



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 679**

51 Int. Cl.:

C08G 69/40 (2006.01)

C08G 73/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02743647 .6**

96 Fecha de presentación : **19.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1408066**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Copolímero de bloques con bajo contenido de impurezas; vehículo polimérico; preparaciones farmacéuticas en forma polimérica y procedimiento para la preparación del mismo.**

30 Prioridad: **20.06.2001 JP 2001-187175**
20.06.2001 JP 2001-187176

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.08.2010

73 Titular/es: **NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA**
11-2, Fujimi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 102-8172, JP
Yasuhisa Sakurai

72 Inventor/es: **Nakanishi, Takeshi;**
Shimizu, Kazuhisa;
Uehara, Ryuji;
Suzuki, Masanobu;
Machida, Megumi;
Akutsu, Tomoko y
Fukushima, Shigeto

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Copolímero de bloques con bajo contenido de impurezas; vehículo polimérico; preparaciones farmacéuticas en forma polimérica y procedimiento para la preparación del mismo.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un copolímero de bloques de alta pureza, en el que las impurezas, que son polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos), tienen un contenido de no más de 10% en peso, siendo capaz de ser usado dicho copolímero de bloques como vehículo al transportar una medicina o similares, a un vehículo polimérico que se forma condensando el copolímero de bloques con un agente anticáncer de antraciclina y se usa como vehículo de una medicina, preparaciones farmacéuticas poliméricas formadas por el vehículo farmacéutico, y a uno de sus métodos de fabricación. Además, la presente invención se refiere también a un método de determinación cuantitativa para impurezas contenidas en el copolímero de bloques.

Antecedentes de la técnica

Se ha conocido un enfoque en el que, usando un vehículo polimérico que forma una micela, se transporta una medicina, genes y similares a un lugar diana en un organismo vivo; sin embargo, con respecto al copolímero de bloques usado para este propósito, las impurezas no han sido suficientemente retiradas de él.

Convencionalmente, los procedimientos de refinado del compuesto sintético de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques se han llevado a cabo usando un método tal como una operación de diálisis, una operación de ultrafiltración y una operación de precipitación.

En los métodos de refinado de la operación de diálisis y la operación de ultrafiltración, los procedimientos de separación y refinado se llevan a cabo basados en una diferencia de pesos moleculares. En general, las membranas de diálisis y las películas de ultrafiltración se clasifican en grupos dependiendo del peso molecular máximo que está permitido permear; sin embargo, hay grandes variaciones en precisión de pesos moleculares de la fracción. Consecuentemente, en los métodos para refinar el compuesto sintético de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques por medio de la operación de diálisis y la operación de ultrafiltración, no es posible llevar a cabo suficientes procedimientos de refinado en el caso en el que no hay una gran diferencia entre el peso molecular de un compuesto diana sintético de alto peso molecular y el peso molecular de las impurezas. Además, estos métodos no son apropiados para uso industrial, y se usan como método de refinado en laboratorios en la mayor parte de los casos.

En contraste, el método de refinado que usa un procedimiento de precipitación se ha usado mucho como método que es también aplicable para uso industrial. En este método, usando una diferencia en solubilidad en un disolvente, las impurezas se retiran para llevar a cabo procedimientos de refinado, y este método es superior para retirar componentes de bajo peso molecular de un compuesto sintético de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques. Sin embargo, en el caso de impurezas que tienen mayores pesos moleculares como polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos), hay solo una pequeña diferencia de solubilidad en un disolvente entre el compuesto sintético de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques y las impurezas, con el resultado de que el compuesto de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques no es suficientemente refinado por medio del procedimiento de precipitación.

Como se describe anteriormente, las impurezas que tienen grandes pesos moleculares, contenidas en un copolímero de bloques, no han sido suficientemente retiradas, y no se conoce un método de refinado, que se use apropiadamente para obtener un copolímero de bloques que sea también aplicable para preparaciones farmacéuticas y similares.

Además, con respecto a un copolímero de bloques que forma micelas que tiene una propiedad anfipática, el método convencional para determinar cuantitativamente impurezas en el copolímero de bloques no ha proporcionado suficientes resultados de análisis. En el método convencional, el compuesto sintético de alto peso molecular tal como un copolímero de bloques se disuelve en un disolvente, y se analiza usando una cromatografía de líquidos de alta velocidad en la que está conectada una columna de permeación de gel (cromatografía de permeación de gel:GPC).

Sin embargo, en el caso en el que hay solo una pequeña diferencia de pesos moleculares entre el copolímero de bloques y las impurezas contenidas en él, es difícil separarlas con picos claros, no proporcionando suficiente rendimiento como método de determinación cuantitativa para impurezas.

Además, incluso en el caso en el que hay una diferencia suficiente de pesos moleculares entre ellos, si la cantidad de impurezas es pequeña, no es posible obtener picos claros. Esto es porque dado que el mecanismo de separación por permeación de gel utiliza difusión molecular, un pico tiende a extenderse en el cromatograma para provocar insuficientes alturas de pico con respecto a un compuesto que está en pequeña cantidad. Consecuentemente, el método convencional no ha proporcionado un método de determinación cuantitativa con suficiente rendimiento.

Además, dado que el método convencional separa y determina cuantitativamente un componente principal e impurezas dependiendo solo de la diferencia de pesos moleculares, no se obtiene información cualitativa, tal como estructuras y proveniencia de las impurezas.

Descripción de la invención

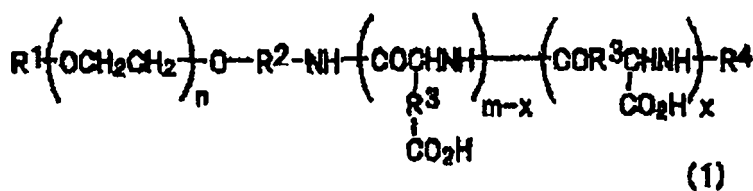
Los inventores de la presente invención han estudiado mucho para resolver los problemas anteriormente mencionados, y han ideado la presente invención.

En otras palabras, la presente invención se refiere a:

1) Un copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), o una de sus sales, en el que las impurezas que son polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos), tienen un contenido de no más del 10% en peso.

2) El copolímero de bloques o una de sus sales según 1), en el que el poli(aminoácido ácido) es poli(ácido aspártico).

3) El copolímero de bloques o una de sus sales según 1) o 2), en el que el copolímero de bloques es un copolímero representado por la fórmula (1):



en la que, R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R^2 representa un grupo de unión, R^3 representa un grupo metileno o un grupo etileno y R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x no es mayor que m .

4) El copolímero de bloques o una de sus sales según 3), en el que R^1 representa un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, R^2 representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, R^3 representa un grupo metileno o un grupo etileno y R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo acilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x no es mayor que m en la fórmula (1).

5) El copolímero de bloques o una de sus sales según 3), en el que R^1 representa un grupo metilo, R^2 representa un grupo trimetileno, R^3 representa un grupo metileno y R^4 representa un grupo acetilo, y n es un número entero de 20 a 500, m es un número entero de 10 a 100 y x es un número entero de 0 a 100; sin embargo, x no es mayor que m en la fórmula (1).

6) Un método de fabricación de un copolímero de bloques o una de sus sales según una cualquiera de 1) a 5), en el que un derivado de polietilenglicol se refina por medio de una resina de intercambio iónico para preparar un copolímero de bloques, y después de que se ha retirado el grupo protector, si es necesario, se lleva a cabo un procedimiento de refinado usando una resina de partición/adsorción.

7) Un vehículo polimérico, en el que el poli(aminoácido ácido) del copolímero de bloques según una cualquiera de 1) a 5) se condensa con un resto agente anticáncer de antraciclina.

8) El vehículo polimérico según 7), en el que la condensación entre el poli(aminoácido ácido) y el resto agente anticáncer de antraciclina es una condensación entre un ácido carboxílico de cadena lateral del poli(aminoácido ácido) y el resto agente anticáncer de antraciclina.

9) El vehículo polimérico según 7) u 8), en el que el resto agente anticáncer de antraciclina es un resto doxorubicina.

10) El vehículo polimérico según 7) u 8), en el que el resto agente anticáncer de antraciclina en el poli(aminoácido ácido) tiene un porcentaje de unión de 30 a 55%.

11) Un método de fabricación del vehículo polimérico según uno cualquiera de 7) a 10), en el que después de que se han separado un compuesto de condensación entre el copolímero de bloques descrito en uno cualquiera de 1) a 5) y una ayuda de reacción, se deja que el compuesto de condensación reaccione con un agente anticáncer de antraciclina.

12) El método de fabricación del vehículo polimérico según 11), en el que el agente anticáncer de antraciclina es doxorubicina o una de sus sales.

13) Una preparación farmacéutica polimérica que contiene un complejo de copolímero bloques-medicina en el que está contenido un agente anticáncer de antraciclina en un núcleo interno de una micela formada por el vehículo polimérico según uno cualquiera de 7) a 10).

14) La preparación farmacéutica polimérica según 13), en la que el agente anticáncer de antraciclina es doxorubicina o una de sus sales.

15) La preparación farmacéutica polimérica según 13) o 14), en la que el complejo de copolímero de bloques-medicina está contenido en forma de una materia liofilizada.

16) Un método de determinación cuantitativa de impurezas contenidas en el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) según 1), que comprende las etapas de:

disolver el copolímero de bloques en un disolvente;

someter la disolución a un tratamiento con resina; y

someter la disolución tratada a un tratamiento de cromatografía de líquidos de alta velocidad usando una columna de permeación de gel.

17) El método de determinación cuantitativa según 16), en el que el disolvente es agua que se permite que contenga un disolvente orgánico que está mezclado con agua, la resina es una resina de intercambio iónico, y las impurezas son polietilenglicoles.

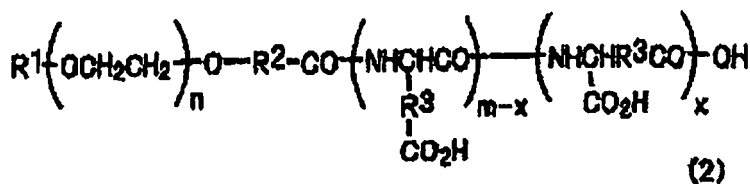
18) El método de determinación cuantitativa según 16), en el que el disolvente es agua que se permite que contenga un disolvente orgánico que está mezclado con agua, la resina es una resina de partición/adsorción que adsorbe un compuesto que tiene una unión éter, y las impurezas son poli(aminoácidos ácidos).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La siguiente descripción discutirá la presente invención con detalle.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un copolímero de bloques de polietilenglicol y poli(aminoácido ácido), o una de sus sales, en el que las impurezas tienen un contenido de no más del 10% en peso. Como resultado de los análisis de las impurezas contenidas en el copolímero de bloques, se ha encontrado que las impurezas consisten en polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), esto es, poliaminoácido que tiene ácido carboxílico en su cadena lateral. Los ejemplos de polietilenglicoles incluyen polietilenglicol, y polietilenglicol con un alcoxi terminal. Los ejemplos de poli(aminoácido ácido) incluyen poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico).

En la presente invención, con respecto al poli(aminoácido ácido) en el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), sus ejemplos incluyen un polímero de α - y/o β -aminoácido que tiene un grupo carboxílico en su cadena lateral, preferentemente, poli(ácido glutámico) o poli(ácido aspártico), y con respecto al copolímero de bloques, sus ejemplos incluyen copolímeros de bloques representados por la fórmula anteriormente mencionada (1) o (2) o su sales.



en la que R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R^2 representa un grupo de unión, R^3 representa un grupo metileno o un grupo alquileo y R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x no es mayor que m .

Aquí, los ejemplos de R^1 incluyen un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, y se usa preferentemente un grupo alquilo inferior, y sus ejemplos específicos incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n -propilo y un grupo i -propilo; en particular, se usa más preferentemente un grupo metilo. Con respecto a un grupo de unión de R^2 , sus ejemplos incluyen un grupo hidrocarbonado que puede tener una ramificación, y se usa preferentemente un grupo alquileo, y sus ejemplos específicos incluyen un grupo etileno, un grupo trimetileno y un grupo tetrametileno; en particular, se usan más preferentemente un grupo etileno y un grupo trimetileno. Con respecto a R^3 , se usa un grupo metileno o un grupo etileno, se usa más preferentemente un grupo metileno.

Con respecto a R^4 , se usa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, y, con respecto al grupo protector de un grupo amino, no particularmente limitado, se puede usar cualquier grupo con tal de que sea un grupo protector de un grupo amino usado normalmente; en particular, se usa preferentemente un grupo acilo inferior, y sus ejemplos específicos incluyen un grupo formilo, un grupo acetilo, un grupo propionilo y un grupo butirilo, y se usa más preferentemente un grupo acetilo. Aquí, n es un número entero de 5 a 1.000, más preferentemente de 20 a 500, lo más preferentemente de 80 a 300, m es un número entero de 2 a 300, más preferentemente de 10 a 100, lo más preferentemente de 20 a 50, y x es un número entero de 0 a 300, más preferentemente de 0 a 100, lo más preferentemente de 0 a 50; sin embargo, x no es mayor que m.

Con respecto a la sal de un copolímero de bloques en la presente invención, sus ejemplos incluyen una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo, una sal de amonio y una sal de amonio orgánico, y los ejemplos preferible son una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de calcio, una sal de amonio y una sal de trietilamonio.

Se considera que las impurezas contenidas en el copolímero de bloques no forman una micela y no tienen funciones para servir como vehículo polimérico de una medicina, un gen o similares; por lo tanto, para el propósito del uso médico, el contenido de las impurezas se reduce preferentemente a no más del 10%, mas preferentemente, no más del 5%.

Además, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método de fabricación de un copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), o una de sus sales, en el que los polietilenglicoles se refinan por medio de una resina de intercambio iónico seguido de la formación de un copolímero de bloques con poli(aminoácido ácido), y después de retirar de él un grupo protector, si es necesario, el copolímero de bloques se refina usando una resina de partición/adsorción. Con respecto al copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), se usa preferentemente el mismo copolímero de bloques que el anteriormente mencionado copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido). En el caso en el que el copolímero de bloques está protegido por un grupo protector, con respecto al grupo protector, aunque no particularmente limitado con tal de que normalmente proteja un grupo carboxílico en una cadena lateral del aminoácido ácido, sus ejemplos incluyen un éster con un alcohol inferior y un éster con un alcohol inferior substituido con un grupo arilo que puede tener un substituyente. Los ejemplos específicos son éster metílico, éster etílico, éster propílico, éster butílico, éster bencílico, éster fenetílico, éster p-metoxibencílico y éster p-nitrobencílico. Con respecto al método para retirar el grupo protector, se selecciona un método apropiado de los métodos usados normalmente dependiendo del grupo protector, y, por ejemplo, se puede usar un método hidrolítico por ácido o álcali y un método de hidrogenólisis usando un catalizador o similares.

Con respecto al copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) de la presente invención que está reducido en contenido de impurezas, la siguiente descripción discutirá el método de refinado de, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula (1).

Con respecto al método de síntesis del copolímero de bloques, se proponen varios métodos; y, por ejemplo, la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público No. 6-206832 ha descrito un método en el que un material, obtenido modificando un grupo hidroxilo terminal de polietilenglicol con un metoxi terminal, se somete a una reacción de polimerización con derivados de ácido aspártico, seguido de protección del grupo amino, siendo hidrolizada a continuación una unión éster, de modo que se produzca un copolímero de bloques; sin embargo, no se ha conocido ningún método de refinado para obtener el copolímero de bloques con alta pureza.

El procedimiento de modificación del grupo hidroxilo terminal de polietilenglicol con un metoxi terminal se puede llevar a cabo por métodos que usan reacciones que se conocen en la correspondiente técnica industrial, y, por ejemplo, se han propuesto los siguientes métodos: un método en el que se deja reaccionar etilenimina o similares, un método en el que, después de que acrilonitrilo, metacrilonitrilo o similares se han sometido a un procedimiento de adición de Michel, se reduce el grupo nitrilo para ser convertido en un grupo amino, un método en el que, después de que el grupo hidroxilo se ha substituido por un grupo halógeno, este se deja reaccionar con alcohol-amina tal como etanolamina, y un método en el que el grupo hidroxilo se convierte directamente en un grupo nitrilo, y a continuación se reduce para convertirlo en un grupo amino.

El polietilenglicol cuyo terminal se modifica a un grupo amino incluye polietilenglicoles de un terminal que tienen modificación incompleta, es decir, por ejemplo, polietilenglicol con un terminal que tiene un terminal de un grupo hidroxilo y un polietilenglicol con un terminal que tiene un terminal al que se ha añadido acrilonitrilo.

Estos polietilenglicoles que tienen modificación incompleta se pueden retirar de un modo separado usando un material de intercambio iónico que tiene un grupo funcional ácido. Aunque no está particularmente limitado con tal de que tenga un grupo funcional ácido, los ejemplos del material de intercambio iónico para ser usado incluye: Diaion SKIB (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion PK-216 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion WK-10 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion WK20 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), Amber lite 120B (fabricado por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite 200C (fabricado por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite IRC-50 (fabricado por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite IRC-76 (fabricado por Rohm and Haas Japan Co.) y Dowex50W (fabricado por Dow Chemical Corp.), que sirven como resinas de intercambio iónico; y también incluyen SP-Sephadex C-25 (fabricada por Pharmacia Biotech), SP-Sephadex C-50 (fabricada por Pharmacia Biotech), CM-Sephadex C-25 (fabricada por Pharmacia Biotech), CM-Sephadex C-50 (fabricada por Pharmacia Biotech), SP-Toyopearl 550 (fabricada por Toso K.K.), SP-Toyopearl 650 (fabricada por Toso K.K.), CM-

Sephadex 550 (fabricada por Pharmacia Biotech) y CM-Sephadex 650 (fabricada por Pharmacia), que sirve como gel de intercambio iónico, y en particular, se usan preferentemente SP-Toyopearl 650 y CM-Sephadex 650.

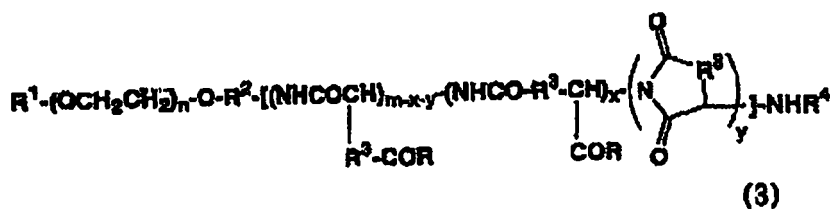
El método para refinar el polietilenglicol resultante puede ser un método en lotes y un método en columna; y se usa más preferentemente el método en columna. En otras palabras, se disuelve en un disolvente polietilenglicol con un metoxi terminal que tiene un terminal modificado. El disolvente que se va a usar no está particularmente limitado con tal de que sea aplicable a un procedimiento de intercambio iónico, y se usa preferentemente agua o un disolvente mezcla de agua/disolvente orgánico, tal como agua/metanol y agua/acetonitrilo. Sucesivamente, la disolución resultante se deja pasar a través de una columna en la que se ha cargado el anteriormente mencionado material de intercambio iónico convertido a una forma H^+ , y la columna se lava a continuación con agua o un disolvente mezcla de agua/disolvente orgánico de modo que los polietilenglicoles que han sido incompletamente modificados se retiran de ella. A continuación, polietilenglicol con metoxi terminal con el terminal modificado a un grupo amino, que se ha adsorbido, se eluye usando un disolvente con una sustancia básica añadida en él, tal como amoníaco acuoso o un disolvente mezcla de amoníaco acuoso/disolvente orgánico. La disolución eluida de este modo se somete a procedimientos apropiados, tal como un procedimiento de condensación o a un procedimiento de congelación y secado, de modo que se obtiene polietilenglicol con un metoxi terminal con el terminal modificado a un grupo amino, que tiene alta pureza.

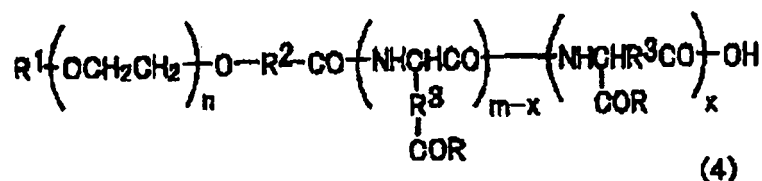
A continuación, el polietilenglicol con un metoxi terminal con el terminal modificado a un grupo amino se deja reaccionar con, por ejemplo, un anhídrido N-carboxílico de aminoácido en el que un grupo carboxílico en una cadena lateral ha sido protegido de modo que se sintetice un copolímero de bloques, y, si es necesario, el grupo amino en el terminal se acetila a continuación con anhídrido acético o similares. A continuación, si es necesario, el grupo protegido en la cadena lateral se desprotege de modo que se obtiene un copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido).

El copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido), obtenido de este modo, contiene poli(aminoácido ácido) como impureza; sin embargo, este se puede refinar usando una resina de partición/adsorción. Con respecto a la resina de partición/adsorción, sus ejemplos incluyen gel de sílice, polvo de silicato, gel de sílice modificada con hidrocarburo y resina de estireno/divinilbenceno, y se usa preferentemente resina de estireno/divinilbenceno; adicionalmente, se usa más preferentemente HP-20 SS (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation).

El método para refinar el copolímero de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido) puede ser cualquiera de un método en lotes y un método en columna; y se usa más preferentemente el método en columna. En otras palabras, el copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido) se disuelve en un disolvente. El disolvente que se va a usar no está particularmente limitado con tal de que tenga una propiedad básica suficiente para disociar el poli(aminoácido ácido), y sea aplicable para la resina de partición/adsorción; y los ejemplos preferibles incluyen una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino o una disolución mezcla de disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino y disolvente orgánico, tal como disolución acuosa de hidróxido de sodio/metanol y disolución acuosa de hidróxido de sodio/acetonitrilo. La disolución de copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido) disuelta en el disolvente se deja pasar a través de una columna en la que se ha cargado una resina de partición/adsorción, y una disolución acuosa de hidróxido de sodio o un disolvente mezcla de disolución acuosa de hidróxido de sodio/disolvente orgánico se deja pasar a continuación a través de la columna de modo que se retira el poli(aminoácido ácido). A continuación, el copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido) adsorbido se eluye usando un disolvente menos polar, tal como un disolvente mezcla de agua/disolvente orgánico con una proporción incrementada del disolvente orgánico. La disolución eluida de este modo se somete a post-procedimientos apropiados, tal como un procedimiento de condensación, un procedimiento de congelación y secado o precipitación, de modo que se obtiene un copolímero de bloques de polietilenglicol-poli(aminoácido ácido) que tiene alta pureza.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un vehículo polimérico que se obtiene condensando el copolímero de bloques refinado de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), junto con agente anticáncer de antraciclina. Con respecto al vehículo polimérico, se propone un compuesto de alto peso molecular, representado por la siguiente fórmula (3) o (4). La presente invención incluye también sus sales.





en las que R representa un grupo hidroxilo o un resto agente anticáncer de antraciclina, R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R² representa un grupo de unión, R³ representa un grupo metileno o un grupo etileno y R⁴ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x+y es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x+y no es mayor que m.

Con respecto a R en el compuesto representado por la fórmula (3) o (4) en la presente invención, sus ejemplos incluyen un grupo hidroxilo o un resto agente anticáncer de antraciclina. En la porción de poli(aminoácido ácido) del copolímero de bloques, el orden de unión de las respectivas partes constituyentes no está particularmente limitado, y se puede disponer al azar o disponer regularmente. El modo de unión entre el resto ácido carboxílico de la cadena lateral del poli(aminoácido ácido) del copolímero de bloques y el resto agente anticáncer de antraciclina no está particularmente limitado, y se usa preferentemente la unión amida al grupo amino del resto agente anticáncer de antraciclina. En particular, se usa preferentemente la unión amida formada por un grupo amino primario de la porción de amino-azúcar del resto agente anticáncer de antraciclina. La proporción de agente anticáncer de antraciclina unido al resto ácido carboxílico de la cadena lateral de la porción poli(aminoácido ácido) es de 1 a 100%, y cuando se tiene en consideración la capacidad de formar una micela, la proporción se fija preferentemente en un intervalo de 10 a 60%, más preferentemente de 30 a 55%. Los ejemplos de resto agente anticáncer de antraciclina incluyen restos tales como daunorubicina, doxorubicina, aclarubicina, epirubicina y pirarubicina, y se usan más preferentemente restos de doxorubicina.

R¹, R², R³, R⁴, n y m se fijan preferentemente en el mismo intervalo que se describió previamente.

Aquí, x+y es un número entero de 0 a 300, preferentemente de 0 a 100, más preferentemente de 0 a 50, y x e y pueden ser cualquier valor incluyendo 0 con tal de que cada uno de ellos sea un número entero que satisface las condiciones anteriormente mencionadas.

Además, un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método de fabricación de un vehículo polimérico que se obtiene por medio de procedimientos en los que: el copolímero de bloques refinado de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) se condensa con una ayuda de reacción, y después de que se ha separado el compuesto de condensación, este se deja reaccionar con un agente anticáncer de antraciclina. El vehículo polimérico se obtiene por un método descrito en el folleto de publicación internacional No. WO97/12895, es decir, un método en el que un copolímero de bloques y un agente anticáncer de antraciclina se condensan usando un agente de condensación de deshidratación del tipo de carbodiimida; sin embargo, en este momento, acilisuera, que es un intermedio activo, se transfiere por transposición intramolecular para producir acilurea como subproducto, dando como resultado un vehículo polimérico al que se añade acilurea. Aquí, separando el compuesto de condensación entre el copolímero de bloques y la ayuda de reacción, se hace posible reducir el subproducto acilurea, y consecuentemente proporcionar un vehículo polimérico con menos acilurea añadida en él. La temperatura del puerto de inyección de la cromatografía de gases se fija a un nivel suficientemente alto, a continuación la cantidad de subproducto de acilurea añadida en él se determina cuantitativamente midiendo los derivados de isocianato que se han descompuesto térmicamente de la acilurea.

La siguiente descripción explicará el anteriormente mencionado método de fabricación más específicamente. El copolímero de bloques refinado se disuelve en un disolvente orgánico, y a este se añade un agente de condensación deshidratación y una ayuda de reacción de modo que tenga lugar una reacción, y los derivados de alquilurea generados por la reacción, se filtran de modo que se separe del filtrado un material de éster activo. Sucesivamente, después de que se ha añadido un agente anticáncer de antraciclina o una de sus sales al material de éster activo resultante en un disolvente orgánico, se le añade una base, si es necesario, para reaccionar con ellos, y se aísla un vehículo polimérico de la disolución de reacción. Con respecto al disolvente orgánico, aunque no está particularmente limitado con tal de que el material de reacción esté disuelto en él, se usa preferentemente un disolvente polar no acuoso, y sus ejemplos incluyen dimetilformamida, dimetilacetamida y 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, y se usa más preferentemente dimetilformamida. Con respecto al agente de condensación deshidratación que se va a usar para la condensación entre el copolímero de bloques y la ayuda de reacción, se usa un agente de condensación usado normalmente para síntesis de péptidos, y se usan preferentemente tales como diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Con respecto a la ayuda de reacción, se usa una ayuda de reacción que se usa normalmente para síntesis de péptidos. Sus ejemplos incluyen N-hidroxi-compuestos, y N-hidroxi-succinimida. Se usan preferentemente N-hidroxibenzotriazol y similares. Con respecto a la base que se va a usar, aunque no está particularmente limitada, se usan preferentemente bases orgánicas tales como trietilamina. Con respecto al agente anticáncer de antraciclina, se usa un compuesto basado en antraciclina que suministra el resto agente anticáncer de antraciclina anteriormente mencionado.

Además, un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica polimérica que contiene un complejo de copolímero de bloques-medicina en el que se encierra un agente anticáncer de antraciclina en el núcleo interno de una micela formada por un vehículo polimérico que se fabrica de un copolímero de bloques refinado de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido). Los ejemplos del agente anticáncer de antraciclina incluyen compuestos, tales como daunorubicina, aclarubicina, epirubicina y pirarubicina, o sus sales, y se usa más preferentemente doxorubicina o una de sus sales. Además, otro aspecto de la presente invención se refiere también a una preparación farmacéutica polimérica en la que está contenido el complejo de copolímero de bloques-medicina en la forma de materia liofilizada. El método de fabricación de la anteriormente mencionada preparación farmacéutica polimérica no está particularmente limitado, y el método descrito en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público No. 7-69900, esto es, un método en el que una mezcla de disolvente de dimetilformamida y agua en la que están disueltos el copolímero de bloques y el agente anticáncer de antraciclina se somete a una operación de diálisis usando una membrana de diálisis y se puede usar una operación de ultrafiltración usando una película de ultrafiltración y este se congela y seca, si es necesario. Además, se puede usar otro método en el que el copolímero de bloques y el agente anticáncer de antraciclina se disuelven en una mezcla de disolvente de un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición que está mezclado con agua, tal como etanol, y agua, y la disolución resultante se condensa para separar por destilación el disolvente orgánico de bajo punto de ebullición, y se congela y seca, si es necesario.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un método de determinación cuantitativa en el que, en la determinación cuantitativa, las impurezas contenidas en el copolímero de bloques anteriormente mencionado de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), el copolímero de bloques se disuelve en un disolvente, y la disolución se somete a un tratamiento con resina de modo que la disolución de tratamiento se somete a un tratamiento de cromatografía de líquidos de alta velocidad usando una columna de permeación de gel. Con respecto al copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) y las impurezas contenidas en el copolímero de bloques, sus ejemplos son los mismos que los descritos anteriormente.

En la presente invención, con respecto al disolvente usado para disolver el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) al determinar cuantitativamente los polietilenglicoles contenidos como impurezas, se puede usar cualquier disolvente deseado capaz de disolver el copolímero de bloques; y se usa preferentemente una disolución acuosa cuyo pH se ajusta usando una sal apropiada, o un disolvente mezcla de esta disolución acuosa y un disolvente orgánico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Con respecto a la sal usada para ajustar el pH, se pueden usar sales que tienen una función de tampón normalmente usadas, y preferentemente se usan fosfatos, boratos, hidrogenocarbonato de sodio, ftalatos, tris-hidrocloruros y similares.

Además, con respecto al disolvente usado para determinar cuantitativamente poliaminoácido contenido como impurezas, se puede utilizar cualquier disolvente que es capaz de disolver el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) y de ácido carboxílico disociado en una cadena lateral, al determinar cuantitativamente polietilenglicoles; y preferentemente, se usa una disolución acuosa cuyo pH se ajusta usando una sal apropiada o un disolvente mezcla de esta disolución acuosa y un disolvente orgánico, tal como metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Para disociar apropiadamente el ácido carboxílico en la cadena lateral, el pH del disolvente se fija preferentemente en un intervalo de 5 a 13, y con respecto a la sal que se va a usar para este propósito, se usan los anteriormente mencionados fosfatos, boratos, hidrogenocarbonato de sodio, ftalatos, tris-hidrocloruros y similares.

En la presente invención, con respecto a la resina usada para procesar la disolución del copolímero de bloques al determinar cuantitativamente los polietilenglicoles contenidos en el copolímero de bloques como impurezas, se usa preferentemente una resina de intercambio iónico, que puede formar un contraión de un grupo iónico disociado del copolímero de bloques, esto es, una resina de intercambio aniónico; y no particularmente limitada, se puede usar cualquier resina de intercambio iónico, tal como una dialquilamina, una trialkilamina y una dialquiletanolamina, con tal de que tenga un grupo funcional básico.

Con respecto al método de análisis, se puede usar un método en lotes y un método en columna; y se usa más preferentemente el método en columna.

En el método en columna, se propone un método en el que: se carga en una columna abierta una resina de intercambio iónico, tal como Diaion SA10A (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion PA-318 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion SA20A (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion WA30 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), Diaion WA10 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), Amber lite IRA402 (fabricada por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite MR904 (fabricada por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite IRA-410 (fabricada por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite IRA-93 (fabricada por Rohm and Haas Japan Co.), Amber lite IRA-68 (fabricada por Rohm and Haas Japan Co.) y Dowex66 (fabricada por Dow Chemical Japan Corp.); un material de intercambio iónico de celulosa, tal como Cellex QAE (fabricada por Bio-Rad Co. Ltd.), Cellex PEI (fabricada por Bio-Rad Co., Ltd.), Cellex D (fabricada por Bio-Rad Co. Ltd.) y Cellex DE52 (fabricado por Bio-Rad Co. Ltd.); o un material de intercambio iónico en gel, tal como QAE-Sephadex A-25 (fabricada por Pharmacia Biotech), QAE-Sephadex A-50 (fabricada por Pharmacia Biotech), DEAE-Sephadex A-25 (fabricada por Pharmacia Biotech), y DEAE-Sephadex A-50 (fabricada por Pharmacia Biotech), DEAE-Sepharose CL-6B (fabricada por Pharmacia Biotech), y DEAE-Bio Gel A (fabricada por Pharmacia Biotech), o se propone otro método en el que se usa un cartucho comercial que tiene una resina de intercambio iónico preliminarmente cargada en él, y se usa para el pre-procesado de la cromatografía de líquidos de alta velocidad, tal como Sep-Pak QMA (fabricado por Waters Co. Ltd.), Sep-Pak NH₂ (Waters Co. Ltd.), Bond Elut PSA (fabricado por Barian Co., Ltd.), Bond Elut DMA (fabricado

ES 2 343 679 T3

por Barian Co. Ltd.), y Bond Elut SAX (fabricado por Barian Co. Ltd.). Aquí, desde el punto de vista de la facilidad de análisis, se usa más preferentemente el método que usa cartuchos. En particular se usa más preferentemente Sep-Pak QMA.

En un análisis cuantitativo de los polietilenglicoles contenidos en el copolímero de bloques como impurezas, algunos de los polietilenglicoles que han sido sometidos a los tratamientos con resina anteriormente mencionados, y eluidos sin ser adsorbidos a la resina se analizan por cromatografía de líquidos de alta velocidad usando una columna de permeación de gel para obtener los resultados del análisis. En este método, dado que la disolución eluida se puede condensar hasta una alta concentración, se hace posible analizar cuantitativamente polietilenglicoles con alta sensibilidad.

En la presente invención, con respecto al vehículo para una columna de permeación de gel para uso en medidas cuantitativas de impurezas, no particularmente limitada, cualquier vehículo se puede usar con tal de que se use para la cromatografía de líquidos de alta velocidad; sin embargo, dependiendo de los pesos moleculares aproximados de las impurezas en el copolímero de bloques, se usan los vehículos que tienen pesos moleculares límite de exclusión apropiados. Con respecto a la medidas cuantitativas para polietilenglicoles, por ejemplo, se usan los siguientes vehículos: Shodex Ohpak SB-803 HQ (fabricado por Showa Denko K.K.), Shodex Ohpak SB-802.5 HQ (fabricado por Showa Denko K.K.), Shodex Ohpak SB-804 HQ (fabricado por Showa Denko K.K.), y con respecto a las medidas cuantitativas para poli(aminoácidos ácidos), por ejemplo, se usan los siguientes vehículos: Asahipak GF-310 HQ (fabricada por Asahi Kasei Corporation) y Asahipak GF-510 HQ (fabricada por Asahi Kasei Corporation). Además de estos, se pueden usar también Asahipak GS-320 HQ (fabricada por Asahi Kasei Corporation) y Shodex Ohpak A-802 (fabricada por Showa Denko K.K.). Con respecto a la cromatografía de líquidos de alta velocidad en la presente invención, se puede usar un dispositivo de cromatografía de líquidos de alta velocidad comercial.

Además, con respecto a la resina que se usa para procesar la disolución del copolímero de bloques para llevar a cabo las medidas cuantitativas de poli(aminoácidos ácidos) contenidos en el copolímero de bloques entre polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos) de la presente invención como impurezas, se usa preferentemente una resina que adsorbe el copolímero de bloques que tiene una unión éter, esto es, una resina de partición/adsorción; y sus ejemplos incluyen gel de sílice, polvo de silicato, gel de sílice modificada con hidrocarburo y resina de estireno/divinilbenceno. Con respecto a la gel de sílice modificada con hidrocarburo, se usa preferentemente gel de sílice modificada con hidrocarburo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, y en particular, gel de sílice modificada con hidrocarburo que tiene de 4 a 18 átomos de carbono.

Con respecto al método de análisis, se puede usar uno de un método en lotes y un método en columna, y se usa más preferentemente el método en columna. Además, se puede usar una columna cargada con una resina de partición/adsorción comercial, y su tamaño se fija deseablemente. Además, se pueden usar también columnas de extracción en estado sólido de análisis comercial, tales como Sep-Pak C18 (fabricada por Waters Co. Ltd.), Sep-Pak tC18 (fabricada por Waters Co. Ltd.), Sep-Pak C8 (fabricada por Waters Co. Ltd.), Bond Elut C18 (fabricada por Barian Co. Ltd.) y Bond Elut C8 (fabricada por Barian Co. Ltd.), y se usa más preferentemente Sep-Pak C18.

Con respecto a los poli(aminoácidos ácidos) contenidos en el copolímero de bloques como impurezas, sus medidas cuantitativas se llevan a cabo de la siguiente manera: la disolución en la que se ha disuelto el poli(aminoácido ácido) por tal disolvente para disociar ácido carboxílico se somete a los anteriormente mencionados tratamientos en resina, y los poli(aminoácidos ácidos) que han sido eluidos sin ser adsorbidos en la resina se determinan cuantitativamente por cromatografía de líquidos de alta velocidad usando una columna de permeación de gel. En este método, dado que la disolución eluida se puede condensar hasta una alta concentración, se hace posible analizar cuantitativamente poli(aminoácidos ácidos) con alta sensibilidad.

Usando estos métodos de análisis, se midieron las cantidades de polietilenglicoles y poli(ácido aspártico), que estaban respectivamente contenidas en el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(ácido aspártico) obtenido por medio de los anteriormente mencionados procedimientos así como en un copolímero de bloques convencional de polietilenglicoles y poli(ácido aspártico), y sus resultados se muestran a continuación:

Cantidades de impurezas contenidas en el copolímero de bloques		
Impurezas	No refinadas	Refinadas
Polietilenglicoles	6,0% en peso	1,3% en peso
Poli(ácido aspártico)	7,5% en peso	2,4% en peso

Ejemplos

La siguiente descripción discutirá la presente invención con detalle por referencia a ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se pretende que esté limitada a estos ejemplos.

Ejemplo de producción 1

Se cargó en una columna de vidrio Toyopearl 650 M (900 ml), reproducido en una forma de H^+ . Se disolvió polietilenglicol con un metoxi terminal y un 3-aminopropoxi terminal (29,97 g) (peso molecular promedio en peso 5.287) en 1,98 l de una disolución acuosa de acetonitrilo al 10%, y esta disolución se dejó permear a través de la columna. Después de que se había lavado la columna con 1,6 l de disolución acuosa de acetonitrilo al 10%, se reveló la columna usando amoníaco acuoso 0,4 M que contiene acetonitrilo al 10%. Las fracciones que contienen el compuesto objetivo se recogieron, y después de haberse condensado a presión reducida, se congelaron y secaron para obtener 25,71 g de polietilenglicol con un metoxi terminal y un 3-aminopropoxi terminal purificado.

Ejemplo de producción 2

El polietilenglicol con un metoxi terminal y un 3-aminopropoxi terminal purificado (23,32 g), obtenido en el ejemplo de producción 1, se disolvió en 466 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se calentó a 35°C. A esto se añadieron 42,87 g de L-aspartato de β -bencilo-anhídrido N-carboxílico (BLA-NCA), y se dejó sufrir una reacción durante 22 horas. La mezcla de reacción se goteó en un disolvente mezcla que contiene 2,73 l de éter diisopropílico (IPE) y 0,93 l de etanol (EtOH), y el precipitado depositado se filtró, y se lavó con una disolución mezcla (4:1) de IPE y EtOH, seguido de IPE, y a continuación se secó a vacío de modo que se obtuvieron 54,29 g (número de unidades de ácido aspártico:29,0) de un copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(L-aspartato de β -bencilo).

Ejemplo de producción 3

El copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(L-aspartato de β -bencilo) (52,85 g) obtenido en el ejemplo de producción 2 se disolvió en 529 ml de dimetilformamida y se calentó a 35°C. A esto se añadieron 250 ml de anhídrido acético, y se dejó sufrir una reacción durante 3 horas. La mezcla de reacción se goteó en una mezcla disolvente que contiene 4,76 l de éter diisopropílico (IPE) y 0,53 l de etanol (EtOH), y el precipitado depositado se filtró y se lavó con una disolución mezcla (9:1) de IPE y EtOH, seguido de IPE, y a continuación se secó a vacío de modo que se obtuvieron 51,67 g de compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(L-aspartato de β -bencilo).

Ejemplo de producción 4

El compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(L-aspartato de β -bencilo) (50,19 g) obtenido en el ejemplo de producción 3, se dejó reaccionar con 753 ml de acetonitrilo y 2,16 l de disolución de hidróxido de sodio 0,2 N durante 5 horas. Después de que la mezcla de reacción se había neutralizado con ácido clorhídrico 2 N, se condensó a presión reducida para retirar acetonitrilo de ella, y después se sometió a procesos de extracción usando 1,2 l de acetato de etilo tres veces. Después de que la capa acuosa se había condensado, se fijó la cantidad de disolución en 1,3 l, y a esta se añadieron adicionalmente 11 ml de hidróxido de sodio 6N para formar una disolución acuosa básica, y la disolución se dejó permear a través de una columna HP-20 SS (2 l) que se había lavado suficientemente. Después de haber sido lavada con una disolución (8 l) acuosa de hidróxido de sodio 0,01 N y agua (3 l), esta se eluyó con acetonitrilo-agua (6 l) al 50%. Se recogieron las fracciones que contienen el compuesto objetivo y se condensaron a presión reducida, y la disolución resultante se dejó permear a través de Dowex 50W8 (520 ml) que había sido reconvertida a una forma H^+ , y se lavó con acetonitrilo-agua (1 l) al 50%. La disolución eluida se condensó adicionalmente a presión reducida y a continuación se congeló y secó. El producto liofilizado obtenido de este modo se disolvió en 320 ml de dimetilformamida (DMF) y la disolución resultante se goteó en un disolvente mezcla de 2,56 l de hexano y 0,64 l de acetato de etilo. El precipitado depositado se filtró y se lavó con una disolución mezcla (4:1) de hexano y acetato de etilo, seguido de hexano y a continuación se secó a vacío para obtener 33,20 g de un compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico).

Ejemplo de producción 5

El compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) (28,85 g) obtenido en el ejemplo de producción 4 se disolvió en 577 ml de dimetilformamida, y se calentó a 35°C. A esto se añadieron 19,75 g de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 11,01 g de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y se dejó reaccionar con esto durante 1 hora. La dicitclohexilurea resultante se filtró a través de un tapón de algodón. El filtrado obtenido de este modo se diluyó con 2,3 l de acetato de etilo y a esto se añadieron a continuación 3,5 l de hexano. El precipitado depositado se filtró, y se lavó con disolución de hexano:acetato de etilo (3:1) y a continuación se secó a vacío para obtener 33,82 g de material de éster activo de HOSu-compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico).

ES 2 343 679 T3

Ejemplo de producción 6

El material de éster activo de HOSu-compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) (33,73 g) obtenido en el ejemplo de producción 5, se disolvió en 1,35 l de dimetilformamida, y se calentó a 35°C. A esto se añadieron 26,13 g de hidrocloreuro de doxorubicina en polvo, y después de haber sido suspendido en una disolución de reacción, a esto se añadió adicionalmente 8,16 ml de trietilamina y se dejó reaccionar durante 1 hora. La mezcla de reacción se goteó en un disolvente mezcla que contiene 4,0 l de acetato de etilo y 16,0 ml de hexano, y el precipitado depositado se filtró y lavó con una disolución (3:1) de hexano:acetato de etilo, y a continuación se secó a vacío. A continuación, el precipitado resultante se suspendió en 590 ml de acetonitrilo y a esto se añadió a continuación 1.780 ml de agua y se calentó y agitó a 35°C. Después de confirmar que el precipitado se había disuelto, el procedimiento de agitación se continuó durante 1 hora, y la disolución de reacción se condensó a continuación a presión reducida para retirar acetonitrilo de ella, y se liofilizó. El producto liofilizado resultante se redisolvió en 1,074 l de dimetilformamida, y la disolución resultante se goteó en un disolvente mezcla que contiene 2,15 l de acetato de etilo y 8,60 l de hexano. El precipitado depositado se filtró y se lavó con una disolución (3:1) de hexano:acetato de etilo y a continuación se secó a vacío. Finalmente, el precipitado resultante se suspendió en 1.074 ml de etanol anhidro, y después de haber sido agitada a 35°C durante 2 horas, la suspensión se filtró y lavó con etanol anhidro, y a continuación se secó a vacío para obtener 45,39 g de producto de condensación de compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) - doxorubicina. La proporción de doxorubicina unida a un resto ácido carboxílico de cadena lateral de una porción de poli(ácido aspártico) del copolímero de bloques era aproximadamente 47%.

Ejemplo de producción 7

Al producto de condensación de compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) - doxorubicina (20,00 g) obtenido en el ejemplo de producción 6 se añadieron 100 ml de agua de uso para inyección, y esto se calentó a 35°C y se suspendió. A esto se añadieron 6,0 ml de una disolución de hidróxido de sodio 0,5 N, y se agitó y se añadieron adicionalmente 100 ml de etanol anhidro. Después de que se había confirmado que se disolvió el copolímero de bloques, se le añadió 3,906 g de hidrocloreuro de doxorubicina, y se disolvió en él. A esto se añadieron 5,9 ml de hidróxido de sodio 0,5 N para ajustar el pH a 6, y se añadieron adicionalmente 188 ml de agua de uso para inyección. Después de un lapso de una hora, la disolución se filtró usando un filtro de membrana (Millipore; tipo GV 0,22 µm), y el disolvente a continuación se separó por destilación a presión reducida para obtener una disolución del complejo de copolímero de bloques-medicina, y esta se congeló y secó para obtener 22,96 g de una materia liofilizada de complejo de copolímero de bloques-medicina.

Ejemplo 1

El copolímero de bloques (10,3 mg) obtenido en el ejemplo de producción 4 se disolvió en disolución tampón de ácido acético 10 mM (pH 7,0, 1 ml) para obtener 1,0043 g de una disolución de copolímero de bloques. Una porción (0,7491 g) de esta disolución se dejó pasar a través de una columna Sep-Pak QMA (fabricada por Waters Co., Ltd.) a través de la cual había permeado metanol, agua y disolución tampón de ácido acético 10 mM (teniendo cada uno 5 ml), y esta se lavó adicionalmente con disolución tampón de ácido acético 10 mM (3 ml). Se obtuvieron un total de 4,1171 g de disolución incluyendo fracciones que pasan libremente y fracciones de lavado. Esta disolución se determinó cuantitativamente por medio de cromatografía de líquidos de alta velocidad que tiene las siguientes condiciones, usando para ello una columna de permeación de gel. La cantidad de polietilenglicoles contenida en ella era 0,1005 mg (1,3% en peso).

Columna: Shodex Ohpak SB803+SB-G (fabricada por Showa Denko K.K.)

Temperatura de la columna: 40°C

Fase móvil: disolución acuosa de cloruro de sodio 100 mM

Caudal: 0,5 ml/min

Detector: detector refractómetro diferencial

Cantidad de inyección: 50 µl

Ejemplo 2

El copolímero de bloques (10,3 mg) obtenido en el ejemplo de producción 4 se disolvió en disolución tampón de ácido fosfórico 10 mM (pH 7,0, 1 ml) para obtener una disolución de copolímero de bloques. Esta se dejó pasar a través de una columna Sep-Pak C18 (fabricada por Waters Co., Ltd.) a través de la cual se habían pasado preliminarmente metanol, agua y disolución tampón de ácido acético 10 mM (teniendo cada uno 5 ml), y esta se lavó adicionalmente con disolución tampón de ácido fosfórico 10 mM (3 ml). Se obtuvieron un total de 4,1735 g de disolución incluyendo fracciones que pasan libremente y fracciones de lavado. Esta disolución se midió cuantitativamente por medio de cromatografía de líquidos de alta velocidad que tiene las siguientes condiciones, usando para ello una columna de permeación de gel. La cantidad de poli(ácido aspártico) contenida en ella era 0,250 mg (2,4% en peso).

ES 2 343 679 T3

Columna: Asahipak GF310 HQ + Asahipak GF-1B (fabricada por Asahi Kasei Corporation)

Temperatura de la columna: 40°C

5 Fase móvil: disolución tampón de ácido fosfórico 100 mM (pH 7,0)

Caudal: 0,5 ml/min

Detector: detector refractómetro diferencial (o detector UV)

10

Cantidad de inyección: 50 μ l

Ejemplo 3

15 El producto de condensación de compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) - doxorubicina (50 mg) obtenido en el ejemplo de producción 6 se pesó con precisión, y se disolvió en 25 ml de una disolución (1:1) de SDS al 4%:acetonitrilo. Esta disolución se analizó por medio de cromatografía de líquidos de alta velocidad que tiene las siguientes condiciones, y se encontró que se había aislado hidrocloreto de doxorubicina que tiene un contenido de 1,29% en peso, e impurezas derivadas de doxorubicina que tienen un contenido de 0,15% en peso (como se expresa en cuanto a equivalente de hidrocloreto de doxorubicina en base a absorbancia de luz).

20

Columna: Capsule pack C18UG80 5 μ m (fabricada por Shiseido Co., Ltd.), d.i. 4,6 mm x 150 mm.

25 Temperatura de la columna: 40°C

Fase móvil: (A) ácido fosfórico al 0,2%, SDS/H₂O al 0,15%:CH₃CN=7:3 (B) ácido fosfórico al 0,2%, SDS/H₂O al 0,15%: CH₃CN=3:7

30 Gradiente: B% (minutos); 25(0), 25(13), 100(30), 100(40)

Caudal: 1,0 ml/min

Detección: UV (254 nm)

35

Cantidad de inyección: 20 μ l

Ejemplo 4

40 El producto de condensación de compuesto N-acetilado de copolímero de polietilenglicol con un metoxi terminal-poli(ácido aspártico) - doxorubicina (30 mg) obtenido en el ejemplo de producción 6 se pesó con precisión, y se disolvió en 1 ml de dimetilformamida. La disolución se analizó por medio de cromatografía de gases que tiene las siguientes condiciones. La cantidad de derivados de dicitclohexilurea que se transfirieron y unieron no era mayor del 0,08% (no más que el límite de detección).

45

Columna: TC-1 (fabricada por GL Science Co., Ltd.), d.i. 30 mm x 0,25 mm, grosor de la película 0,25 μ m.

Fase móvil: Helio, 0,8 ml/min

50 Temperatura de la columna: 70°C, 3°C/min, 88°C, 15°C/min, 180°C (5 minutos)

Puerto de inyección: 290°C

Detector: FID (290°C)

55

Cantidad de inyección: División de flujo (20:1), 1 μ l

Efectos de la invención

60 La presente invención hace posible proporcionar un copolímero de bloques que tiene alta pureza del que se han retirado polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos) contenidos en un copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) como impurezas, para fabricar un vehículo polimérico que se forma condensando el copolímero y un agente anticáncer de antraciclina, y se puede usar para propósitos médicos como vehículo para una medicina y un gen, y también para proporcionar una preparación farmacéutica polimérica que contiene un agente anticáncer de antraciclina en un núcleo inerte de una micela que está formada por el vehículo polimérico.

65

Está claro que las impurezas, que están contenidas en el copolímero de bloques, y son retiradas por la presente invención, no ejercen funciones en la formación de la micela y similares, y el vehículo polimérico del que estas se han

ES 2 343 679 T3

retirado se considera que ejerce funciones superiores. Además, la preparación farmacéutica de alta pureza, obtenida usando este vehículo polimérico de alta pureza, forma una preparación farmacéutica de alta pureza que se usa para propósitos clínicos.

- 5 Además, la presente invención también hace posible determinar cantidades de polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos) que tienen ácido carboxílico en su cadena lateral que son impurezas en el copolímero de bloques anteriormente mencionado, y consecuentemente para proporcionar informaciones que son útiles para mejorar un método de fabricación de un copolímero de bloques, planificar sus estándares de producción y sus procedimientos de gestión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

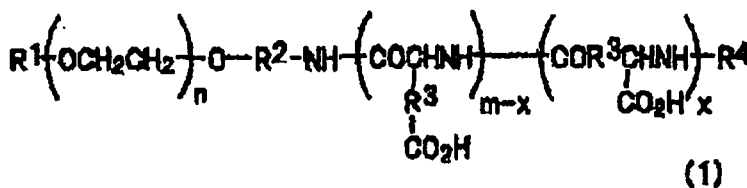
65

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido), o una de sus sales, en el que las impurezas, que son polietilenglicoles y poli(aminoácidos ácidos), tienen un contenido de no más del 10% en peso.

2. El copolímero de bloques o una de sus sales según la reivindicación 1, en el que el poli(aminoácido ácido) es poli(ácido aspártico).

3. El copolímero de bloques o una de sus sales según la reivindicación 1 o 2, en el que el copolímero de bloques es un copolímero representado por la fórmula (1):



en la que, R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R^2 representa un grupo de unión, R^3 representa un grupo metileno o un grupo etileno y R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de un grupo amino, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x no es mayor que m .

4. El copolímero de bloques o una de sus sales según la reivindicación 3, en el que R^1 representa un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, R^2 representa un grupo alquileo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, R^3 representa un grupo metileno o un grupo etileno y R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo acilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, y n es un número entero de 5 a 1.000, m es un número entero de 2 a 300 y x es un número entero de 0 a 300; sin embargo, x no es mayor que m en la fórmula (1).

5. El copolímero de bloques o una de sus sales según la reivindicación 4, en el que R^1 representa un grupo metilo, R^2 representa un grupo trimetileno, R^3 representa un grupo metileno y R^4 representa un grupo acetilo, y n es un número entero de 20 a 500, m es un número entero de 10 a 100 y x es un número entero de 0 a 100; sin embargo, x no es mayor que m en la fórmula (1).

6. Un método de fabricación de un copolímero de bloques o una de sus sales según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un derivado de polietilenglicol se refina por medio de una resina de intercambio iónico para preparar un copolímero de bloques, y después de que se ha retirado el grupo protector, si es necesario, se lleva a cabo un procedimiento de refinado usando una resina de partición/adsorción.

7. Un vehículo polimérico, en el que el poli(aminoácido ácido) del copolímero de bloques según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 se condensa con un resto agente anticáncer de antraciclina.

8. El vehículo polimérico según la reivindicación 7, en el que la condensación entre el poli(aminoácido ácido) y el resto agente anticáncer de antraciclina es una condensación entre un ácido carboxílico de cadena lateral del poli(aminoácido ácido) y el resto agente anticáncer de antraciclina.

9. El vehículo polimérico según la reivindicación 7 u 8, en el que el resto agente anticáncer de antraciclina es un resto doxorubicina.

10. El vehículo polimérico según la reivindicación 7 u 8, en el que el resto agente anticáncer de antraciclina en el poli(aminoácido ácido) tiene un porcentaje de unión de 30 a 55%.

11. Un método de fabricación del vehículo polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que después de que se han separado un compuesto de condensación entre el copolímero de bloques descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una ayuda de reacción, se deja que el compuesto de condensación reaccione con un agente anticáncer de antraciclina.

12. El método de fabricación del vehículo polimérico según la reivindicación 11, en el que el agente anticáncer de antraciclina es doxorubicina o una de sus sales.

13. Una preparación farmacéutica polimérica que contiene un complejo de copolímero de bloques-medicina en el que está contenido un agente anticáncer de antraciclina en un núcleo interno de una micela formada por el vehículo polimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

ES 2 343 679 T3

14. La preparación farmacéutica polimérica según la reivindicación 13, en la que el agente anticáncer de antraciclina es doxorubicina o una de sus sales.

5 15. La preparación farmacéutica polimérica según la reivindicación 13 o 14, en la que el complejo de copolímero de bloques-medicina está contenido en forma de una materia liofilizada.

16. Un método de determinación cuantitativa de impurezas contenidas en el copolímero de bloques de polietilenglicoles y poli(aminoácido ácido) según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

10 disolver el copolímero de bloques en un disolvente; someter la disolución a un tratamiento con resina; y someter la disolución tratada a un tratamiento de cromatografía de líquidos de alta velocidad usando una columna de permeación de gel.

15 17. El método de determinación cuantitativa según la reivindicación 16, en el que el disolvente es agua que se permite que contenga un disolvente orgánico que está mezclado con agua, la resina es una resina de intercambio iónico, y las impurezas son polietilenglicoles.

20 18. El método de determinación cuantitativa según la reivindicación 16, en el que el disolvente es agua que se permite que contenga un disolvente orgánico que está mezclado con agua, la resina es una resina de partición/adsorción que adsorbe un compuesto que tiene una unión éter, y las impurezas son poli(aminoácidos ácidos).

25

30

35

40

45

50

55

60

65