mediante punción cardíaca y se colocó en tubos microtainer con EDTA. Los animales expiraron inmediatamente después de la extracción de sangre. El plasma se separó de la sangre completa mediante centrifugación a 1.000 g durante 10 min. Las proteínas plasmáticas se precipitaron mediante la adición de 150 µl de metanol enfriado con hielo acidulado con TFA al 0,1% a 50 µl de plasma. Las soluciones metanólicas se centrifugaron durante 30 min a 15.000 x g a 4°C para sedimentar las proteínas y se analizó el sobrenadante para detectar el docetaxel y los derivados de fármacos mediante UHPLC. Para las formulaciones de LN, se añadieron 25-50 µl de plasma al fluido de centelleo (PicoFluor 40, Perkin Elmer) y se analizaron los niveles de lípidos (radiactividad [³H]-CHE) mediante recuento de centelleo. El porcentaje de profármaco restante en LN (retención de fármaco) se calculó dividiendo las proporciones profármaco/lípido encontradas en muestras de plasma por las de las formulaciones de LN inyectadas, tomadas como 100%. Los resultados se muestran en la Figura 7B. Puesto que el docetaxel libre y los derivados de docetaxel se eliminaron a velocidades mucho más rápidas que las formas encapsuladas con LN, las razones profármaco/lípido recuperadas de las muestras de plasma pueden considerarse como una indicación directa de la cantidad de profármaco que queda encapsulado en las LN.

Ejemplo 14 - Actividad contra el cáncer *in vitro*

La capacidad del derivado para formar el fármaco activo (bioconversión) se investigó adicionalmente fondo midiendo la actividad contra el cáncer de TD1 *in vitro* con respecto al compuesto parental (docetaxel). La actividad contra el cáncer se evaluó frente a un panel de 3 líneas celulares de cáncer humano, incluida la línea celular de cáncer de ovario ES-2, la línea celular de cáncer de próstata PC3 y la línea celular de cáncer de mama MDA435/LCC6 (BC Cancer Research Center, Vancouver, BC) (Fields y Lancaster, Am. Biotechnol. Lab., 11:48-50 (1993); Nakayama et al., J. Immunol. Methods, 204:205-208 (1997)). La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo Azul Alamar después de un período de exposición al fármaco de 72 horas. Brevemente, las células se incubaron en placas de 96 pocillos a 37°C durante 72 horas en presencia de cantidades variables de TD1 o el fármaco parental (disuelto en DMSO); al final del período de incubación, se añadió solución de Azul Alamar a todos los pocillos (20 µl/pocillo, 10% del volumen de cultivo). Las placas se devolvieron a la incubadora durante 4 h; la fluorescencia de la muestra se determinó a λ_{ex} = 530 nm y λ_{em} = 590 nm. La viabilidad se calculó de acuerdo con: Viabilidad celular (%) = $(F_{mas\ fármaco} - F_{fondo}) / (F_{menos\ fármaco} - F_{fondo}) * 100$, donde $F_{mas\ fármaco}$ es la lectura de fluorescencia en presencia de fármaco, $F_{menos\ fármaco}$ el control celular en ausencia de fármaco y F_{fondo} la fluorescencia de fondo (medios solos). Los valores de CI_{50} (nM) se calcularon ajustando una curva sigmoidea al gráfico de concentración-viabilidad y se presentan en la Tabla 4. El TD1 fue tan activo como el docetaxel, lo que indica que el profármaco se convirtió fácilmente en el compuesto activo.

Tabla 4 Citotoxicidad *in vitro* (valores de CI_{50}) de docetaxel y derivado de docetaxel.

Línea celular	CI_{50} (nM) Docetaxel	CI_{50} (nM) Derivado
PC-3 (cáncer de próstata)	1	0,5
MDA-MB-435/LCC6 (cáncer de mama)	<0,1	<0,1
ES-2 (cáncer de ovario)	0,1	0,1

Ejemplo 15 - Actividad contra el cáncer *in vivo*

La eficacia contra el cáncer de las formulaciones derivadas de LN-docetaxel se evaluó en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de cáncer de mama humano (MDA-MB-435/LCC6) después de una sola inyección de bolo. Se cultivaron células MDA-MB-435/LCC6 murinas en DMEM con L-glutamina 2 mM y FBS al 10% a 37°C en un entorno con CO₂ al 5%. A ratones RAG2-M hembra se les inocularon 5×10^6 (50 µL) células por vía subcutánea en el flanco posterior derecho. Una vez que los tumores alcanzan un tamaño de 100-150 mm³, los animales se dividieron al azar en grupos (6 animales por grupo) y se les inyectó una sola inyección i.v. de bolo de Taxotere™ a una dosis de 25 mg/kg

o formulaciones de LN de TD1 (DSPC/Col, DPPC/Col y DMPC/Col a 55:45% en moles y una razón en peso de profármaco/lípido de 0,2 p/p) a tres diferentes dosis (31,25 mg/kg, 50 mg/kg y 110 mg/kg, que correspondían a 25, 40 y 88 mg/kg de docetaxel). El crecimiento del tumor y el peso de los animales se midieron cada tercer día. El crecimiento del tumor se controló midiendo las dimensiones del tumor con calibres digitales y los volúmenes del tumor se calcularon de acuerdo con la ecuación de longitud x (ancho²) ÷ 2 con la longitud (mm) que es el eje más largo del tumor. Se permitió que los tumores crecieran hasta un máximo de 700 mm³ antes del sacrificio; se sacrificaron los animales con tumores ulcerados.

La eficacia del tratamiento se evaluó mediante la comparación de los parámetros establecidos de la actividad contra el cáncer, incluyendo: inhibición del crecimiento tumoral (% óptimo de T/C); retraso del crecimiento tumoral (T-C); diferencia en el tiempo para que los tumores tratados y de control dupliquen su tamaño; y puntuación NCI (Plowman J, Dykes DJ, Hollingshead M, Simpson-Herren L, Alley MC. 1997. Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: Teicher BA, editor. Anticancer drug development guide: Preclinical screening, clinical trials, and approval. Totowa: Humana Press, Inc. pág. 101-125). Además, se registraron todas las muertes relacionadas con el fármaco (en el plazo de 15 días desde la última dosis y la baja carga tumoral), así como la pérdida máxima de peso (media del grupo). Los valores de %T/C y las puntuaciones NCI se calcularon de la siguiente manera: los cambios en los volúmenes de tumores para cada tratamiento (T) y control (C) se calcularon cada día. Los tumores se midieron restando la mediana del volumen del tumor el día del primer tratamiento de la mediana del volumen del tumor el día de observación especificado. Los valores resultantes se utilizaron para calcular el porcentaje de T/C de acuerdo con $\%T/C = (\Delta T/\Delta C) \times 100$. El valor óptimo (mínimo) se utilizó para cuantificar la actividad antitumoral. Una puntuación NCI de 0 se asigna a un %T/C óptimo >42 y significa que el tratamiento no es eficaz. Se asigna una puntuación de 1 a valores de %T/C óptimo 1-42 e indica que el crecimiento del tumor está inhibido (Capdeville et al., Nature Reviews Drug Discovery, 1:493-502 (2002)).

La influencia de la composición lipídica del portador LN sobre la eficacia de TD1 encapsulado se ilustra en la Figura 8A. Las formulaciones de LN de DSPC/Col, DPPC/Col y DMPC/Col (razón TD1 a lípidos de 0,2 p/p) se administraron a una dosis equivalente de docetaxel de 40 mg/kg. La formulación de DSPC/Col inhibió el crecimiento tumoral de la manera más eficaz, seguida de las formulaciones de DPPC/Col y DMPC/Col (menos activas). La eficacia antitumoral está altamente correlacionada con la tasa de liberación, y la formulación que muestra la tasa de liberación más lenta es la más activa.

La actividad terapéutica de la formulación de DSPC/Col (razón TD1 a lípidos de 0,2 p/p) se determinó a 3 dosis diferentes (25, 40 y 88 mg/kg de docetaxel) en comparación con 25 mg/kg de TaxotereTM/docetaxel. A dosis equimolares (25 mg/kg de docetaxel), TaxotereTM fue ligeramente más eficaz que la formulación de LN. Sin embargo, la formulación de LN se puede administrar a dosis mucho más altas que la MTD de TaxotereTM. A estas dosis, las formulaciones de LN de DSPC/Col fueron significativamente más eficaces (Figura 8B). La supresión de crecimiento tumoral más significativa se observó a 88 mg/kg de docetaxel con un valor de %T/C óptimo del 5% y un retraso en el crecimiento del tumor (T-C) de 29 días en comparación con 9 días para TaxotereTM (Tabla 5). Los resultados demuestran que las formulaciones de LN son potencialmente mucho más eficaces que TaxotereTM.

Tabla 5 Compendio de la actividad antitumoral y parámetros de tolerabilidad del derivado de docetaxel TD1.

Tratamiento	Dosis de docetaxel (mg/kg)	Actividad antitumoral			Toxicidad	
		% T/C ^a	T-C ^b (días)	Puntuación NCI	DRD ^c	MWL ^d
Taxotere TM	25	10	9	1	0/6	-3,2
DSPC/Col	25	55	4	0	0/6	-0,9
DSPC/Col	40	21	11	1	0/6	-2,9
DSPC/Col	88	5	29	1	0/6	-3,8
DPPC/Col	40	21	9	1	0/6	No observada
DMPC/Col	40	42	4	0	0/6	-2,9

^a%T/C^a óptimo. %T/C > 42 tiene una puntuación NCI de 0 (inactivo) y %T/C de 1 a 42 tiene una puntuación NCI de 1 (significa inhibición del tumor).
^bRetraso en el crecimiento del tumor (diferencia en el tiempo para que los tumores tratados y de control dupliquen su tamaño).
^cMuertes relacionadas con las fármacos (DRD).
^dPérdida de peso media máxima por grupo de tratamiento en porcentaje (%), n = 6.

Ejemplo 16 - Estudios de tolerabilidad

Los estudios de tolerabilidad se centraron en el establecimiento de la dosis máxima tolerada (DMT) y el intervalo de

dosis para su uso en estudios de eficacia (los estudios de eficacia se basaron en una única inyección i.v.). Se realizaron estudios de DMT de dosis única en ratones SCID/Rag2-M inmunocomprometidos (también utilizados para los estudios de eficacia) utilizando TD1 encapsulado con LN, TD1 formulado de la misma manera que docetaxel en Taxotere™ y Taxotere™. Los estudios se basaron en la administración de una dosis única y se basaron en 3 ratones/grupo y una estrategia de aumento de dosis basada en tres niveles de dosis para el derivado y Taxótero y cinco niveles de dosis para las formulaciones de LN (DSPC/Col 55:45% en moles a una razón en peso de profármaco/lípido de 0,2 mg/mg). Todas las formulaciones fueron inyectadas i.v. a través de la vena lateral de la cola en un volumen de 200 µl/20 g de ratón.

Los ratones se controlaron diariamente para detectar signos de toxicidad durante un período de 14 días después de la administración del fármaco. La tolerabilidad se evaluó por medio de los cambios en el peso corporal, así como de los parámetros de comportamiento. La DMT se definió como la dosis que da como resultado una pérdida del peso corporal de -15% y no causa letalidad. Los pesos corporales de los ratones individuales se midieron cada dos días a lo largo del estudio. Si la pérdida de peso no era un buen factor predictivo de tolerabilidad, se utilizó la dosis en la que no era necesario sacrificar a los animales debido a la toxicidad.

Los resultados se resumen en la Tabla 6. La dosis única de DMT de Taxotere™ fue de 29 mg/kg, mientras que la DMT de TD1 fue de 16 mg/kg (DMT en equivalentes de docetaxel correspondientes a 20 mg/kg de profármaco). TD1 mostró toxicidad aguda (letalidad) a una dosis equivalente de docetaxel de 20 mg/kg. La toxicidad aguda parece estar relacionada con la precipitación del fármaco después de la inyección. En contraste, el TD1 encapsulado en LN (DSPC/Col 55:45% molar LN, razón de peso de profármaco/lípido 0,2 mg/mg) fue bien tolerado sin signos de toxicidad (no hay cambios significativos en el peso corporal y los parámetros de comportamiento) a dosis equivalentes de docetaxel tan altas como 88 mg/kg (Tabla 6). La DMT de la formulación de LN es al menos 3 veces más alta que la de Taxotere™ (29 mg/kg), lo que demuestra que es mucho mejor tolerada (menos tóxica) y, por lo tanto, se puede administrar a dosis más altas y más eficaces. El vehículo (polisorbato 80/solución salina fisiológica) solo no tuvo efectos adversos.

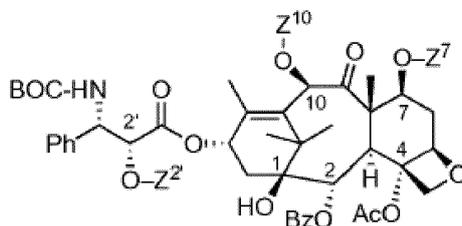
Tabla 6 Dosis máximas toleradas (DMT) de Taxotere™.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	Pérdida máxima de peso (%)	DRD	Observaciones Clín.	DMT (mg/kg)
Taxotere	22	-2,1	0/3		
	29	-2,7	0/3		29
	36	+	1/3		
Formulación de LN	40	-0,4	0/3		
	52	-3,5	0/3		
	64	-0,6	0/3		
	76	-1,5	0/3		
	88	-2,3	0/3		>88
Derivado	16	+	0/3		16
	20		1/1	Toxicidad aguda	
	24		3/3	Toxicidad aguda	

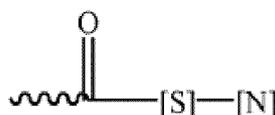
DRD: muerte relacionada con los fármacos

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
 en donde
 los grupos Z conectados a los átomos de oxígeno C-2', C-7 y/o C-10 son, independientemente, H, o un grupo de
 10 fórmula IIA:



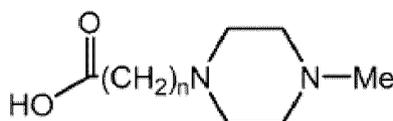
Fórmula IIA

en donde
 la línea ondulada representa el enlace que conecta la fórmula IIA con los átomos de oxígeno C-2', C-7 y/o C-10;

[N] es N-metil-piperazino, siempre que al menos una Z sea un grupo de la fórmula IIA; y
 [S] es un espaciador seleccionado entre:

- (a) una cadena del tipo (CH₂)_n, donde n puede variar de 1 a 10, o
- (b) un derivado del anterior (CH₂)_n donde uno o más átomos de H se reemplazan por: un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene de 1 a 10 átomos de C, un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, un átomo de halógeno; o
- (c) un derivado del anterior (CH₂)_n donde uno o mas CH₂ se reemplazan por: un heteroátomo tal como N, O, S, Si, que puede estar conectado a átomos de H; o a heteroátomos tales como N, O, S; o a grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que contienen de 1 a 10 átomos de C y que incorporan facultativamente uno o más átomos de halógeno, una estructura anular que consta de 3 a 10 átomos de carbono e incorpora facultativamente uno o más heteroátomos tales como N, O, S, Si, o halógeno, así como múltiples enlaces entre pares de átomos; o
- (d) un derivado del anterior (CH₂)_n donde uno o más pares de átomos de C adyacentes comparten un enlace doble de geometría E o Z, o un enlace triple.

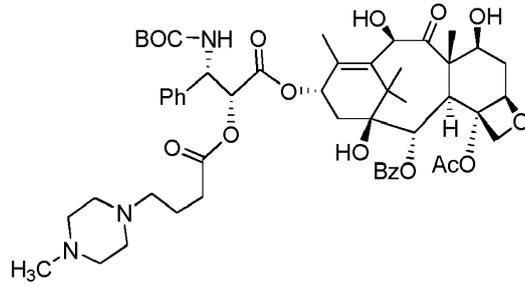
2. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es



donde n está entre 1 y 10.

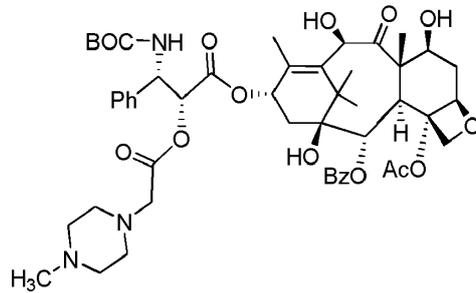
3. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde n está entre 1 y 4.

4. Un compuesto de cualquier reivindicación precedente, que tiene la fórmula:



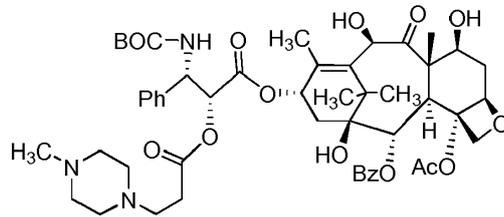
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de cualquier reivindicación precedente, que tiene la fórmula:



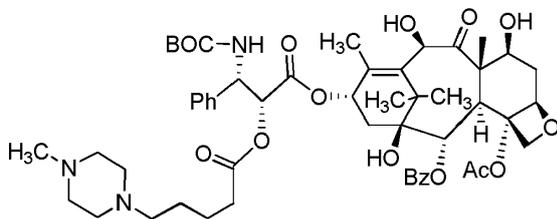
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. 6. Un compuesto de cualquier reivindicación precedente, que tiene la fórmula:



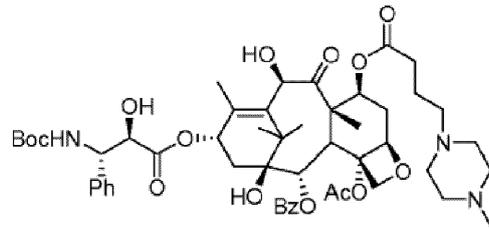
15. o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto de cualquier reivindicación precedente, que tiene la fórmula:



20. o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto de cualquier reivindicación precedente, que tiene la fórmula:



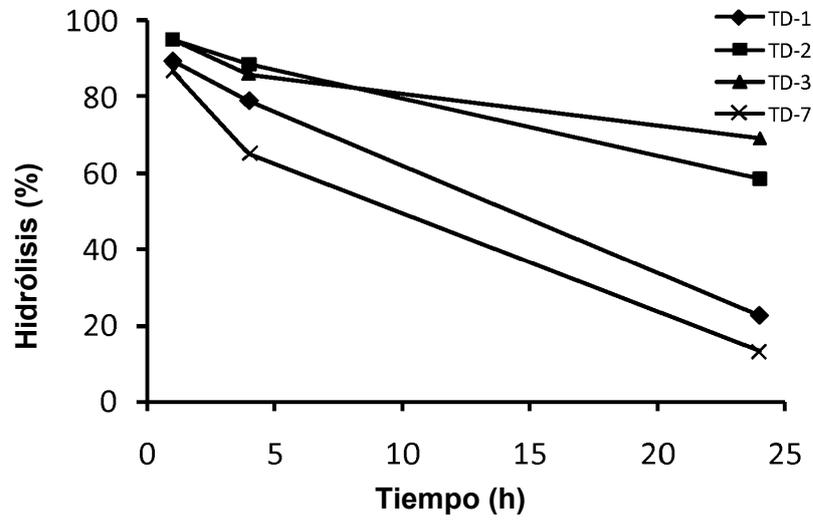
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 9. Una composición que comprende un compuesto de cualquier reivindicación precedente y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Una composición de la reivindicación 9, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable comprende un liposoma.

10

pH 7,4



Plasma

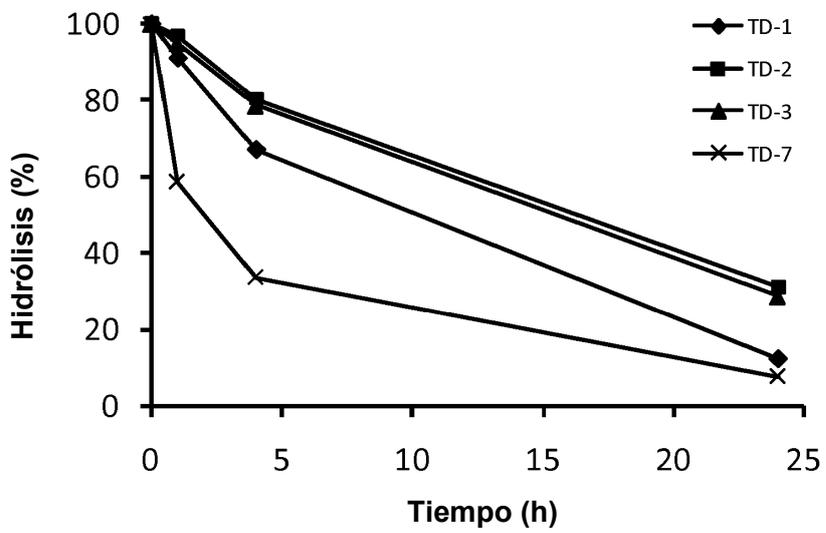
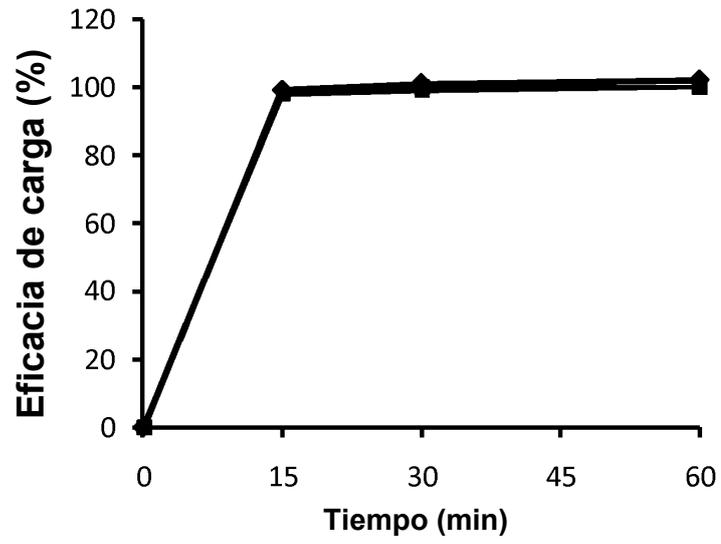


Figura 1

A.



B.

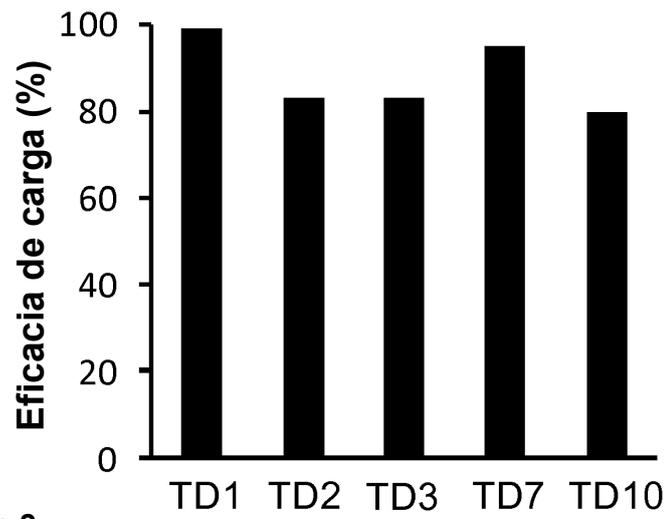
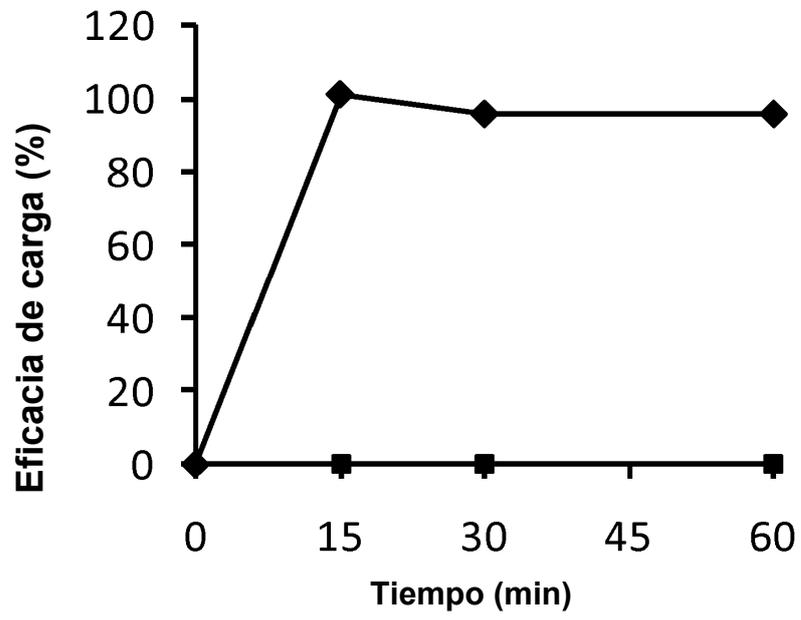


Figura 2

A.



B.

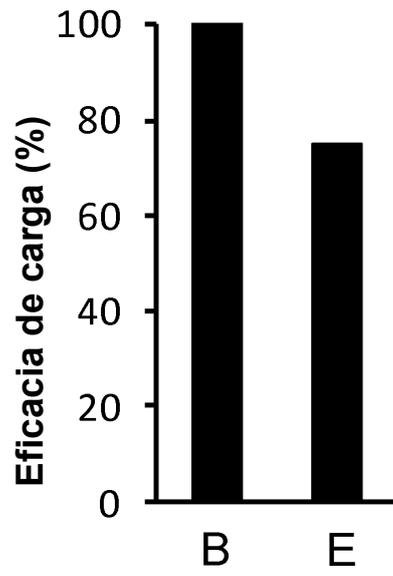


Figura 3

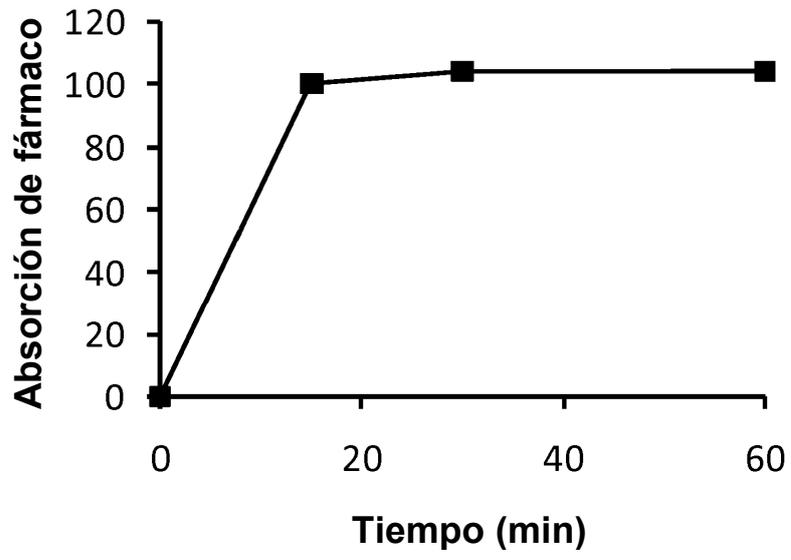


Figura 4

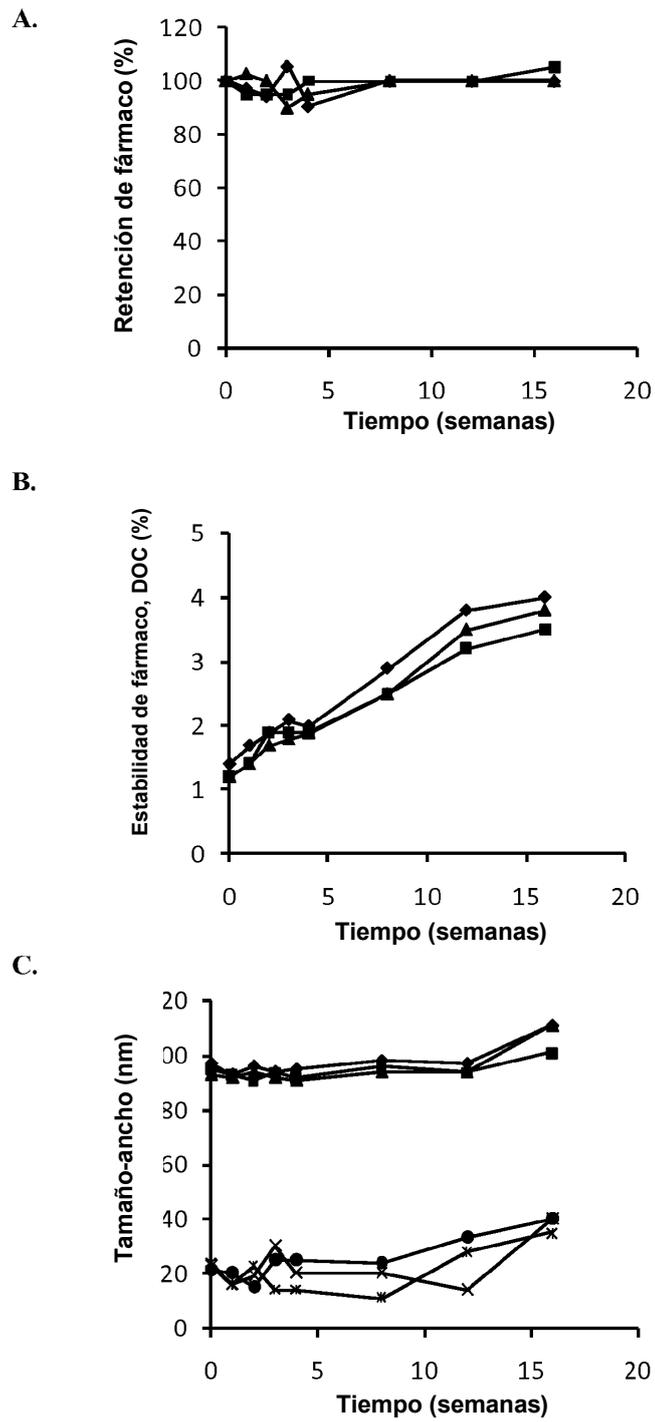


Figura 5

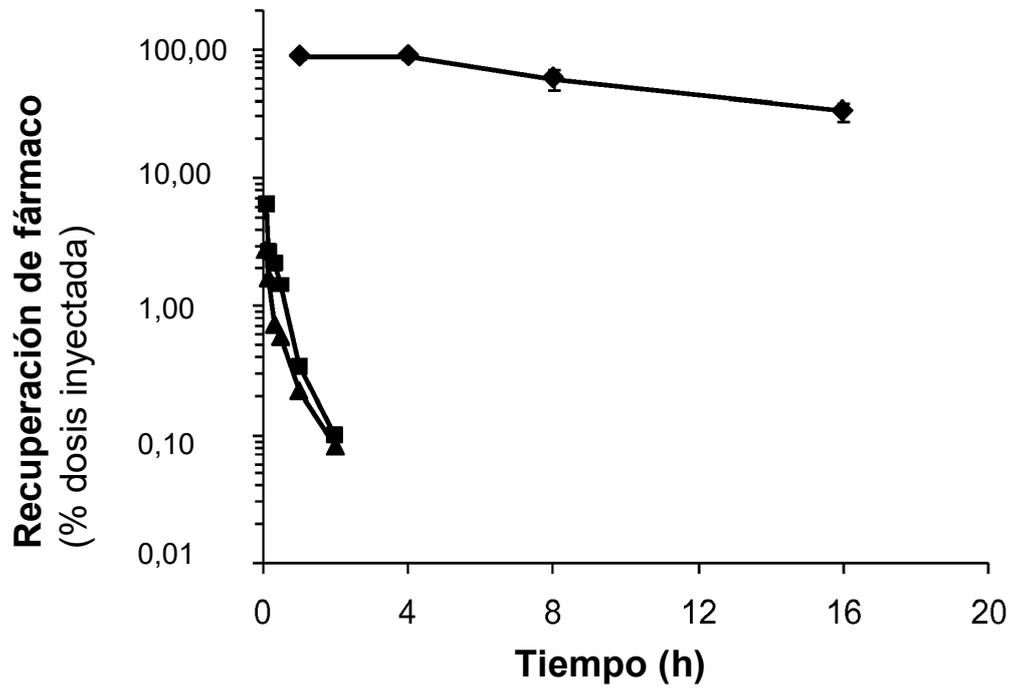


Figura 6

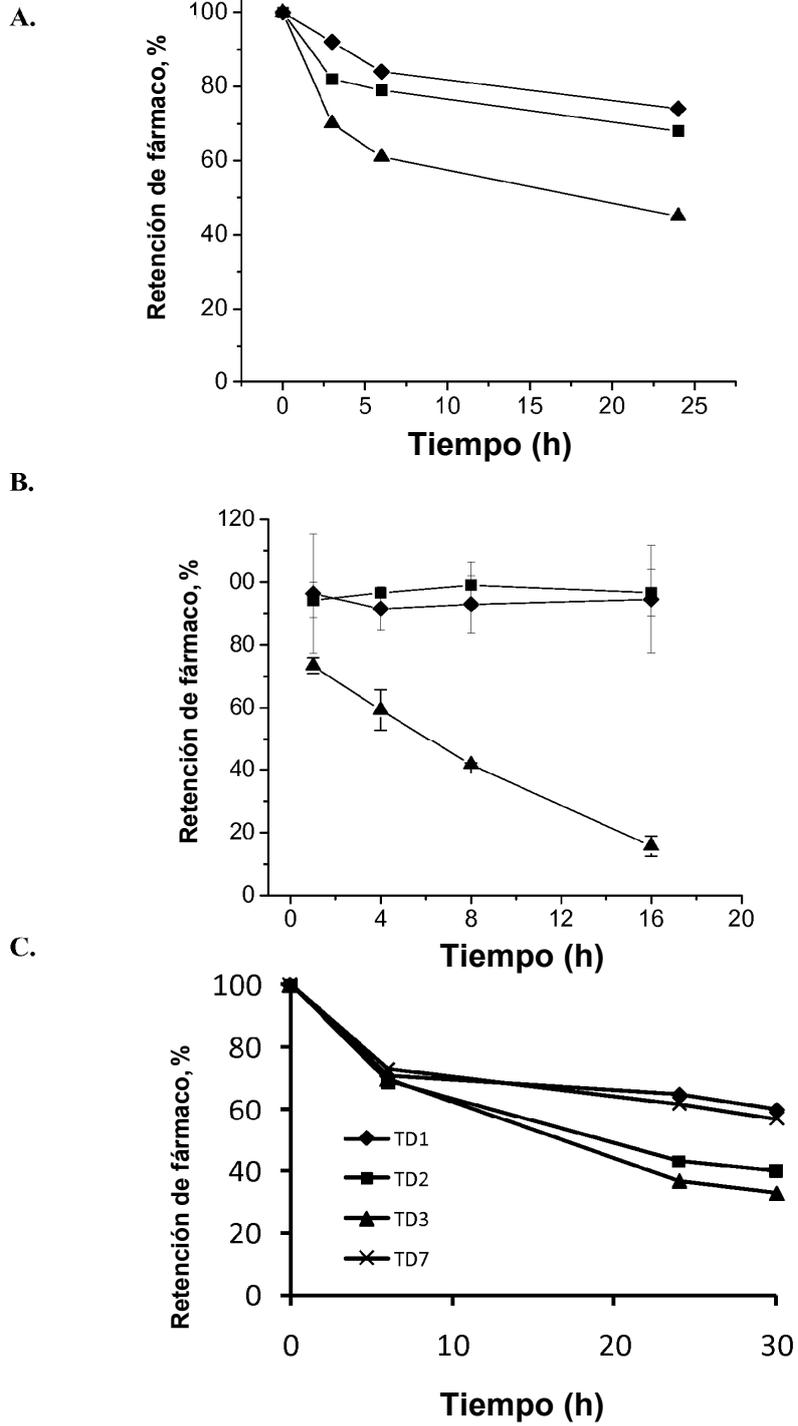


Figura 7

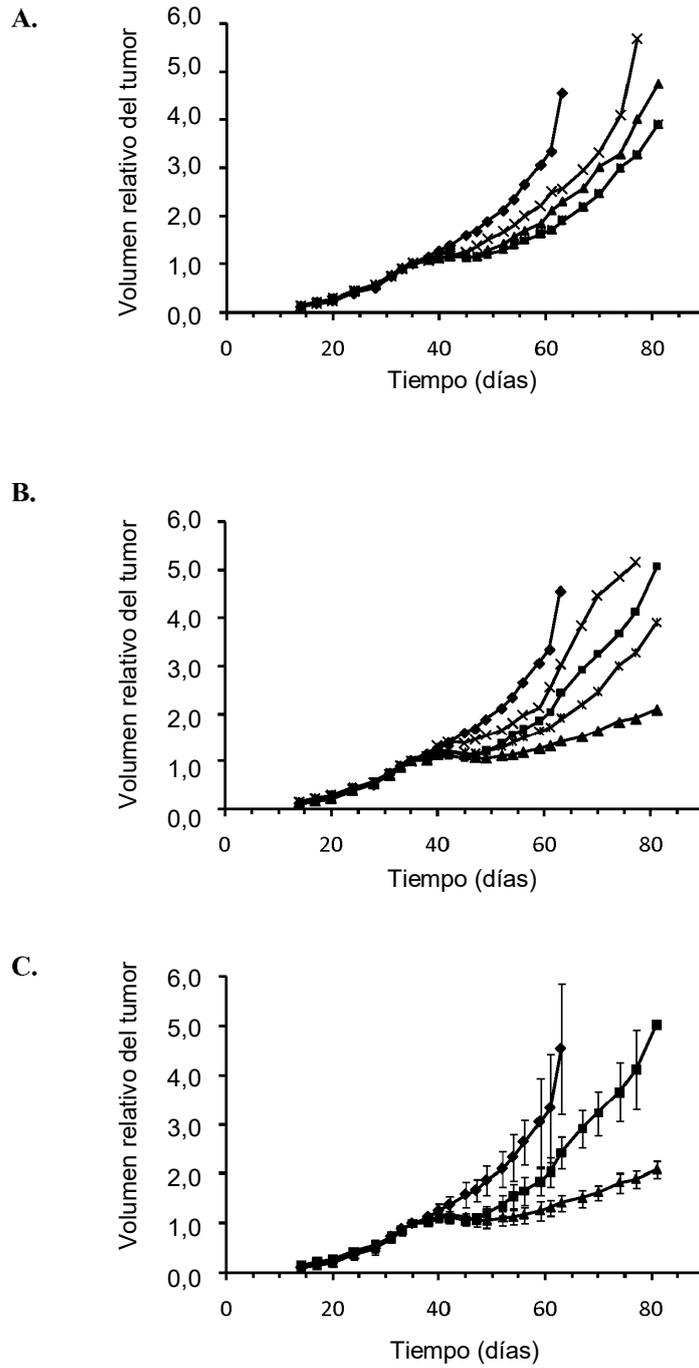


Figura 8

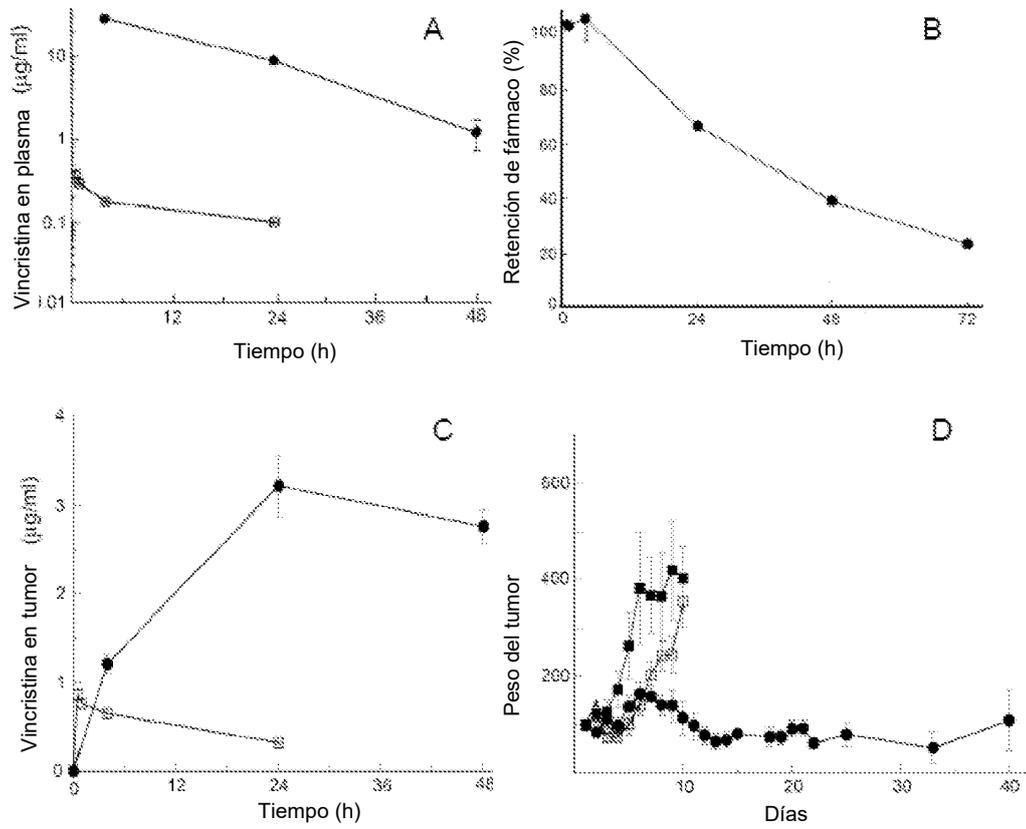


Figura 9

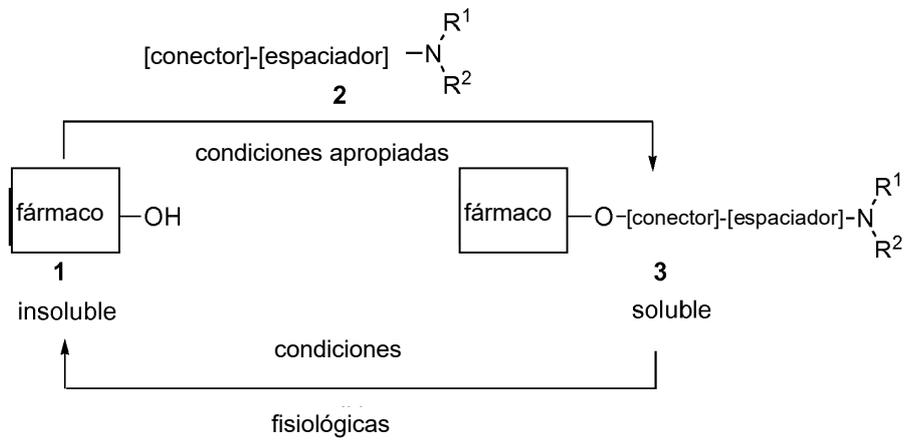


Figura 10