



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 282 439**

(51) Int. Cl.:

C08G 69/10 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02754661 .3**

(86) Fecha de presentación : **03.06.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1392756**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

(54) Título: **Nuevos conjugados lipídico-poliméricos, su procedimiento de preparación, y sus aplicaciones.**

(30) Prioridad: **01.06.2001 EP 01202107**

(73) Titular/es: **Astellas Pharma Europe B.V.**
Elisabethhof 19
2353 EW Leiderdorp, NL

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

(72) Inventor/es: **Metselaar, J. M.;**
Hennink, W. E.;
De Vringer, Tom;
De Boer, L. W. T.;
Oussoren, C.;
Storm, G. y
Bruin, P.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

(74) Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

Nuevos conjugados lipídico-poliméricos, su procedimiento de preparación, y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere a conjugados de lípidos-polímeros, a su preparación y sus utilizaciones.

Antecedentes de la invención

Los conjugados de lípidos-polímeros son bien conocidos y son utilizados para una variedad de distintas aplicaciones. Una de éstas es su inclusión en composiciones de soporte coloidal, tales como los sistemas bicapas vesiculares, como los liposomas, niosomas y vesículas inversas, sistemas micelares, nanocápsulas, nanosferas, etc. Un representante bien conocido de estas composiciones de soporte coloidal es formado por liposomas. Aunque se mencionen especialmente los liposomas a continuación, el lector debe tener en cuenta que las discusiones, revelaciones y enseñanzas se refieren también a otras composiciones de soporte coloidal.

15 Los liposomas que pertenecen al grupo de partículas de soporte coloidal, son pequeñas vesículas que se componen de una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran un espacio acuoso. Debido a su versatilidad estructural en términos de tamaño, carga superficial, composición lipídica, fluidez de las bicapas y debido a su capacidad para encapsular casi cada medicamento, su importancia como sistemas de suministro de medicamento ha sido inmediatamente valorada. Sin embargo, a la inyección intravenosa de liposomas, éstos son reconocidos como partículas extrañas por el Sistema Fagocito Mononuclear (SFM) y son sacados rápidamente de la circulación hacia los órganos ricos en células fagocíticas, como el hígado, bazo y médula. Se han identificado varias posibilidades para reducir este efecto, tal como disminuir el tamaño de partículas de los liposomas y cambiar la carga superficial de los liposomas. Otro desarrollo se refiere a la modificación superficial de los liposomas mediante la introducción de componentes poliméricos hidrofílicos específicos en la superficie liposomal, grupos que reducen la adsorción proteica en la superficie de las partículas. En consecuencia, estos liposomas están protegidos contra el reconocimiento por las células del SFM y tienen un tiempo de estancia prolongado en la circulación general. Un ejemplo bien conocido de modificación de la superficie liposomal es la incorporación durante la preparación de las composiciones liposomales de un derivado lipídico del polietilén-glicol (PEG) del polímero hidrofílico. Normalmente este polímero es de terminal modificado con una parte hidrofóbica, que es el residuo de un derivado de fosfatidil-etanol-amina o un ácido graso de cadena larga. El polietilén-glicol en sí es un polímero más bien estable, que es un repelente de la adhesión de proteínas y que no está sujeto a la degradación enzimática o hidrolítica en condiciones fisiológicas.

35 Se han obtenido buenos resultados con respecto a la extensión de la vida media del plasma y a la disminución de su acumulación en los órganos ricos en células fagocíticas después de la administración intravenosa de liposomas, con una superficie injertada de PEG, a varias especies animales y también a seres humanos (Storm G., Belliot S.O., Dae-men T. and Lasic D.D.: Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system in Adv. Drug Delivery Rev. 17, 31-48, (1995); Moghimi S.M., Hunter A.C. and Murray J.C.: Long-circulating and target-specific nanoparticles; theory to practice in Pharmacol. Rev. 53, 283-318, (2001); Boerman O.C., Dams E.T., 40 Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Radiopharmaceuticals for scintigraphic imaging of infection and inflammation in Inflamm. Res. 50, 55-64, (2001)). Se han obtenido las aprobaciones comerciales para estas preparaciones liposomales que contienen doxorubicina.

Mientras tanto se han encontrado varios inconvenientes a la utilización del polímero polietilén-glicol en los liposomas de larga circulación. La acumulación de liposomas injertados con PEG en los macrófagos y la piel es algo preocupante debido a la no-biodegradabilidad. Se ha observado la pérdida de la propiedad de larga circulación (eliminación rápida) al inyectar PEG-liposomas una segunda vez (Dams E.T., Laverman P., Oijen W.J., Storm G., Scherphof G.L., Van der Meer J.W., Corstens F.H. and Boerman O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes in J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 1071-1079, (2000)). Unos estudios recientes con PEG-liposomas en pacientes han mostrado que los PEG-liposomas pueden inducir efectos secundarios agudos (rubor facial, opresión de pecho, falta de aliento, cambios en la presión sanguínea), que se resuelven inmediatamente cuando termina la administración (infusión) de la formulación de PEG-liposoma. Unos datos recientes señalan un papel de activación complementaria en la inducción de efectos secundarios (Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Lutz H., Jelezarova E., Bunger R., and Alving C.R.: The role of complement activation in hypersensitivity to Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in J. Liposome Res. 10, 467-481, (2000)). Hasta ahora las preparaciones comercialmente disponibles basadas en los PEG-liposomas son preparaciones acuosas de suspensión. Es bien conocido que la vida útil en depósito de las preparaciones acuosas liposomales de suspensión en general y también de PEG-liposomas es más bien limitada. Se conocen varias técnicas sobre cómo eliminar el vehículo o fase continua de estas preparaciones, tales como secado por aspersión, diafiltración, evaporación rotacional, etc., y preferentemente liofilización. Recientemente, se propuso un método de liofilización, que mejora la vida útil en depósito a largo plazo de los PEG-liposomas, que contiene el quelante de tecnecio hidrazín-nicotín-amida (Laverman P., van Bloois L., Boerman O.C., Oyen W.J.G., Corstens F.H.M. and Storm G.: Lyophilisation of Tc-99m-HYNIC labelled PEG-liposomes in J. Liposome Res. 10(2&3), page 117-129 (2000)), pero son necesarias más investigaciones sobre los resultados y aplicabilidad de esta técnica para preparaciones liposomales.

65 Los inconvenientes inherentes a la utilización del polietilén-glicol instaron a los investigadores a buscar polímeros alternativos. Numerosos polímeros han sido sugeridos como candidatos adecuados para derivatizarlos con lípidos (formadores de vesículas) para su incorporación en los liposomas (véase por ejemplo la EP-0688207). Los polímeros

ES 2 282 439 T3

hidrofílicos solubles en agua, poli-(vinil-pirrolidona), poli-(acriloil-morfolina), poli-(2-(m)etil)-2-oxazolina, poliacrilamida y poliglicerol han demostrado prolongar hasta cierto punto el tiempo de circulación de los liposomas después de la administración intravenosa. Sin embargo, hasta ahora estos conjugados de lípidos-polímeros no han sido aplicados en preparaciones de medicamentos comercialmente disponibles, principalmente debido a que no han mostrado ventajas

5 con respecto a los conjugados conocidos de lípidos-PEG. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de encontrar un polímero, que pueda ser derivatizado con un lípido para permitir su incorporación dentro de composiciones de soporte coloidal, tales como los liposomas, teniendo este polímero propiedades de larga circulación y además de esto teniendo ventajas con respecto al PEG, tal como la biodegradabilidad.

10 Sumario de la invención

Se proporcionan conjugados de lípidos-polímeros, los cuales pueden ser obtenidos a partir de un lípido anfifílico, compuesto de al menos una parte apolar hidrofóbica y un grupo de cabeza polar hidrofílico, así como un polímero o un precursor monomérico para lo mismo, que tiene un grupo extremo N- y C-terminal, en el cual el polímero es 15 un poli-(aminoácido), un derivado de poli-(aminoácido) o un análogo de poli-(aminoácido) y en el cual el lípido está unido covalentemente al grupo extremo N- o C-terminal del polímero, teniendo el polímero la fórmula siguiente:



en la cual:

- R es definido como: -H, -CH₃, -CHCH₃OR₁, -(CH₂)_xOR₁, -(CH₂)_x-CO-NHR₁, -(CH₂)_x-NH-CO-R₁, -(CH₂)_x-SO_yCH₃, OR -(CH₂)_xCOOH;

25 - R₁ es H o alquilo (C₁-C₄), sustituido por uno o más grupos hidroxilo o un grupo dialquil-amina (C₁-C₄);

30 x es 0-4; m = 1 ó 0 e y = 1 ó 2.

35 También se proporcionan los métodos para preparar estos conjugados y utilizaciones de los conjugados.

Leyendas de las figuras

35 - La Figura 1 es una representación gráfica de los valores principales para la dosis inyectada de un porcentaje calculado en las muestras de sangre con respecto al tiempo para las preparaciones liposomales que contienen PEG-DSPE, la cual tiene una cantidad diferente de Lípido Total (Ejemplo 22).

40 - La Figura 2 es una representación gráfica de los valores principales para la dosis inyectada de un porcentaje calculado en las muestras de sangre con respecto al tiempo para las preparaciones liposomales que contienen PHEA-DODASuc, la cual tiene una cantidad diferente de Lípido Total (Ejemplo 22).

45 - La Figura 3 es una representación gráfica del porcentaje encapsulado de fosfato de prednisolona respectivamente en PEG-DSPE y PHEA-DODASuc, que contiene preparaciones liposomales con respecto al tiempo (Ejemplo 23).

- La Figura 4 es una representación gráfica de la concentración de fosfato de prednisolona encapsulada en los 50 liposomas que contienen PEG-DSPE y PHEA-DODASuc en la sangre con respecto al tiempo (Ejemplo 24).

- La Figura 5 es una representación gráfica del punto de inflamación de una pata con respecto al tiempo antes y 55 después de un única inyección intravenosa de una solución salina y liposomas que contienen fosfato de prednisolona (recubiertos de PEG-DSPE y PHEA-DODASuc respectivamente) (Ejemplo 24).

- La Figura 6 es una representación gráfica de la dosis inyectada de un porcentaje de liposomas encontrados en el hígado, bazo e hígado-bazo después de la administración intravenosa de liposomas, que contienen como conjugados de lípidos-polímeros respectivamente PEG-DSPE, PHEG-diamino-butano DODASuc, PHPG diamino-butano DODASuc, PHBG diamino-butano DODASuc y PHEA-DODASuc, y los liposomas convencionales (BARE) (Ejemplo 21).

Descripción detallada de la invención

60 Los conjugados anfifílicos de lípidos-polímeros en las composiciones de la presente invención pueden obtenerse a partir de un lípido y un polímero anfifílico o un precursor monomérico para los mismos.

65 Los lípidos anfifílicos que han de ser utilizados en el conjugado de lípidos-polímeros de acuerdo con la invención pueden seleccionarse a partir de una variedad de lípidos naturales o sintéticos, compuestos de al menos una cola apolar hidrofóbica y un grupo de cabeza polar hidrofílico, tales como los lípidos formadores de vesículas y los lípidos de membrana.

ES 2 282 439 T3

Una característica importante del lípido anfíflico que ha de utilizarse en el conjugado de lípidos-polímeros es que el lípido contiene un grupo funcional en su grupo de cabeza polar, adecuado para la unión covalente a una cadena polimérica. El grupo de cabeza polar es por ejemplo un grupo amina primaria o secundaria, un grupo hidroxilo, un grupo aldehído, un grupo haluro o carboxílico. La parte hidrofóbica del lípido permite la incorporación de los 5 conjugados de lípidos-polímeros en las estructuras bicapas, como los liposomas y actúa como ancla.

Los ejemplos de lípidos anfíflicos son los fosfolípidos, glicolípidos, ceramidas, colesterol y derivados, mono- 10 o di-alquil-aminas C₈-C₅₀, aril-alquil-aminas, cicloalquil-alquil-aminas, alcanoles, aldehídos, carbohaluros o ácidos alcanoicos y los anhídridos de los mismos saturados o parcialmente insaturados, de cadena lineal o ramificada, en los cuales el número total de átomos-C es preferentemente de 25 o más.

De forma más específica, los ejemplos de lípidos anfíflicos adecuados son la fosfatidil-colina, fosfatidil-etanol-amina, fosfatidil-inositol, esfingomielina, estearil-amina, alcohol mirístico, colesterol y ácido palmitico.

15 Un lípido anfíflico preferido en el conjugado de lípidos-polímero es un lípido que tiene dos cadenas hidrofóbicas, típicamente las cadenas de alquilo, y un grupo de cabeza polar, que contiene un grupo funcional, tal como se ha descrito anteriormente. Los derivados de fosfatidil-etanol-amina y en particular la diestearil-fosfatidil-etanol-amina, son los fosfolípidos preferidos ya que contienen un grupo amino reactivo.

20 Los lípidos anfíflicos también preferidos tienen como grupo de cabeza polar hidrofílico una amina primaria o secundaria y dos partes apolares hidrofóbicas de cadena lineal o ramificada C₈-C₅₀ saturadas o insaturadas. Los ejemplos de los mismos son la 1-heptadecil-octadecil-amina y los compuestos que contienen diestearil-amina, como la diestearil-amina y la N-succinil-dioctadecil-amina (DODASuc).

25 La parte polimérica de los conjugados de lípidos-polímeros de la presente invención está formada de un poli-(aminoácido), un derivado de poli-(aminoácido) o un análogo de poli-(aminoácido). Un derivado de poli-(aminoácido) es un polímero que se compone de monómeros aminoácidos, a los cuales están unidos uno o más sustituyentes. Un ejemplo del mismo es la poli-(2-hidroxi-etil)-L-glutamina. Un análogo de poli-(aminoácido) tal como se revela aquí es un polímero, en el cual la longitud de cadena del átomo de carbono de los monómeros aminoácidos es reducida o 30 prolongada. Los ejemplos de los mismos son la poli-(homoserina) y la poli-(pentahomoserina).

El polímero es un homo-polímero que se compone de monómeros que son los mismos a lo largo de toda la cadena polimérica. También es posible que la parte polimérica se componga de copolímeros en bloque seleccionados a partir del grupo compuesto de poli-(aminoácidos), derivado de poli-(aminoácidos) y análogo de poli-(aminoácidos) o que 35 la parte polimérica esté formada de una serie de monómeros alternantes o un orden controlado de monómeros o por polimerización aleatoria de los monómeros adecuados seleccionados a partir del grupo compuesto de uno o más aminoácidos, derivados de aminoácidos y análogos de aminoácidos. Los polímeros pueden ser lineales o ramificados e incluyen los polímeros de injerto, pero son preferentemente lineales.

40 Los aminoácidos útiles son los α -aminoácidos naturales. Sin embargo, son también de interés los β -aminoácidos así como los aminoácidos no-proteicos o no-naturales. Se puede utilizar la configuración tanto L- como D- de los aminoácidos y derivados. Cuando la secuencia de aminoácidos del polímero en el conjugado de lípidos-polímeros está formada de residuos del aminoácido L, el polímero resultante estará sometido a la degradación enzimática. Por otro lado, cuando la secuencia de aminoácidos del polímero en el conjugado de lípidos-polímeros de esta invención está 45 formada por el aminoácido D, es probable que el polímero resultante sea estable hacia las enzimas de degradación de péptidos. Asimismo, se pueden utilizar mezclas de los aminoácidos L y D. Teniendo en cuenta las distintas propiedades de los polímeros, la modificación superficial de las partículas del soporte coloidal, en las cuales están incorporados los conjugados de lípidos-polímeros de la invención, puede ajustarse mediante la utilización selectiva de la forma L y/o D de los materiales de partida para la preparación de los conjugados.

50 Una propiedad importante de los compuestos de poli-(aminoácidos), derivado de poli-(aminoácidos) y análogo de poli-(aminoácidos), que son adecuados para su incorporación dentro de los conjugados de lípidos-polímeros de la presente invención, es que son solubles en agua (al menos 1 parte en 100 partes de agua, preferentemente 1 parte en 30 partes de agua y todavía con más preferencia 1 parte en 10 partes de agua o menos). Los polímeros pueden ser 55 caracterizados también por su χ -parámetro en el agua. Se puede determinar este parámetro de interacción polímero-disolvente por ejemplo mediante la osmometría de membrana. Los polímeros que pueden ser utilizados ventajosamente en los conjugados lípidos-polímeros de acuerdo con esta invención tienen un χ -parámetro de $\leq 0,65$, preferentemente de $\leq 0,5$ en agua.

60 Otra característica importante de los polímeros es que no contienen cantidad sustancial alguna de grupos cargados dentro de un rango de pH (fisiológico) de 4-8. Preferentemente, se utilizan los monómeros de aminoácidos neutros o los monómeros de análogos de aminoácidos en la preparación de los polímeros o monómeros de derivados de aminoácidos, que son neutros o han sido neutralizados. Tal como apareció, se puede dejar que los grupos cargados estén presentes en un porcentaje bajo sin perturbar las propiedades de larga circulación de las composiciones de soporte 65 coloidal de acuerdo con la presente invención. Tal como se ha demostrado para los copolímeros de 2-hidroxi-etil-L-glutamina y los monómeros cargados, se puede dejar que los grupos cargados positivamente estén presentes en un porcentaje más amplio que los grupos cargados negativamente.

ES 2 282 439 T3

Entre los monómeros adecuados para la preparación del polímero se encuentran entre otros la alanina, treonina, valina, sarcosina, ácido α -amino-adípico, los derivados del ácido α,γ -diamino-butírico, ornitina, glutamina y sus derivados, incluidos el ácido glutámico, la asparagina y sus derivados, incluidos el ácido aspártico, los derivados de lisina, la metionina y sus derivados, serina, sus derivados y análogos con los grupos CH_2 adicionales, como la homoserina y pentahomoserina. Los grupos laterales adecuados incluyen el alquilo ($\text{C}_1\text{-}\text{C}_4$), hidroxi-alquilo, dihidroxi-alquilo, amidas ácidas y grupos arilo o las combinaciones de los mismos, siempre que el polímero permanezca soluble en agua. Los ejemplos de estos grupos son el 2-hidroxi-etilo, 3-hidroxi-propilo, 4-hidroxi-butilo y 2,3-dihidroxi-propilo. Los polímeros que se pueden utilizar son por ejemplo la poli-(D,L-serina) (PDLS), poli-(2-hidroxi-etil)-D,L-glutamina (PDLHEG), poli-(2-hidroxi-butil)-L-glutamina (PHBG) y el copolímero de poli-(HEG-co-ácido glutámico) 1% ácido glutámico (PHEG 1% GA). Los polímeros preferidos son la poli-(D,L-glutamina) (PDLG), poli-(D,L-asparagina) (PDLA), poli-(hidroxi-propil)-L-glutamina (PHPG), poli-(2-hidroxi-propil)-L-glutamina (P2HPG) y los copolímeros de beta-alanina y 2-hidroxi-etil-L-glutamina (PbAHEG), poli-(HEG-co-dimetil-amino-etil-glutamina) que contienen un 5 y un 1% de grupos laterales de dimetil-amino-etilo (PHEG 5% DG y PHEG 1% DG). Los polímeros más preferidos son los homopolímeros poli-[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamina] (PHEG), poli-(2-hidroxi-etil)-L-asparagina (PHEA) y poli-(D,L-metionín-sulfóxido) (PDLMS).

La cadena polimérica contiene entre 5 y 500 subunidades monoméricas, preferentemente entre 20 y 100. El peso molecular medio del polímero oscila entre 500 y 75.000, preferentemente entre 2.000 y 15.000. El peso molecular medio puede evaluarse de distintas formas según se conoce en el arte. En los ejemplos de la presente solicitud se ha realizado una estimación del peso molecular sobre la base de los datos de NMR.

Para la preparación de los conjugados de lípidos-polímeros incorporados en las composiciones de la presente invención se han utilizado preferentemente unos métodos de fabricación, en los cuales los grupos reactivos en las cadenas laterales de los monómeros de aminoácidos estaban protegidos antes de la polimerización y acoplamiento del lípido.

Los conjugados de lípidos-polímeros pueden ser preparados conforme los métodos conocidos en el arte. Un método bien conocido para preparar los polímeros de aminoácidos implica la polimerización por apertura de anillo del aminoácido correspondiente N-carboxi-anhídrido (NCA)s, opcionalmente provisto de uno o más grupos protectores, iniciado por los nucleófilos como las aminas primarias de alquilo ($\text{C}_1\text{-}\text{C}_4$). Otro método para obtener los conjugados de lípidos-polímeros comprende la utilización de una amina con un grupo funcional protegido, por ejemplo N-Boc-1,4-diamino-butano, como iniciador en la polimerización por apertura de anillo de NCA. Aunque se requieran en este proceso dos etapas suplementarias, a saber la desprotección del grupo funcional y posteriormente el acoplamiento a un lípido con un grupo reactivo, los conjugados de lípidos-polímeros preparados por este método son también adecuados para su incorporación en las composiciones de soporte coloidal de esta invención.

Si el lípido anfifílico es un mono- o di-alquilo $\text{C}_8\text{-}\text{C}_{50}$ de cadena lineal o ramificada, hidroxi-alquil-amina o hidroxi-alquilén-amina, un alanol o una ceramida, esto puede ser utilizado ventajosamente como iniciador en el proceso de polimerización por apertura de anillo. Esto significa que durante la polimerización el lípido anfifílico se acopla al polímero en una etapa. El peso molecular de los poli-aminoácidos depende mucho del disolvente o de la combinación de disolventes, de la pureza de los productos químicos utilizados y del coeficiente de monómero/iniciador de polimerización. Hablando en términos generales, cuanto más alto es el coeficiente de monómero/iniciador de polimerización, más alto es el peso molecular del polímero.

Cuando se tenga que preparar un polímero de composición predefinida, se utilizará preferentemente el método de síntesis de péptidos en fase sólida.

Los grupos protectores presentes en las unidades de repetición del polímero pueden ser eliminados por aminolisis mediante un amino-alcohol como el 2-amino-etanol, 3-amino-propanol o 2,3-dihidroxi-propil-amina.

Los conjugados de lípidos-polímeros de la presente invención pueden ser incorporados ventajosamente en las composiciones de soporte coloidal de la invención, tal como los sistemas vesiculares bicapas, como los liposomas, niosomas y vesículas inversas, sistemas micelares, nanocápsulas, nanosferas, etc. Los sistemas de soporte coloidal preferidos son los sistemas vesiculares bicapas.

A la preparación de los liposomas, el conjugado de lípidos-polímeros de acuerdo con la invención, se mezcla con los componentes normalmente utilizados en la preparación de los liposomas, tales como los lípidos formadores de vesículas, estabilizadores, etc. El conjugado está incluido a una concentración molar suficiente para ampliar el tiempo de circulación en la sangre de los liposomas varias veces por encima del de los liposomas correspondientes que carecen de conjugado de lípidos-polímeros. El conjugado polimérico está incluido típicamente al 1-15 por ciento molar, preferentemente al 3-10 por ciento molar y todavía con más preferencia al 5-7,5 por ciento molar.

El tamaño medio de los liposomas, que debe ser determinado por las técnicas de Difusión de Luz Dinámica (DLS), se encuentra por debajo de 200 nm, preferentemente por debajo de 150 nm y todavía con más preferencia por debajo de 100 nm. El límite inferior para este tipo de partículas de soporte coloidal es de 20 nm.

Los conjugados de lípidos-polímeros, cuando están incorporados en liposomas cargados, muestran la capacidad de reducir el potencial zeta, demostrando así que el injerto de polímero protege la carga superficial.

ES 2 282 439 T3

Se pueden administrar las composiciones de distintas maneras, pero se prefiere la administración parenteral. Según el ingrediente activo y la indicación médica o el trastorno que se deba tratar, la administración puede ser realizada por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, etc.

5 Despues de la administración intravenosa en ratas de las preparaciones liposomales de acuerdo con la presente invención, se ha mostrado que el tiempo de circulación en sangre de los liposomas puede variar según el objetivo deseado. El tiempo de circulación en sangre depende del conjugado de lípidos-polímeros utilizado, en particular de la elección de la combinación de lípidos/polímeros, del peso molecular del polímero y de la densidad de injertos.
10 Se han observado resultados similares a los obtenidos con los correspondientes liposomas injertados con PEG, por ejemplo para los conjugados de lípidos-PHEG, conjugados de lípidos-PHEA y conjugados de lípidos-PDLMS, en los cuales el lípido anfifílico contiene una doble cola hidrofóbica (PHEG-diamino-butano DODASuc, PHEA-DODASuc y PDLMS-DODASuc).

15 La estabilidad de las preparaciones liposomales, preparadas con los conjugados lípidos-polímeros de acuerdo con la presente invención, se mejora generalmente en comparación con la de las preparaciones liposomales convencionales. Además de esto, la estabilidad de las preparaciones liposomales puede mejorar además mediante la selección adecuada del conjugado lípido-polímero. Se valorará que esta selección dependa también de la elección del agente activo. Por ejemplo, la encapsulación de un derivado soluble en agua de un corticosteroide en lugar del corticosteroide en sí en una preparación liposomal resultará en una estabilidad aumentada de la preparación liposomal. La encapsulación del fosfato de prednisolona en un liposoma que contenía el conjugado de polihidroxietil-asparagina-DODASuc produjo un resultado ligeramente superior que la incorporación en un liposoma que contenía el conjugado de poli-(2-hidroxietil)-L-glutamín-diamin-butano-DODASuc. Otra mejora de la estabilidad puede ser alcanzada mediante la eliminación del vehículo acuoso de la composición liposomal por medio de los métodos bien conocidos en el arte, tales como secado por aspersión, liofilización, evaporación rotacional, etc.

25 Los conjugados de lípidos-polímeros, incorporados dentro de las composiciones de soporte coloidal de acuerdo con la presente invención, proporcionan propiedades de larga circulación a estas composiciones. Por propiedades de larga circulación se tiene que entender un aumento en el tiempo de circulación en la sangre de la composición de soporte coloidal, en comparación con la composición, que no contiene el conjugado de lípidos-polímeros. Las propiedades de larga circulación pueden ser determinadas de acuerdo con los métodos conocidos en el arte (Torchilin VP, Shtilman MI, Trubetskoy VS, Whiterman K, Milstein AM.: Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994) 1195: 181-184; Torchilin VP, Trubetskoy VS, Whiterman KR, Caliceti P, Ferruti P, Verones FM.: New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes *in vivo*. *Journal of pharmaceutical sciences* (1995) 84 (9): 1049-1053). Para los liposomas, se ha proporcionado un método en los ejemplos. Por lo tanto, se pueden utilizar estas composiciones y especialmente las vesiculares, para una variedad de aplicaciones. Excepto como depósito de medicamento circulante, pueden utilizarse como objetivo pasivo hacia los sitios de patología (tumores, infección, inflamación) y como objetivo activo hacia las células en el flujo sanguíneo, hacia el endotelio (por ejemplo hacia los receptores asociados a la angiogénesis), por ejemplo mediante el acoplamiento a los dispositivos de guiado, como los anticuerpos monoclonales. Otras aplicaciones pueden ser un sistema de suministro de oxígeno artificial, formación de imágenes de la colección de sangre y un recubrimiento antivegetativo para biomateriales, como los catéteres y prótesis de vasos sanguíneos.

45 Además, los conjugados de lípidos-polímeros son biodegradables y por lo tanto proporcionan numerosas ventajas, en particular debido al hecho de que no existe riesgo alguno de acumulación en las células del cuerpo humano o animal.

Además, los conjugados de lípidos-polímeros han mostrado que existe una dependencia reducida a la dosis de lípidos en comparación con los liposomas con PEG.

50 Otra ventaja adicional, pero muy importante, puede ser que no se observa siempre una eliminación incrementada después de la segunda inyección de las composiciones de acuerdo con la invención y que la reducción del tiempo de circulación en la sangre es moderada. Esto significaría una ventaja significativa en comparación con las composiciones de soporte coloidal, recubiertas de PEG.

55 Las composiciones de soporte coloidal de acuerdo con la presente invención proporcionan una variedad de posibilidades para su utilización en terapia, diagnóstico, profilaxis, etc. Debido a la versatilidad de los conjugados de lípidos-polímeros, cuyos componentes pueden seleccionarse según el objetivo, y a la variedad de sistemas de soporte coloidal a partir de los cuales uno puede elegir, se evidenciará inmediatamente que en general será posible que cada agente activo diseñe una composición adecuada de soporte coloidal. Si en primer lugar, después de la administración intravenosa de las composiciones de acuerdo con la invención se observara ningún efecto o solamente un ligero efecto sobre el tiempo de circulación en la sangre, una persona especialista en el arte puede variar muchos parámetros diferentes en el conjugado de lípido-polímero (por ejemplo, el peso molecular, densidad de injerto, polímero, lípido, etc.) y en la composición del soporte coloidal para incrementar el tiempo de circulación según el estándar establecido. Se ve un efecto muy interesante cuando las composiciones de acuerdo con la invención contienen un corticosteroide soluble en agua como agente activo. En un modelo experimental de artritis *in vivo*, se manifestó que una sola inyección intravenosa de esta composición era tan eficaz como las inyecciones repetidas del compuesto corticosteroide no-encapsulado o cuando estaba encapsulado en liposomas convencionales. Los corticosteroides solubles en agua interesantes son el fosfato de budesonida y los derivados solubles en agua de la flunisolida y propionato de fluticasona. Los

ES 2 282 439 T3

efectos favorables pueden ser una remisión completa y duradera de los síntomas asociados a la artritis, mientras que se reducirán los efectos secundarios asociados a la terapia basada en corticosteroides, debido a una reducción en la cantidad de corticosteroides que debe ser administrada y debido a que los corticosteroides, que muestran normalmente una eliminación rápida de la sangre, ahora pueden ser utilizados. También en otras enfermedades, en las cuales los corticosteroides son los medicamentos de elección o son utilizados como co-terapia, se reconocerán inmediatamente los efectos beneficiosos de las composiciones de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, otros agentes activos muestran también unos efectos interesantes en las composiciones de la invención. Los siguientes ejemplos ilustran también la invención.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Poli-(γ -bencil-L-glutamato) con un grupo terminal heptadecil-octadecil-amina (PBLG-heptadecil-octadecil-amina)

15 Se disolvió 0,94 g (3,6 mmol) de N-carboxi-anhídrido (NCA) de γ -bencil-L-glutamato en 5 ml de DMF seco en un medio de nitrógeno. Se añadió en una vez una solución de 25 mg (0,05 mmol) de 1-heptadecil-octadecil-amina (Sigma Aldrich) en 1 ml de cloroformo seco. Casi inmediatamente se formaron burbujas de gas (CO_2). Se agitó la solución durante 1 día a temperatura ambiente y luego se precipitó en un exceso de 10-20 veces de agua. Se recogió el precipitado blanco y se secó al vacío. Producción: 0,75 g.

20 Caracterización:

25 $^1\text{H-NMR}$ en CDCl_3 (δ en ppm con respecto al máximo de disolvente):

Bencil-glutamato: 7,2 (C_6H_5), 5,0 (CH_2 bencílico), 3,9 ($\alpha\text{-CH}$), 2,8 & 2,2 (β & $\gamma\text{ CH}_2$),

Cadena de alquilo: 1,2 (cadena de alquilo CH_2), 0,85 (CH_3)

30 Ejemplo 2

Poli-[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamina] con un grupo terminal heptadecil-octadecil-amina (PHEG-heptadecil-octadecil-amina)

35 A una solución de 0,60 g de PBLG-heptadecil-octadecil-amina (véase arriba) en 5 ml de DMF seco se añadió 0,15 g de 2-hidroxi-piridina y 0,8 ml de etanol-amina. Se agitó esta solución durante 3 días a temperatura ambiente en un medio de nitrógeno. Se precipitó la solución en un exceso de 10-20 veces de dietil-éter. Se recogió el producto y se secó al vacío. El producto polimérico soluble en agua fue dializado contra agua en tubos de diáisisis de éster de celulosa (MWCO 500) durante 2 días. Se obtuvo después de liofilización, PHEG purificado con el grupo terminal heptadecil-octadecilo. Producción: 0,30 g.

40 Caracterización:

45 $^1\text{H-NMR}$ en DMSO-d_6 (δ en ppm con respecto al máximo de disolvente):

Hidroxi-etil-glutamina: 4,1 ($\alpha\text{-CH}$), 2,2 & 1,8-1,9 (β & $\gamma\text{ CH}_2$), 3,4 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 3,1 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$),

Cadena de alquilo: 1,2 (cadena de alquilo CH_2), 0,8 (CH_3)

50 A partir del coeficiente de los números enteros de las señales estearilo y la señal $\alpha\text{-CH}$, se estimó que el peso molecular de PHEG era de 12.000.

Ejemplo 3

55 *Poli-[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamina] con un grupo terminal de diestearil-amina introducido a través de N-Boc-1,4-diamino-butano como iniciador (PHEG-diamino-butano-DODASuc)*

Se disolvieron 2,5 g (9,5 mmol) de N-carboxi-anhídrido de γ -bencil-L-glutamato en una mezcla de 2,5 ml de acetato de etilo seco y 12,5 ml de diclorometano seco, y se añadió 0,95 ml (0,95 mmol) de una solución de 1 mol de N-Boc-1,4-diamino-butano en diclorometano como iniciador. Se agitó la mezcla durante 3 días en nitrógeno a temperatura ambiente y luego se precipitó en metanol. Producción: 1,48 g de PBLG-N-Boc-diamino-butano.

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) mostró señales N-Boc-1,4-diamino-butano en δ 1,4-1,3.

65 Maldi TOF ms:

Masa de la unidad de repetición de ácido bencil-glutámico: n x 219.

ES 2 282 439 T3

m/z 1417 (n=5), 1636 (n=6), 1855 (n=7), 2074 (n=8), correspondiente a las masas del aducto de sodio con un grupo N-Boc-1,4-diamino-butano (187 Da) y un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

5 *m/z* 1433 (n=5), 1652 (n=6), 1872 (n=7), correspondiente a las masas del aducto de potasio con un grupo N-Boc-1,4-diamino-butano (187 Da) y un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

Desprotección de PBLG-N-Boc-diamino-butano

10 Se agitaron durante 3,5 horas 738 mg de PBLG-N-Boc-diamino-butano en 5 ml de una solución de 4N HCl en dioxano. Posteriormente, se evaporó la mezcla de reacción en un rotavapor. Se disolvió el residuo en 5 ml de tetrahidrofurano y se añadió gota a gota a 80 ml de una solución de NaHCO₃ (6,5 g en agua). Se quitó por filtración el producto, se lavó con agua y se secó al vacío. Producción: 677 mg de PBLG-diamino-butano.

15 ¹H-NMR (CDCl₃) mostró que el grupo protector se había eliminado con éxito.

El análisis de masas Maldi TOF mostró las masas molares deseadas.

Masa de la unidad de repetición de ácido bencil-glutámico: n x 219.

20 *m/z* 1318 (n=5), 1537 (n=6), 1756 (n=7), 1976 (n=8), correspondiente a las masas del aducto de sodio con un grupo 1,4-diamino-butano (87 Da) y un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

Acoplamiento a DODASuc

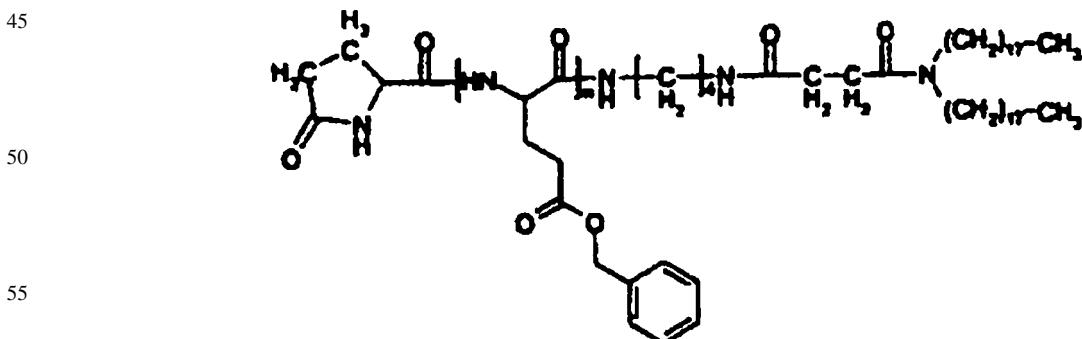
25 Se disolvieron en 2 ml de diclorometano, 6,2 mg (0,1 mmol) de N-succinil-dioctadecil-amina (DODASuc, Schmitt *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 19, 8485-8491), 13,7 mg (0,12 mmol) de N-hidroxi-succinimida y 0,66 mg de dimetil-amino-piridina (DMAP). Después de su enfriamiento a 0°C, se añadieron 24,6 mg (0,12 mmol) de N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC). Se agitó la solución durante 1 hora a 0°C y durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego se quitó por filtración la diciclohexil-urea insoluble, y se añadió el filtrado a una solución de 200 mg de PBLG-diamino-butano en 3 ml de diclorometano y 14 µl de trietil-amina. Despues de su agitación durante toda la noche a temperatura ambiente se añadió la solución gota a gota al metanol, se filtró y se secó. Producción: 135 mg.

30 El espectro ¹H-NMR (CDCl₃) mostró que había diestearilo, señales de CH₂ en δ 1,4-1,2 y señales de CH₃ en δ 0,9-0,8.

35 El análisis de masas Maldi TOF mostró que las masas molares deseadas indicaban que DODASuc estaba acoplado a PBLG-diamino-butano.

40 *m/z* 1922 (n=5), 2141 (n=6), 2360 (n=7), 2580 (n=8), 2799 (n=9), 3018 (n=10), correspondiente a las masas del aducto de sodio de PBLG-diamino-butano-DODASuc, con un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

Estructura



Aminolisis

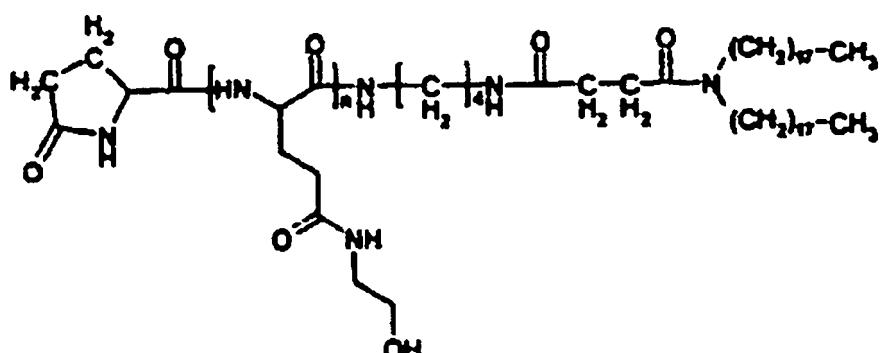
60 120 mg de PBLG-diamino-butano-DODASuc y 10,8 mg de 2-HP se disolvieron en 1,3 ml de dimetil-formamida y se añadió 0,68 ml de 2-amino-etanol. Después de su agitación durante 24 horas a 40°C en nitrógeno, se añadió gota a gota la solución al cloroformo. Se quitó por filtración el producto y se secó al vacío. Producción: 83 mg de PHEG-diamino-butano-DODASuc.

65 ¹H-NMR (CDCl₃) mostró señales de diestearilo en δ 1,2-1,4 (CH₂) y δ 0,8-0,9 (CH₃)

A partir del coeficiente de los números enteros de las señales de estearilo y la señal de α -CH, se estimó que el peso molecular de PHEG era de 4.000.

Estructura

5

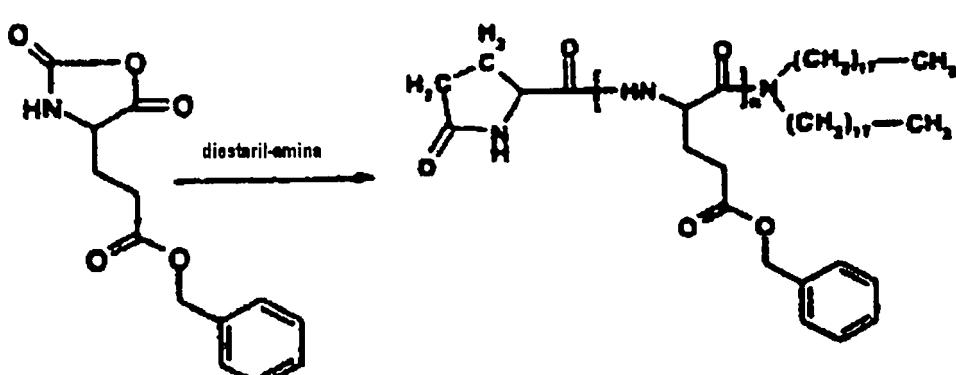


20 Ejemplo 4

Poli-[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamina] con un grupo terminal amina introducido por la diestearil-amina como iniciador (PHEG-diestearil-amina)

25 Se disolvió 1,0 g (3,8 mmol) de N-carboxi-anhídrido de γ -bencil-L-glutamato en una mezcla de 1 ml de acetato de etilo seco y 5 ml de cloroformo seco. Posteriormente, se añadieron 2 ml (0,19 mmol) de una solución de 163 mg de diestearil-amina en 3,26 ml de cloroformo. El matraz estaba provisto de un tubo de CaCl_2 y se agitó la mezcla en nitrógeno durante 4 días a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota la mezcla a metanol, se aisló por filtración el polímero y se secó al vacío. Producción: 757 mg de PBLG-diestearil-amina.

30



El análisis $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) mostró señales de diestearilo en el producto: señal de CH_3 en δ 0,9 (t) y señal de CH_2 en δ 1,3-1,2.

50 Maldi TOF ms:

Masa de la unidad de repetición de ácido bencil-glutámico: n x 219.

55 *m/z* 1971 (*n*=6), 2190 (*n*=7), 2410 (*n*=8), 2629 (*n*=9), 2848 (*n*=10) correspondiente a las masas del aducto de sodio con un grupo diestearil-amina (521 Da) y un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

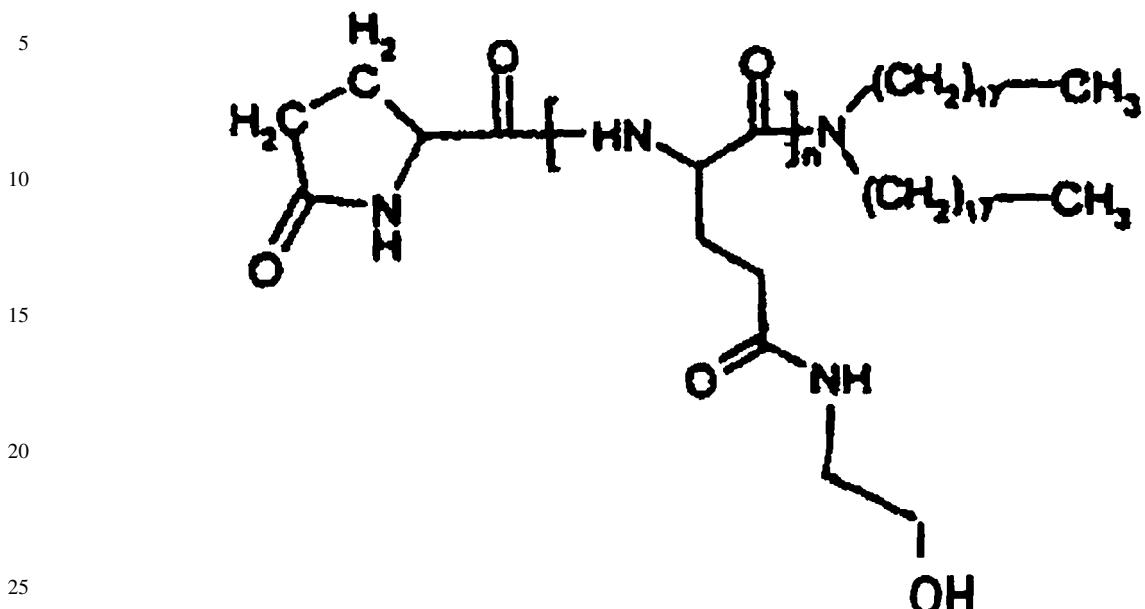
m/z 2206 (n=7), 2427 (n=8), correspondiente a las masas del aducto de potasio con un grupo diestearil-amina (521 Da) y un grupo terminal péptido cíclico (112 Da).

60 *Aminolysis*

La aminolisis de la PBLG-diestearil-amina (600 mg) preparada más arriba con amino-etanol y 2-hidroxi-piridina como catalizador en dimetil-formamida produjo 430 mg de PHEG-diestearil-amina.

¹H-NMR (DMSO-d₆) mostró señales de diestearil-amina:

Estructura



Ejemplo 5

³⁰ Poli-[N-(hidroxi-alquil)-L-glutamina] con un grupo terminal diamino-butano-DODASuc.

PBLG-diamino-butano BOC

A una solución de 3 g de N-carboxi-anhídrido (NCA) de bencil-L- γ -glutamato en 8 ml de DMF seco se añadió una solución de 0,1 g de N-BOC-1,4-diamino-butano en 1 ml de cloroformo. Se observó la formación de gas (dióxido de carbono) durante las primeras horas. Se agitó la solución durante 1 día en un medio de nitrógeno a temperatura ambiente. Después de la precipitación en 100 ml ca. de metanol, se quitó por filtración el polímero y se secó, produciendo 2 g de PBLG que contenía un grupo amino BOC-protectorado

¹H-NMR (CDCl_3) (δ relativo al máximo de disolvente):

BOC: 1,4 (CH₃)

PBLG: 2,2 & 2,6 (β,γ -CH₂), 4,0 (α -CH), 5,0 (bencilo CH₂), 7,3 (fenilo)

PBLC-diamino-butano (eliminación grupo protector BOC)

Una solución de 1,1 g de PBLG-diamino-butanoBOC en 5 ml de 4N HCl/dioxano fue agitada durante 3-4 horas y luego fue añadida gota a gota a una solución de 80 ml ca. de NaHCO₃ (6,5 g en agua). Se quitó por filtración el producto, se lavó con agua y se secó al vacío. Producción: 1 g de PBLG-diamino-butano.

¹H-NMR (CDCl_3) (δ relativo al máximo de disolvente):

PBLG: 2,2 & 2,6 (β,γ -CH₂), 4,0 (α -CH), 5,0 (bencilo CH₂), 7,3 (fenilo)

Señales de ROC ausentes.

PBLG-diamino-butano DOPASuc (acoplamiento de DCC)

60 Se disolvieron en 4 ml de diclorometano 170 mg de N-succinil-dioctadecil-amina (DODASuc), 90 mg de DCC
y 10 mg de 4-(dimetil-amino)-piridín-4-tolueno-sulfonato (DPTS). Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura
ambiente. Se añadió una solución de 0,73 g de PBLG-diamino-butano y 40 μ l de trietil-amina en 3 ml de cloroformo.
65 Después de su agitación durante toda la noche a temperatura ambiente la solución (que contenía el precipitado de
diciclohexil-urea) fue añadida gota a gota a un exceso de metanol (100 ml ca.). Se quitó por filtración el producto
polimérico y se secó. Producción 0.5 g.

ES 2 282 439 T3

¹H-NMR (CDCl₃) (δ relativo al máximo de disolvente):

Señales de diestearilo en 0,8-0,9 (CH₃) y 1,2-1,4 (protores de metileno)

5 PBLG: 2,2 & 2,6 (β,γ -CH₂), 4,0 (α -CH), 5,0 (bencilo CH₂), 7,3 (fenilo)

5.1. PHEG-diamino-butano DODASuc

El PHEG-diamino-butano DODASuc se obtuvo por aminolisis de PBLG-diamino-butano DODASuc con etanol-10 amina como sigue:

Se disolvieron en 4 ml de DMF 0,5 g de PBLG-diamino-butano DODASuc y 15 mg de 2-hidroxi-piridina. Luego se añadieron 2 ml de etanol-amina. Después de su agitación durante 24 horas a 40°C en un medio de nitrógeno, la solución se precipitó en 100 ml ca. de dietil-éter. El PHEG-diamino-butano DODASuc se disolvió en agua, se dializó 15 (MWCO 500) y posteriormente se liofilizó produciendo 0,35 g de conjugado purificado de PHEG-diamino-butano DODASuc.

¹H-NMR (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

20 Señales de diestearilo en 0,8-0,85 (CH₃) y 1,2-1,5 (protores de metileno)

PHEG: 1,7 & 2,2 (β,γ -CH₂), 3,1 & 3,3 (hidroxi-etilo), 4,2 (α -CH), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

A partir del coeficiente de los números enteros de las señales de diestearilo y la señal de α -CH, se calculó que el 25 peso molecular de PHEG era de 4000 ca.

Maldi-TOF confirma la estructura molecular del conjugado de PHEG-diamino-butano DODASuc.

Na⁺-aducto: m/z 3064,5 (n=13), 3236,1 (n=14), 3408,7 (n=15), 3580,6 (n=16), 3752,9 (n=17), 3924,7 (n=18), 30 4096,7 (n=19) 4268,4 (n=20), 4441,1 (n=21), 4613,3 (n=22), 4785,1 (n=23), etc.

5.2. Poli-[(2-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc

El poli-[(2-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc fue obtenido por aminolisis de PBLG-diamino-butano DODASuc con 2-propanol-amina (isopropanol-amina) como sigue:

Se disolvieron en 4 ml de DMF 0,15 g de PBLG-diamino-butano DODASuc y 0,05 g de 2-hidroxi-piridina. Luego se añadió 1 ml de 2-propanol-amina. Después de su agitación durante 24 horas a 40°C en un medio de nitrógeno, la solución se precipitó en 100 ml ca. de dietil-éter. Se obtuvo 0,1 g de PHisoPG-diamino-butano DODASuc después del 40 secado. Se disolvió el polímero en agua, se dializó (MWCO 500) y posteriormente se liofilizó produciendo poli-[(2-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc purificado.

¹H-NMR (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

45 Señales de diestearilo en 0,8-0,85 (CH₃) y 1,2-1,5 (protores de metileno)

PHPG: 1,7 & 2,2 (β,γ -CH₂), 1,0 (CH₃) & 3,0 & 3,3 & 3,7 (hidroxi-propilo), 4,2 (α -CH), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

50 Peso molecular calculado: 4000 ca.

5.3. Poli-[(3-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc

Se obtuvo poli-[(3-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc mediante aminolisis de PBLG-diamino-butano DODASuc con 3-propanol-amina:

55 Se disolvieron en 4 ml de DMF 0,3 g de PBLG-diamino-butano DODASuc y 0,1 g de 2-hidroxi-piridina. Luego se añadieron 2 ml de 3-propanol-amina. Después de su agitación durante 24 horas a 40°C en un medio de nitrógeno, la solución se precipitó en 100 ml ca. de dietil-éter. Se obtuvo 0,25 g de PHPG5000-diamino-butano DODASuc después del secado. Se disolvió el polímero en agua, se dializó (MWCO 500) y posteriormente se liofilizó produciendo poli-[(3-hidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc purificado.

¹H-NMR (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

65 Señales de diestearilo en 0,8-0,85 (CH₃) y 1,2-1,5 (protores de metileno)

PHPG: 1,7-2,2 (β,γ -CH₂), 1,5 & 3,1 & 3,3 (hidroxi-propilo), 4,2 (α -CH), 4,6 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

Peso molecular calculado: 5000 ca.

ES 2 282 439 T3

Maldi-TOF:

Na^+ -aducto: m/z 3623 (n=15), 3810 (n=16), 3996 (n=17), 4182 (n=18), 4368 (n=19), 4555 (n=20), etc.

5 *5.4. Poli-[(4-hidroxi-butil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc*

Se obtuvo poli-[(4-hidroxi-butil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc mediante aminolisis de PBLG-diamino-butano DODASuc con 4-butanol-amina:

10 Se disolvieron en 4 ml de DMF 0,3 g de PBLG-diamino-butano DODASuc y 0,1 g de 2-hidroxi-piridina. Luego se añadieron 2 ml de 4-butanol-amina. Tras su agitación durante 48 horas a 40°C en un medio de nitrógeno, la solución se precipitó en 100 ml ca. de dietil-éter. Se disolvió el polímero en agua, se dializó (MWCO 500) y posteriormente se liofilizó produciendo 0,2 g de poli-[(4-hidroxi-butil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc purificado.

15 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

Señales de diestearilo en 0,8-0,85 (CH_3) y 1,2-1,5 (protores de metileno)

PHBG: 1,7-2,2 ($\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 1,4 & 3,1 & 3,3 (hidroxi-butilo), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,5 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

20 Peso molecular: 4000 ca.

5.5. *Poli-[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc*

25 Se obtuvo poli-[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc mediante aminolisis de PBLG-diamino-butano DODASuc con 2,3-dihidroxi-propil-amina:

30 Se disolvieron en 3 ml de DMF 0,15 g de PBLG-diamino-butano DODASuc y 0,06 g de 2-hidroxi-piridina. Luego se añadió 1 ml de 2,3-dihidroxi-propil-amina. Después de su agitación durante 1 día a 40°C en un medio de nitrógeno, la solución se precipitó en 100 ml ca. de dietil-éter. Se disolvió el polímero en agua, se dializó (MWCO 500) y posteriormente se liofilizó produciendo 0,1 g de poli-[(2,3-dihidroxi-propil)-L-glutamín]-diamino-butano DODASuc purificado.

35 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

Señales de diestearilo en 0,8-0,85 (CH_3) y 1,2-1,5 (protores de metileno)

Polí-(dihidroxi-propil)-G: 1,7-2,2 ($\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 3,1 & 3,3-3,6 (dihidroxi-propilo), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,6 & 4,8 (OH), 7,8 & 8,2 (NH).

40 Peso molecular: 4000 ca.

Ejemplo 6

45 *Colesterol-PHEG*

A una solución de 0,2 g de PBLG-NH₂ y 20 μl de trietil-amina en 2 ml de cloroformo se añadió una solución de 0,07 g de cloroformiato de colesterol en 1 ml de cloroformo. Se agitó la solución durante una hora ca. a temperatura ambiente y luego se precipitó en dietil-éter. Despues de la recogida y secado, se obtuvo 0,13 g de producto polimérico.

50 La aminolisis con etanol-amina (2-hidroxi-piridina como catalizador) durante 1 día a 40°C produjo colesterol-PHEG. El producto polimérico fue purificado por diálsis (MWCO 500).

55 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

PHEG: 1,7-2,2 ($\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 3,1 & 3,3 (hidroxi-etilo), 4,2 ($\alpha\text{-CH}$), 4,7 (OH), 7,8 & 8,2 (NH) colesterol: 0,6-1,6.

Peso molecular: 4000 ca.

60 Maldi-TOF confirma la estructura molecular del conjugado de colesterol-PHEG.

Na^+ -aducto: m/z 3046 (n=14), 3218 (n=15), 3390 (n=16), 3562 (n=17), 3735 (n=18), 3907 (n=19), 4080 (n=20), etc.

65

ES 2 282 439 T3

Ejemplo 7

Poli-(2-hidroxi-etil)-DL-glutamín-diamino-butano DODASuc

5 La síntesis es análoga a la de poli-(2-hidroxi-etil)-L-glutamín-diamino-butano DODASuc (ejemplo 8), sin embargo difiere en algunos detalles:

Se sintetizó γ -bencil-DL-glutamina NCA a partir de una mezcla al 1:1 de γ -bencil-L- y γ -bencil-D-glutamato y se cristalizó a partir de acetato de etilo/hexano (1:5 ca.) (véase el Ejemplo 1).

10 Se precipitó el poli-(bencil-DL-glutamín)-diamino-butano BOC en agua en lugar de metanol.

Se precipitó el poli-(bencil-DL-glutamín)-diamino-butano DODASuc en metanol.

15 El espectro NMR es virtualmente idéntico al de poli-(2-hidroxi-etil)-L-glutamín-diamino-butano DODASuc (Ejemplo 8.1).

Peso molecular: 3000 ca.

20 Ejemplo 8

Copolímeros de PHEG: poli-(HEG-co-ácido glutámico) diamino-butano DODASuc; 5% de ácido glutámico

25 Una solución de 0,14 g de PBLG diamino-butano DODASuc, 0,05 g de 2-hidroxi-piridina, 1 ml ca. de etanol-amina en 1,5 ml de DMF fue agitada en un medio de nitrógeno durante un día a temperatura ambiente. Entonces se precipitó la solución en dietil-éter. El producto, PBLG diamino-butano DODASuc parcialmente aminolizado por etanol-amina (PHEG con un 5% de grupos laterales bencil-éster), se recogió y secó. El NMR registrado en DMSO reveló la presencia de un 5% de grupos bencilo no sometidos a reacción.

30 Se disolvió dicho polímero en 8,5 ml de 1M de NaOH y se agitó durante 4 horas. Se neutralizó la solución con 1 N de HCl, y luego se dializó (MWCO 500) durante unos días. Se obtuvo el conjugado de copolímero-lípido (0,1 g) cargado negativamente (al pH fisiológico) después de la liofilización de la solución dializada.

35 El NMR en DMSO mostró la conversión total de los grupos bencilo.

Se utilizó Maldi TOF para confirmar la presencia tanto del ácido glutámico como de las unidades de repetición de hidroxi-etil-glutamina.

40 Peso molecular: 3500 ca.

Ejemplo 9

Copolímero de PHEG: poli-(HEG-co-dimetil-amino-etil-glutamín)-diamino-butano DODASuc; 5% de grupos laterales dimetil-amino-etilo

45 Una solución de 0,25 g de PBLG diamino-butano DODASuc, 0,08 g de 2-hidroxi-piridina, y 1 ml de etanol-amina en 2,5 ml de DMF fue agitada en un medio de nitrógeno durante dos días a temperatura ambiente. Se precipitó la solución resultante en dietil-éter. El PBLG diamino-butano DODASuc parcialmente aminolizado por etanol-amina (PHEG con un 5% de grupos laterales bencil-éster), se recogió y secó. El NMR registrado en CDCl₃ reveló la presencia de un 5% de grupos bencilo no sometidos a reacción.

50 Una solución de 0,16 g de este PBLG diamino-butano DODASuc parcialmente aminolizado por etanol-amina, 0,06 g de 2-hidroxi-piridina, 1 ml de N,N-dimetil-etilén-diamina en 2,5 ml de DMF se agitó durante 1 día en un medio de nitrógeno a 40°C. La precipitación en dietil-éter dio un polvo que se recogió y secó al vacío. El NMR en DMSO mostró la conversión total de los grupos bencilo restantes. Se disolvió el producto en agua y se dializó (MWCO 500) durante unos días y posteriormente se liofilizó. Producción: 0,1 g de conjugado de copolímero PHEG-lípido cargado positivamente.

60 Peso molecular: 4000 ca.

ES 2 282 439 T3

Ejemplo 10

Poli-(2-hidroxi-etil)-L-asparagina (PHEA) con respectivamente una estearil-amina y el grupo terminal heptadecil-octadecil-amino

5 *N-carboxi-anhídrido (NCA) de β-bencil-L-aspartato*

Una suspensión de 5 g de β -bencil-L-aspartato en 50 ml de THF destilado que contenía 16 ml ca. de una solución de fosgeno al 20% se calentó a 60-65°C (corriente de gas de nitrógeno sobre la solución). Después de 10 minutos ca. 10 se obtuvo una solución transparente. Después de 1,5 horas ca., se vertió lentamente la solución en 140 ml ca. de n-hexano. Se formaron cristales casi inmediatamente. Después de otra cristalización durante una noche a -20°C, se aisló el producto cristalino de NCA. Otras cristalizaciones a partir de THF/hexano y de cloroformo caliente produjeron 4,3 g de finas agujas. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71).

15 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ relativo al máximo de disolvente):

grupo bencilo: 7,3 (fenilo), 5,1 (CH_2).

20 NCA de aspartato: 2,8 & 3,0 ($\beta\text{-CH}_2$), 4,5 ($\alpha\text{-CH}$), 6,4 (NH).

Estearil-PBLA

A una solución de 0,95 g de β -bencil-L-aspartato NCA en 2 ml de DMF se añadió una solución de 0,04 g de estearil-amino en 0,5 ml de cloroformo. Después de su agitación durante varias horas a 60°C se precipitó la solución 25 opaca en metanol. Después del secado, se obtuvo 0,56 g de poli-(bencil-L-aspartato)-estearil-amino.

Heptadecil-octadecil-PBLA

30 A una solución de 0,5 g de β -bencil-L-aspartato NCA en 2 ml de DMF se añadió 0,1 g de 1-heptadecil-octadecil-amino en 1 ml ca. de cloroformo. Después de su agitación durante 3 días a temperatura ambiente, se precipitó la solución opaca en metanol. Producción: 0,2 g del producto polimérico PBLA-heptadecil-octadecil amino.

Estearil-/heptadecil-octadecil-PHEA

35 La aminolisis de los conjugados PBLA mediante la utilización de etanol-amino y 2-hidroxi-piridina como catalizador a 40°C durante 1 día, seguido de la precipitación en dietil-éter, produce poli-(hidroxi-etil)-L-asparagina (PHEA) soluble en agua, que contiene respectivamente una cola de un estearilo o un heptadecil-octadecilo. Los conjugados de lípidos-polímeros fueron purificados por diálisis (MWCO 500).

40 Estearil-PHEA

Maldi TOF: Aducto de Na^+ m/z 2823 (n=16), 2981 (n=17), 3139 (n=18), 3297 (n=19), 3455 (n=20), 3613 (n=21), etc.

45 A partir de Maldi TOF se concluyó que cada cadena de PHEA contiene un grupo terminal libre amino.

Heptadecil-octadecil-PHEA:

50 NMR (DMSO-d_6) (δ relativo al máximo de disolvente):

heptadecil-octadecil: 0,8 & 1,2.

PHEA: 2,2-2,6 ($\beta\text{-CH}_2$), 3,1 & 3,4 (hidroxi-etilo), 4,5 (OH + $\alpha\text{-CH}$), 7,8 & 8,3 (NH)

55 Pesos moleculares: 6000 ca.

Ejemplo 11

60 *Poli-(2-hidroxi-etil)-L-asparagina DODASuc*

PBLA DODASuc

65 A una solución de 1,7 g de β -bencil-L-aspartato-N-carboxi-anhídrido (NCA) en 5 ml de DMF se añadió 0,2 ml de una 2M solución de metil-amino en THF. Se agitó la solución transparente durante un día y luego se precipitó en una mezcla de metanol (100 ml ca.) y agua (250 ml). Producción de 1,3 g de PBLA, que contiene una amida de metilo y un grupo terminal amino.

ES 2 282 439 T3

Una solución de 0,4 g de PBLA, 30 mg de DCC, 10 mg de DPTS y 100 mg de N-succinil-diestearil-amina en 5 ml de DMSO y 1 ml de cloroformo se agitó durante un día y luego se precipitó en agua. Se agitó/lavó el producto polimérico con dietil-éter y se secó.

5 PHEA DODASuc

La aminolisis de PBLA DODASuc con etanol-amina (con 2-hidroxi-piridina como catalizador) en la solución de DMF a 40°C durante 1 día produjo PHEA DODASuc (0,2 g después de la diátesis y liofilización).

10 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

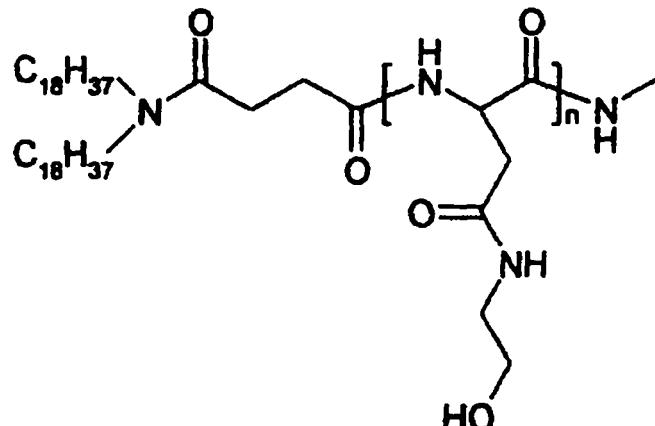
diestearilo: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

PHEA: 2,4-2,8 ($\beta\text{-CH}_2$), 3,2 & 3,4 (hidroxi-etilo), 4,6 ($\alpha\text{-CH + OH}$), 7,8 & 8,5 (NH)

15 Peso molecular calculado: 3000 ca.

Maldi TOF confirma la estructura molecular del conjugado PHEA DODASuc:

20 Na^+ -aducto: m/z 2084 (n=9), 2243 (n=10), 2401 (n=11), 2559 (n=12), 2718 (n=13), 2876 (n=14), etc.



40

Ejemplo 12

Conjugado de poli-(2-hidroxi-etil)-L-asparagina DSPESuc

45 Se obtuvo PHEA amino-terminado después de la aminolisis de PBLA (polibencil-L-aspartato), obtenido a partir de la polimerización iniciada por metil-amina de bencil-L-aspartato NCA. Se convirtió primero el DSPE succinilado (síntesis análoga a la descrita para el DPPE en JACS, 116, 8485 (1994)) en su éster de NHS *in situ* mediante la utilización de DCC (diciclohexil-carbodiimida):

50 Una solución de 70 mg de DSPE succinilado, 20 mg de NHS (N-hidroxi-succinimida), 5 mg de DMAP y 30 mg de DCC (diciclohexil-carbodiimida) en 2 ml de diclorometano se agitó durante 3-4 ca. horas. Se añadió a esta mezcla una solución de 0,13 g de PHEA amino-terminado (peso molecular de 4000 ca.) en 2 ml de DMSO. Después de su agitación durante toda la noche, se precipitó la mezcla en éter. Se recogió el precipitado, se disolvió en agua y se dializó (MWCO 500) durante unos días. Despues de la liofilización, se obtuvieron 80 mg ca. de PHEA-DSPE.

55

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d6) (δ relativo al máximo de disolvente):

DSPE: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

60 PHEA: 2,4-2,8 ($\beta\text{-CH}_2$), 3,2 & 3,4 (hidroxi-etilo), 4,6 ($\alpha\text{-CH + OH}$), 7,8 & 8,5 (NH)

Peso molecular calculado: 4000 ca.

65

ES 2 282 439 T3

Ejemplo 13

Poli-(DL-serina) DODASuc

5 *O-bencil-DL-serina N-carboxi-anhídrido (NCA)*

Una suspensión de 2,5 g de O-bencil-DL-serina en 30 ml de THF destilado (seco) que contenía 10 ml ca. de una solución de fosgeno al 20% en tolueno se calentó a 60-65°C (corriente de gas de nitrógeno sobre la solución). Después de 5 minutos ca. se obtuvo una solución transparente. Después de 1,5 horas ca., se vertió lentamente la solución en 100 ml ca. de n-hexano. El producto se separó como aceite. Se decantó el disolvente y se disolvió el aceite en 25 ml ca. de acetato de etilo al cual se añadieron lentamente 100 ml de hexano. Después de agitar fuertemente el matraz y refrigerarlo a -20°C, O-bencil-DL-serina NCA empezó a cristalizarse. Unas recristalizaciones similares a partir de acetato de etilo/hexano y/o a partir de cloroformo/hexano produjeron 2 g de material cristalino. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71).

15 ¹H-NMR (CDCl₃) (δ relativo al máximo de disolvente):

grupo bencilo: 4,5 (CH₂), 7,2 (fenilo).

20 NCA de serina: 3,7 (β -CH₂), 4,4 (α -CH), 5,8 (NH).

Poli-(O-bencil-DL-serina)

A una solución de 0,9 g de O-bencil-DL-serina NCA en 2,5 ml de DMF se añadió 0,08 ml de una solución de 2 M de metil-amina en THF. Después de su agitación durante varias horas a temperatura ambiente, la solución se volvió opaca y viscosa. Después de 1 día, la solución viscosa, "cristalizada" se mezcló con metanol/agua para precipitar completamente el producto polimérico. Producción: 0,6 g del producto polimérico poli-(O-bencil-DL-serina).

30 ¹H-NMR en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

grupos bencilo: 4,4 (CH₂), 7,2 (fenilo)

poliserina: 3,5 (β -CH₂), 4,7 (α -CH), 8,2 (NH).

35 *Poli-(O-bencil-DL-serina) DODASuc*

Se disolvieron en 4 ml de cloroformo 150 mg de N-succinil-dioctadecil-amina (DODASuc), 80 mg de DCC y 5 mg de DPTS. Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió una solución de 0,6 g de poli-(O-bencil-DL-serina) y 50 μ l ca. de trietil-amina en 5 ml ca. de cloroformo. Después de su agitación durante toda la noche 40 a temperatura ambiente se añadió la solución (que contenía el precipitado de diciclohexil-urea) gota a gota a un exceso de metanol (100 ml ca.). Se quitó por filtración el producto polimérico y se secó. Producción: 0,4 g.

1H-NMR en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

45 diestearilo: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,6 (CH₂-N)

grupos bencilo: 4,4 (CH₂), 7,2 (fenilo)

poliserina: 3,5 (β -CH₂), 4,7 (α -CH), 8,2 (NH).

50 *Poli-(DL-serina) DODASuc*

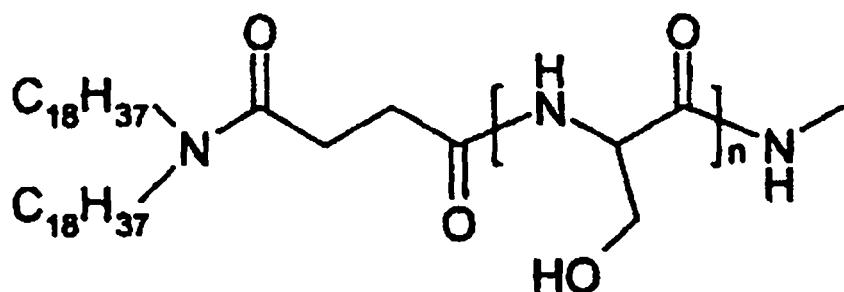
Se disolvió 0,1 g de poli-(O-bencil-DL-serina) DODASuc en 4 ml ca. de una solución de HBr/AcOH al 33% y se agitó durante 1 hora. Entonces se precipitó la solución en agua. Se quitó por filtración el precipitado polimérico, se 55 lavó con agua, se recogió y se disolvió posteriormente (1-2 horas) en 4 ml de 1M de NaOH. Se neutralizó la solución resultante con 1 N de la solución de HCl, y luego se dializó (MWCO 500) durante varios días. La solución dializada fue liofilizada. Producción: 20 mg de poli-(DL-serina) DODASuc.

60 ¹H-NMR en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

diestearilo: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,6 (CH₂-N)

poliserina: 3,6 (β -CH₂), 4,3 (OH), 5,0 (α -CH), 8,0 (NH).

65 A partir del coeficiente de los números enteros de las señales de diestearilo y la señal de α -CH, se calculó que el peso molecular de la poliserina era de 1500 ca.



15 Ejemplo 14

Poli-L-treonina DODASuc

La síntesis es análoga a la síntesis de poli-(D,L-serina) DODASuc y se realizó a través de O-bencil-L-treonina-N-carboxi-anhídrido (NCA), a partir de O-bencil-L-treonina, HCl y fosgeno.

20 Poli-L-treonina DODASuc ($M = 2000$ ca.):

25 $^1\text{H-NMR}$ en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

diestearilo: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,6 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

politreonina: 1,0 (CH_3), 4,0 ($\beta\text{-CH}$), 4,3 ($\alpha\text{-CH}$), 5,0 (OH), 7,8 (NH).

30 Ejemplo 15

Poli-(D,L-metionina sulfóxido) DODASuc

DL-metionina N-carboxi-anhídrido (NCA)

35 Una suspensión de 2,5 g de DL-metionina en 40 ml de THF destilado (seco) que contenía 15 ml ca. de una solución de fosgeno al 20% en tolueno se calentó a 60-65°C (corriente de gas de nitrógeno sobre la solución). Casi inmediatamente, se formó una solución transparente. Después de 1 hora ca., se vertió lentamente la solución en 140 ml ca. de n-hexano. Se cristalizó el DL-metionina NCA a -20°C (lleva varios días). La recristalización a partir de acetato de etilo/hexano produjo 0,7 g ca. de material cristalino. (Biopolymers 1976, 15(9) 1869-71).

40 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (δ relativo al máximo de disolvente):

metionina NCA: 2,0-2,4 ($\beta\text{-CH}_2 + \text{CH}_3$), 4,5 ($\alpha\text{-CH}$), 6,8 (NH).

45 *poli-(DL-metionina)*

A una solución de 0,7 g de DL-metionina NCA en 2,5 ml de DMF se añadió 0,1 ml de una solución de 2 M de metil-amina en THF. Después de 1 día, la solución opaca se precipitó en 100 ml ca. de metanol y posteriormente se secó. Producción: 0,33 g del producto polimérico poli-(DL-metionina).

50 $^1\text{H-NMR}$ en $\text{CDCl}_3/\text{TF-d}$ (δ relativo al máximo de disolvente):

polimetionina: 2,0-2,3 (CH_2 & CH_3), 2,6 (CH_2), 4,7 ($\alpha\text{-CH}$).

55 *poli-(DL-metionina) DODASuc*

Se disolvieron en 2 ml de cloroformo 80 mg de N-succinil-dioctadecil-amina (DODASuc), 45 mg de DCC y 5 mg de DPTS. Se agitó la solución durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió una solución de 0,33 g de poli-(DL-metionina) y 20 μl ca. de trietyl-amina en 2,5 ml ca. de DMSO. Después de su agitación durante toda la noche a temperatura ambiente se añadió la solución (que contenía el precipitado de diciclohexil-urea) gota a gota a un exceso de metanol (100 ml ca.). Se quitó por filtración el producto polimérico y se secó. Producción: 0,22 g.

60 $^1\text{H-NMR}$ en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

diestearilo: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

polimetionina: 1,8 ($\beta\text{-CH}_2$), 2,0 (CH_3), 2,4 ($\gamma\text{-CH}_2$), 4,4 ($\alpha\text{-CH}$), 8,1 (NH).

ES 2 282 439 T3

Poli-(DL-metionina sulfóxido) DODASuc

Mono-oxidación de poli-(DL-metionina) DODASuc

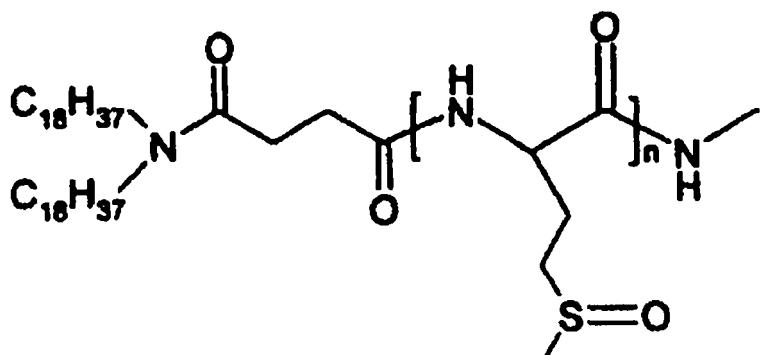
5 Se añadió lentamente una solución de 0,3 g de peryodato sódico en 2 ml de agua a una suspensión de 0,22 g de poli-(DL-metionínamo)-diamino-butano DODASuc en 6 ml ca. de ácido acético. Se agitó durante 1 noche la solución de color naranja/rojo resultante (que se formó después de varias horas). Luego se añadieron 15 ml ca. de agua y la solución de color naranja/rojo resultante fue dializada (MWCO 500) durante varios días. Después de la liofilización se obtuvo 0,25 g de producto.

10 ¹H-NMR en D₂O (δ relativo al máximo de disolvente):

diestearilo: 0,7 (CH₃), 1,2 (CH₂) (máximos amplios)

15 sulfóxido de diestearilo: 2,0 (β -CH₂), 2,5 (CH₃), 2,8 (γ -CH₂), 4,3 (α -CH), 8,5 (NH).

Peso molecular calculado: 4000 ca.



Ejemplo 16

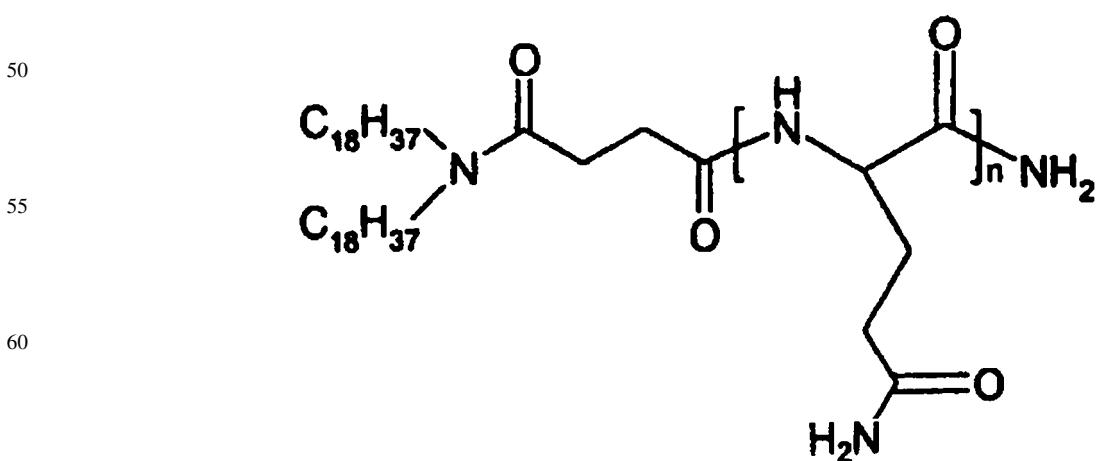
35 *Poli-(DL-glutamina) DODASuc*

Un conjugado de poli-(DL-glutamina) DODASuc fue sintetizado por Ansynth Service B.V. por medio de un método de síntesis de péptidos en fase sólida (escala de 50 mg ca.). La poli-(DL-glutamina) (n=20) unida a una resina fue elaborada paso a paso mediante aminoácidos Fmoc-protectados. Al N-terminal se acopló la N-succinil-diestearilamina. El C-terminal se transformó en una amida. El espectro de ¹H-NMR confirmó la estructura.

40 ¹H-NMR en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

45 diestearilo: 0,8 (CH₃), 1,2 (CH₂), 1,4 (CH₂-N)

poliglutamina: 1,7-2,2 (β , γ -CH₂), 4,2 (CH), 6,8 & 7,3 (NH₂), 8,2 (NH).



Ejemplo 17

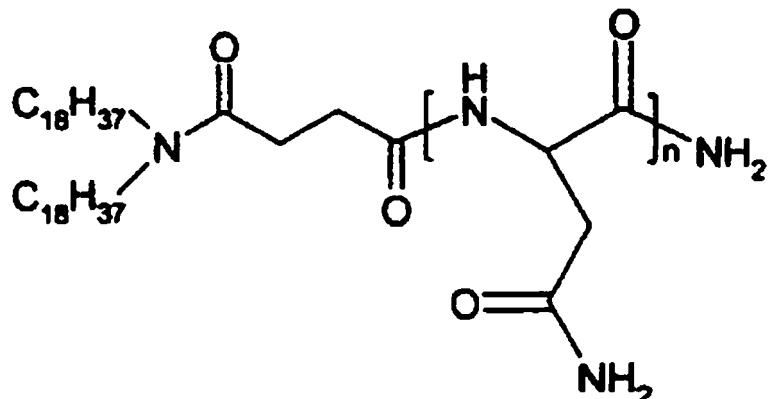
Poli-(DL-asparagina) DODASuc

5 Un conjugado de poli-(DL-asparagina) DODASuc fue sintetizado por Ansynth Service B.V. por medio de un método de síntesis de péptidos en fase sólida a partir de aminoácidos Fmoc-protégidos (escala de 50 mg ca.). La poli-(DL-asparagina) ($n=20$) unida a una resina fue elaborada paso a paso. Al N-terminal se acopló la N-succinil-diestearil-amina. El C-terminal se transformó en una amida. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ registrado en DMSO confirmó la estructura.

10 $^1\text{H-NMR}$ en DMSO-d6 (δ relativo al máximo de disolvente):

diestearilo: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

15 poliasparagina: 2,5 (CH_2), 4,5 (CH), 7,0 & 7,4 (NH_2), 8,1 (NH).



35 Ejemplo 18

Poli-(D,L-alanina) DODASuc

40 Se disolvieron en 4 ml de DMSO 95 mg de poli-DL-alanina (Sigma; MW: 2000 ca.). Se añadieron 40 μl de trietilamina a esta solución. Posteriormente, se añadió esta solución a una solución de 0,1 g de DODASuc, 70 mg de DCC y 5 mg de DPTS en 2 ml de cloroformo que había sido agitado durante 1 hora. Después de su agitación durante 1 día, se precipitó la mezcla en una mezcla de metanol/dietil-éter. Se quitó por filtración el precipitado y se secó.

45 $^1\text{H-NMR}$ registrado en DMSO:

diestearilo: 0,8 (CH_3), 1,2 (CH_2), 1,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

polialanina: 1,2 (CH_3), 4,2 (CH), 8,0 (NH).

50 Ejemplo 19

Copolipéptido de β -alanina e hidroxi-etil-L-glutamina

55 *DODASuc-(β -Ala)₃-Glu(OBzl)-(β -Ala)₄-Glu(OBzl)-(β -Ala)₃-Glu(OBzl)-(β -Ala)₂-NH₂*

el copolipéptido de β -alanina y bencil-L-glutamato fue sintetizado por medio de un método en fase sólida por Ansynth Service B.V. a partir de los monómeros Fmoc-protégidos.

60 C-terminal: amida; N-terminal: DODASuc.

DODASuc-(β -Ala)₃-HEG-(β -Ala)₄-HEG-(β -Ala)₃-HEG-(β -Ala)₂-NH₂

65 Después de lo cual las unidades de glutamato de bencilo fueron convertidas en unidades de glutamina de hidroxi-etilo (HEG) por reacción de aminolisis (etanol-amina) llevada a cabo en DMF.

$^1\text{H-NMR}$ registrado en DMSO reveló la ausencia/conversión de los grupos bencilo.

ES 2 282 439 T3

Ejemplo 20

Preparación de liposomas que contienen PHEG-estearil-amina

5 Se pesaron 33,8 mg de fosfatidil-colina de huevo (EPC) (Lipoid Ludwigshafen), 9,67 mg de colesterol (Sigma Aldrich) y 30,0 mg de poli-[N-(2-hidroxi-etil)-L-glutamín]-estearil-amina (PHEG-estearil-amina) (sintetizada) y se trasladaron a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadieron 500 kBq de colesterol-oleil-éter marcado con tritio como marcador lipídico. Los lípidos y la marca fueron disueltos en aproximadamente 10 ml de etanol. A continuación tuvo lugar la evaporación hasta sequedad seguida de una limpieza con gas de nitrógeno durante 1 hora.

10 Se añadió PBS a la película lipídica seca y se agitó durante una hora en presencia de perlas de vidrio para permitir la hidratación completa de la película lipídica.

15 Se trasladó la suspensión liposomal a un extrusor (Avestin, volumen máximo de 15 ml) y se extruyó bajo presión, mediante la utilización de gas de nitrógeno, 6 veces a través de 2 filtros de policarbonato, uno colocado encima del otro, con un tamaño de poros respectivamente de 200 y 100 nm, y 18 veces a través de filtros que tenían respectivamente un tamaño de poros de 100 nm y 50 nm. Posteriormente, la suspensión liposomal fue dializada en un compartimento de diálisis (Slide-A-Lyzer, 10.000 MWCO) 2 veces durante 24 horas contra 1 litro de PBS esterilizado.

20 El tamaño medio de partículas de los liposomas fue determinado por medio de difusión de luz (Malvern Zeta-sizer) y se descubrió que era de $93,6 \pm 0,9$ nm, siendo el índice de polidispersidad de $0,099 \pm 0,02$. La pérdida de lípidos durante la preparación de los liposomas fue del 25%, determinada mediante la comparación de la radioactividad final de la preparación con la actividad antes del procedimiento de extrusión. Se almacenó la suspensión de liposomas en un medio de nitrógeno a 4°C.

Ejemplo 21

Preparación de otros liposomas que contienen conjugados de lípidos-polímeros

30 Se prepararon los liposomas por medio del método de película, tal como se describe en el Ejemplo 20. En lugar de fosfatidil-colina de huevo se utilizó dipalmitoil-fosfatidil-colina. Se añadieron 5 mM de tampón HEPES a la película lipídica seca y se agitó durante 5 minutos en presencia de perlas de vidrio con el fin de permitir la hidratación completa de la película lipídica. Los liposomas fueron dimensionados por extrusión 12 veces a través de 2 membranas PC estiradas que tenían un tamaño de poros de 100 y 200 nm. Las dispersiones resultantes de liposomas fueron dializadas (MWCO 10.000) y los tamaños medios de partículas fueron determinados por medio de la técnica de difusión de luz dinámica. Véase el Cuadro 1 para las propiedades de las preparaciones liposomales.

Ejemplo 22

40 Cinética comparativa de los conjugados de lípidos-polímeros marcados 3H incorporados en los liposomas después de una sola inyección intravenosa a la rata

45 Las ratas macho (Wistar, Crl: (WI) BR (reproducción exterior, Calidad-SPF) (Charles River, Sulzfeld, Alemania)) tuvieron libre acceso a la dieta en bolitas estándar para animales de laboratorio (Altromin, código VRF 1, Lage, Alemania) y a agua de grifo. Se administró en la vena de la cola una inyección intravenosa de una sola dosis de las preparaciones liposomales, contenido cada una colesterol-oleil-éter marcado 3H (Amersham) que tenía 40-50 kBq de radioactividad, (se muestran en el Cuadro 1 las composiciones por cada 50 μmol de lípido). El lípido total administrado fue de 5 μmol , excepto en los casos indicados.

50 Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola de cada rata en las referencias de tiempo siguientes después de la dosis: 5 minutos y 4, 24 y 48 horas. La cantidad de muestra recogida fue de aproximadamente 300 μl por prueba de muestreo.

55 Se trasladó la sangre muestreada en tubos heparinizados y se almacenó a -20°C.

Una parte alícuota única de 100 μl se solubilizó de acuerdo con el siguiente método:

- Se transfirieron 100 μl a un frasco de centelleo (20 ml).
- Se añadieron 100 μl de Solvable. Esto fue incubado durante al menos 1 hora.
- Se añadieron 100 μl de 1 mM de EDTA y 200 μl de H_2O_2 al 30%. Se incubó esta mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente y después a 50°C durante toda la noche.
- Se añadió Ultima Gold (10 ml) como fluido de centelleo.
- La radioactividad fue medida por LSC.

ES 2 282 439 T3

Todas las mediciones radioactivas se realizaron mediante un contador de centelleo Packard (1900TR). El tiempo de conteo fue hasta una precisión estadística del $\pm 0,2\%$ o un máximo de 5 minutos, el que llegara primero. El Packard 1900TR fue programado para sustraer automáticamente el efecto de fondo y convertir los conteos por minuto (CPM) en desintegraciones por minuto (DPM).

5

Para algunas preparaciones mencionadas el hígado y el bazo de las ratas fueron diseccionados 48 horas después de la inyección y se evaluó la localización de los liposomas según el método siguiente:

10 Los órganos fueron homogeneizados y los homogenatos fueron diluidos a 25 ml (hígado) o 5 ml (bazo). Se trasladó 1 ml de los homogenatos a los frascos de centelleo a los cuales se añadieron posteriormente:

- 200 ml de Solvable (mezclado y muestra incubada a 50°C durante toda la noche)
- 200 ml de 0,5 M de solución de EDTA
- 15 - 250 ml de solución de H₂O₂ (al 30%) (incubada a 50°C durante toda la noche)
- 10 ml de líquido de centelleo Ultima Gold (agitación rotacional y muestra incubada durante 24 horas).

20 A continuación, se contaron las muestras en un contador de beta-centelleo durante 10 minutos. Se muestran en la Figura 6 los resultados para algunas preparaciones liposomales.

25 Se muestran en el Cuadro 1 las composiciones de las preparaciones liposomales, preparadas según el Ejemplo 21 y los resultados obtenidos en la prueba *in vivo* de este ejemplo. Se evaluó el aumento del tiempo de circulación en la sangre, en el cual:

- Buen efecto medio en el tiempo de circulación en comparación con él que muestran los liposomas que contienen PEG-DSPE.
- 30 - Efecto medio moderado en el tiempo de circulación en comparación entre los que muestran los liposomas que contienen PEG-DSPE y los liposomas sencillos sin recubrimiento polimérico.

35

(Cuadro pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 282 439 T3

CUADRO 1

Composición de los liposomas por cada 50 µmol de lípido y propiedades

	DPPC (mg)	Coles- terol (mg)	Conjugado de Lípido-Polímero de (mg)	Tamaño medio de partículas (nm)	Índice de polidispersidad	Aumento del tiempo de circulación en la sangre
5	23,1	6,4	Ej. 3 : 10	153 ± 0,5	0,056	Bueno
10	23,1	6,4	Ej. 2 : 30	143 ± 2	0,205	Moderado
15	23,1	6,4	Ej. 5.1 : 11.2	140,3 ± 2,2	0,090	Bueno
20	23,1	6,4	Ej. 5.2 : 13.8	153,0 ± 0,9	0,090	Moderado
25	23,1	6,4	Ej. 5.4 : 11.2	148,2 ± 1,7	0,071	Escaso
30	23,1	6,4	Ej. 6 : 11.0	138,7 ± 1,8	0,116	Escaso
35	23,1	6,4	Ej. 11 : 8.9	146,0 ± 2,1	0,092	Bueno
40	23,1	6,4	Ej. 11 : 13.8	147,0 ± 1,1	0,068	Bueno
45	23,1	6,4	Ej. 11 : 8.9	141,7 ± 2,3	0,044	Bueno
50	23,1	6,4	Ej. 5.2 : 11.2	163,9 ± 3,0	0,068	Moderado
55	23,1	6,4	Ej. 20 : 2.2	171,6 ± 2,5	0,167	Escaso
60	23,1	6,4	Ej. 8 : 10.1	180,7 ± 6.1	0,113	Escaso
65	23,1	6,4	Ej. 5.1 : 11.2	159,0 ± 3,8	0,073	Bueno §
	23,1	6,4	Ej. 11 : 8.9	152,9 ± 3,4	0,050	Bueno §
	23,1	6,4	Ej. 9 : 11.2	170,3 ± 2,5	0,039	Moderado
	23,1	6,4	Ej. 9 : 2.24+ Ej. 5.1 : 8.96	166,0 ± 0,9	0,056	Moderado
	23,1	6,4	Ej. 8 : 10.1	167,7 ± 0,6	0,170	Escaso
	23,1	6,4	Ej. 15 : 11.2	159,9 ± 2,3	0,062	Bueno
	23,1	6,4	Ej. 13 : 5.0	162,7 ± 1,6	0,159	Escaso
	23,1	6,4	Ej. 16 : 8.8	156,3 ± 3,2	0,059	Moderado
	25,0	6,4	Ej. 17 : 8.8	164,7 ± 4,0	0,116	Moderado
	23,1	6,4	Ej. 7 : 8.8	159,0 ± 3,8	0,073	Escaso
	23,1	6,4	Ej. 19 : 8.8	152,9 ± 3,4	0,050	Moderado
	23,1*	6,4*	Ej. 11 : 8.8*	167,7 ± 0,6	0,170	Bueno
	23,1**	6,4**	Ej. 11 : 8.8**	149,9 ± 2,3	0,062	Bueno
	23,1***	6,4***	Ej. 11 : 8.8***	162,7 ± ,024	0,159	Escaso
	23,1	6,4	PEG-DSPE: 6.9	156,3 3,2	0,059	Bueno
	23,1*	6,4*	PEG-DSPE: 8.8*	170,3 2,5	0,039	Bueno
	23,1**	6,4**	PEG-DSPE: 6.9**	166,0 0,9	0,056	Bueno
	23,1***	6,4***	PEG-DSPE 6.9***	170,5 0,3	0,110	< Escaso

ES 2 282 439 T3

*: 0,5 µmol de Lípido Total administrado (véase Figuras 1 y 2)

**: 0,05 µmol de Lípido Total administrado (véase Figuras 1 y 2)

5 ***: 0,005 µmol de Lípido Total administrado (véase Figuras 1 y 2)

§: Cuando se dio una segunda inyección (TL 1 µmol) después de 1 semana, se observó una reducción en el tiempo de circulación para los liposomas que contenían el conjugado de lípido-polímero del Ejemplo 5.1. Los liposomas que contenían el conjugado del Ejemplo 11, mostraron también esta reducción, pero se observó para 10 2 animales que este efecto era moderado.

Ejemplo 23

Preparación de liposomas que contienen un conjugado de lípido-polímero y fosfato de prednisolona

15 750 mg de dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC) (Lipoid Ludwigshafen), 220,0 mg de colesterol (Sigma Aldrich) y 270,0 mg del conjugado de lípido-polímero del Ejemplo 11 así como 750 mg de dipalmitoil-fosfatidil-colina, 250,8 mg de colesterol y 267,6 mg de PEG-diestearoil-fosfatidil-etanol-amino (PEG-DSPE) (Avanti Polar Lipids) respectivamente fueron pesados y mezclados en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se disolvieron los 20 lípidos en aproximadamente 30 ml de una mezcla al 1:1 de metanol y cloroformo (conjugado de lípido-polímero del Ejemplo 14) o etanol (PEG-DSPE). A continuación tuvo lugar la evaporación hasta sequedad seguida del lavado con gas de nitrógeno durante 1 hora.

25 1200 mg de prednisolona - fosfato disódico (PLP) (OPG Nieuwegein) fueron pesados y disueltos en 12 ml de PBS esterilizado. Se añadió la solución a las películas lipídicas secas y se agitó durante una hora en presencia de perlas de vidrio para permitir la hidratación completa de las películas lipídicas.

30 Se trasladaron las suspensiones liposomales a un extrusor (Avestin, volumen máximo de 15 ml) y se extruyeron bajo presión, utilizando gas de nitrógeno, 6 veces a través de 2 filtros porosos uno colocado encima del otro, que tenían un tamaño de poro respectivamente de 200 y 100 nm, respectivamente de 100 y 50 nm y respectivamente de 50 y 50 nm. Posteriormente, se dializaron las suspensiones liposomales en un compartimento de diálisis (Slide-A-Lyzer, 10.000 MWCO) 2 veces durante 24 horas contra 1 litro de PBS esterilizado.

35 El tamaño medio de partículas de los liposomas fue determinado por medio de difusión de luz (Malvern Zeta-sizer) y se descubrió que era aproximadamente de 85 y 90 nm respectivamente, siendo el índice de polidispersidad < 0,1. Se determinó la eficacia de encapsulación del fosfato de prednisolona por medio de un método HPLC y se descubrió que era del 2,6%. Se almacenaron las suspensiones de liposomas en un medio de nitrógeno a 4°C y se descubrió que eran estables durante al menos 5 semanas, donde las preparaciones liposomales que contenían el conjugado de lípido-polímero del Ejemplo 14, cumplían un poco mejor que las preparaciones liposomales que contenían el conjugado de 40 lípido-polímero de referencia PEG-DSPE (véase la Figura 3).

Ejemplo 24

Valoración del tiempo de circulación y de la eficacia terapéutica en el modelo de artritis adyuvante en ratas de las formulaciones liposomales que contienen fosfato de prednisolona

50 Las ratas Lewis fueron inmunizadas subcutáneamente en la base de la cola con *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor en adyuvante de Freund incompleto. La inflamación de la pata empezó entre 9 y 12 días después de la inmunización, alcanzó su gravedad máxima aproximadamente a los 20 días, y luego se resolvió gradualmente.

55 La valoración de la enfermedad se realizó tomando nota visualmente de la gravedad de la inflamación de la pata a partir del día 10 hasta el día 35 después de la inmunización. Cuando la importancia de la inflamación de la pata estaba a punto de alcanzar valores a medio camino del grado máximo (día 14-15), todas las ratas fueron divididas en grupos de 5 con grados medios iguales y fueron tratadas con una sola inyección intravenosa de:

- 55 1. 10 mg/kg de PLP en los liposomas de PHEA-DODASuc, según se preparan en el Ejemplo 23, o
- 56 2. 10 mg/kg de PLP en los liposomas de PEG-DSPE, según se preparan en el Ejemplo 23 (referencia), o
- 57 3. PBS (control).

60 En t=0, 24 y 48 horas, se recogieron muestras de sangre y se sometieron a prueba en cuanto a la concentración de plasma del PLP liposomal. El comportamiento en la circulación de los liposomas tanto PHEA como PEG en la sangre se muestra mediante los perfiles de concentración de plasma de PLP, que están descritos en la Figura 4. Ambos tipos de liposomas cumplen igualmente bien con respecto a la vida media de la circulación.

65 La Figura 5 muestra la actividad terapéutica en la artritis adyuvante en ratas de 10 mg/kg de liposomas PLP-PHEA y 10 mg/kg de liposomas PLP-PEG con respecto a las ratas tratadas con solución salina como controles.

ES 2 282 439 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un conjugado de lípido-polímero que puede ser obtenido a partir de un lípido anfíflico, compuesto de al menos una parte apolar hidrofóbica y un grupo de cabeza polar hidrofílico, así como un polímero o un precursor monomérico para lo mismo, que tiene un grupo extremo N- y C-terminal, **caracterizado** porque el polímero es un polímero (aminoácido), un derivado de poli-(aminoácido) o un análogo de poli-(aminoácido) y porque el lípido está unido al grupo extremo N- o C-terminal del polímero, teniendo el polímero la fórmula siguiente:



en la cual

15 - R es definido como:

- H, -CH₃, -CH₂OR₁, -(CH₂)_xOR₁, -(CH₂)_x-CO-NHR₁, -(CH₂)_x-NH-CO-R₁, -(CH₂)_x-SO_yCH₃, OR -(CH₂)_xCOOH;

20 - R₁ es H o alquilo (C₁-C₄), sustituido por uno o más grupos hidroxilo o un grupo dialquil-amina (C₁-C₄);

x es 0-4;

m = 1 ó 0, e

25 y = 1 ó 2.

30 2. El conjugado según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque el lípido anfíflico está seleccionado a partir del grupo compuesto de fosfolípidos, glicolípidos, ceramidas, colesterol y derivados, mono- o di-alquil-aminas C₈-C₅₀, aril-alquil-aminas, cicloalquil-alquil-aminas, alcanoles, aldehídos, carbohaluros o ácidos alcanoicos y los anhídridos de los mismos saturados o insaturados, de cadena lineal o ramificada, y **caracterizado** porque el número total de átomos-C es preferentemente de 25 o más.

35 3. El conjugado según la Reivindicación 2, **caracterizado** porque el lípido anfíflico contiene al menos dos partes apolares hidrofóbicas.

40 4. El conjugado según la Reivindicación 3, **caracterizado** porque el lípido anfíflico está seleccionado a partir del grupo compuesto de 1-heptadecil-octadecil-amina, N-succinil-dioctadecil-amina y diestearil-fosfatidil-etanol-amina.

45 5. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero tiene un χ -parámetro de $\leq 0,65$, preferentemente $\leq 0,5$ en agua.

60 6. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero consiste en α -aminoácidos y los derivados o análogos de los mismos.

45 7. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero no contiene cantidad sustancial alguna de grupos cargados dentro de un pH fisiológico de 4-8.

50 8. El conjugado según la Reivindicación 7, **caracterizado** porque el polímero se compone de monómeros de aminoácidos, monómeros análogos de aminoácidos o monómeros derivados de aminoácidos, que son neutros o que han sido neutralizados a un pH fisiológico de 4-8.

9. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero tiene un peso molecular situado entre 500 y 75.000, preferentemente entre 2.000 y 15.000.

55 10. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el polímero es biodegradable.

60 11. El conjugado según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque el polímero es poli-[N-(2-hidroxi-etil)]-L-glutamina.

65 12. El conjugado según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque el polímero es poli-(2-hidroxi-etil)-L-asparagina.

13. El conjugado según la Reivindicación 1, **caracterizado** porque el polímero es poli-(D,L-metionina sulfóxido).

Farmacocinética de dependencia de dosis con respecto a los PHEA-liposomas

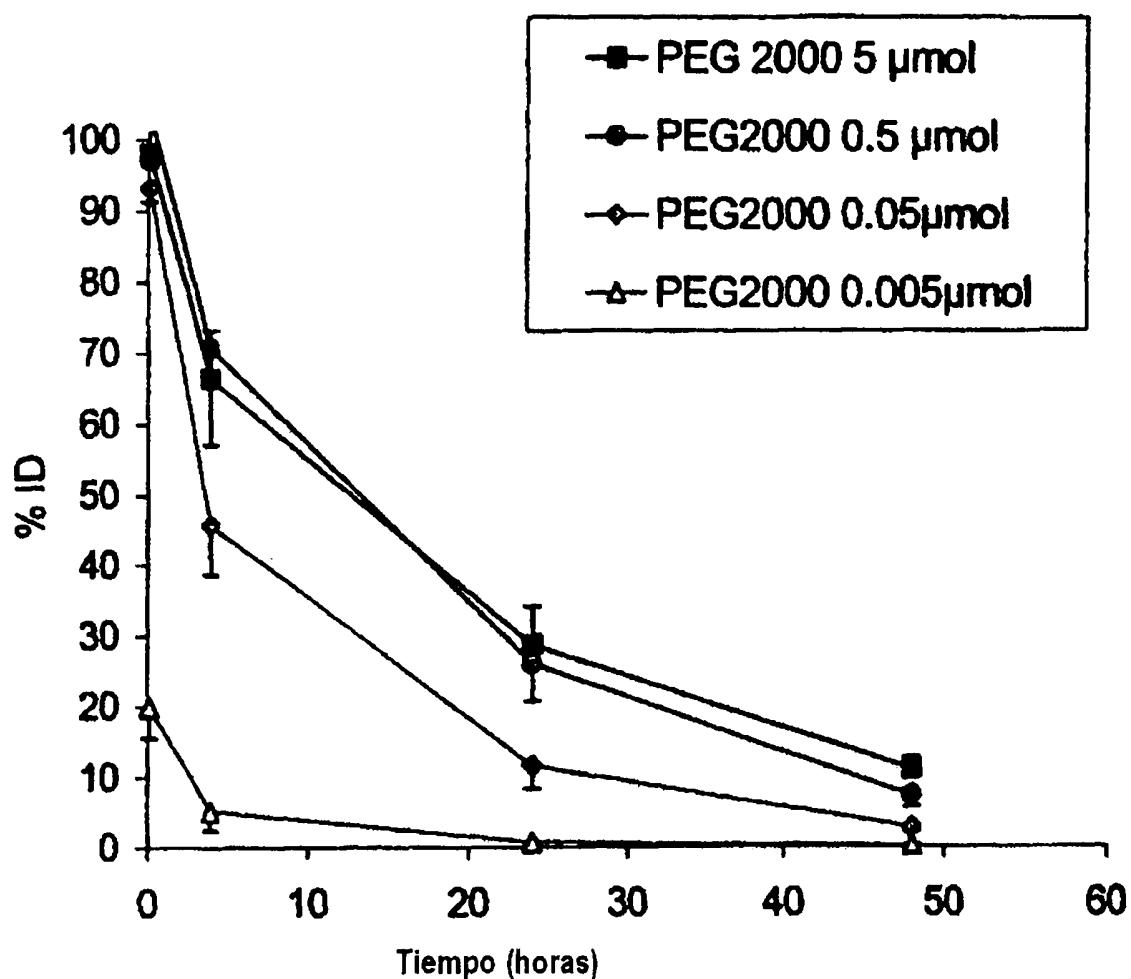


FIGURA 1

Farmacocinética de dependencia de dosis con respecto a los PEG-liposomas

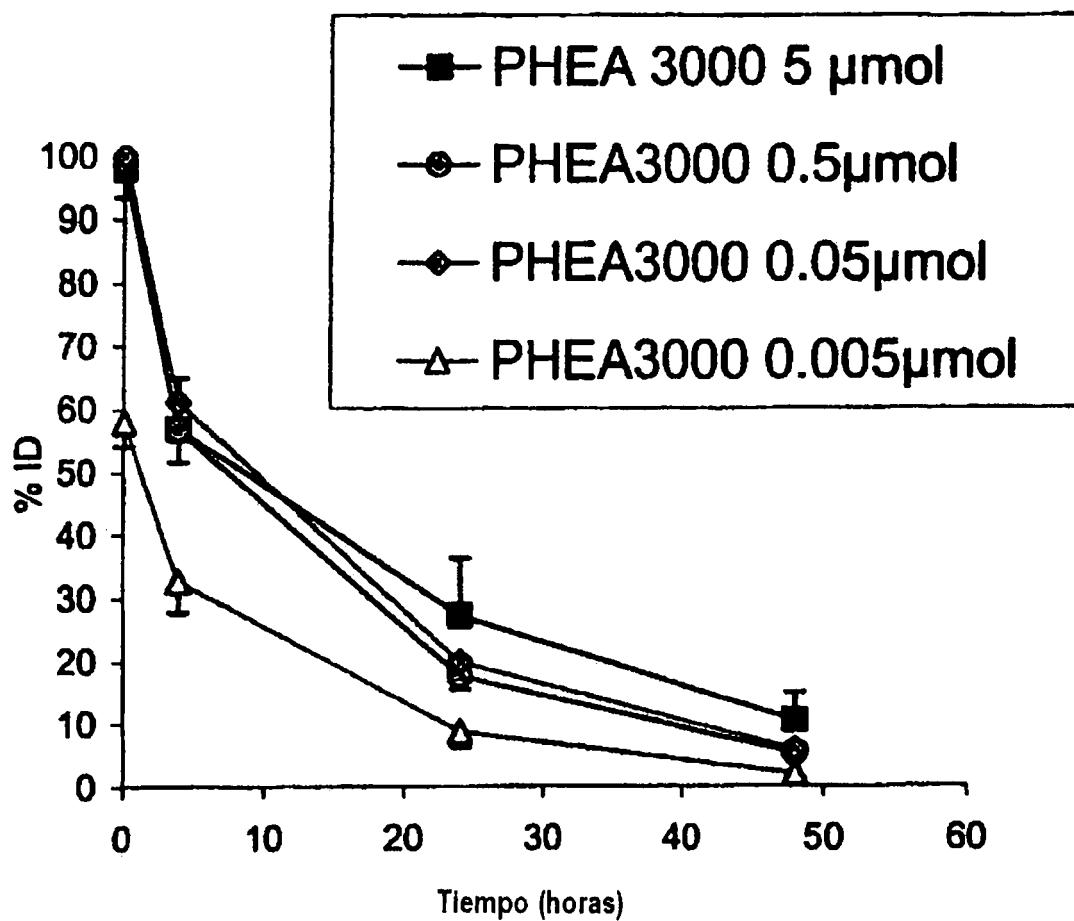


Fig 2

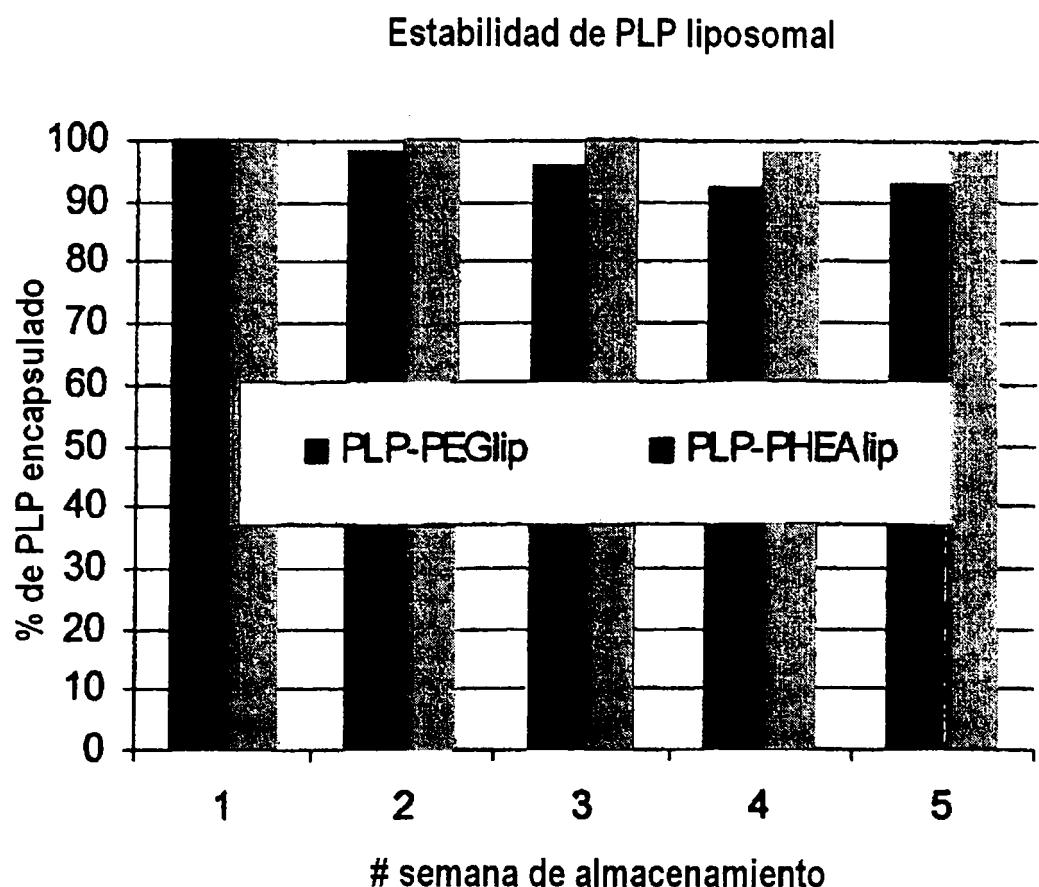


FIGURA 3

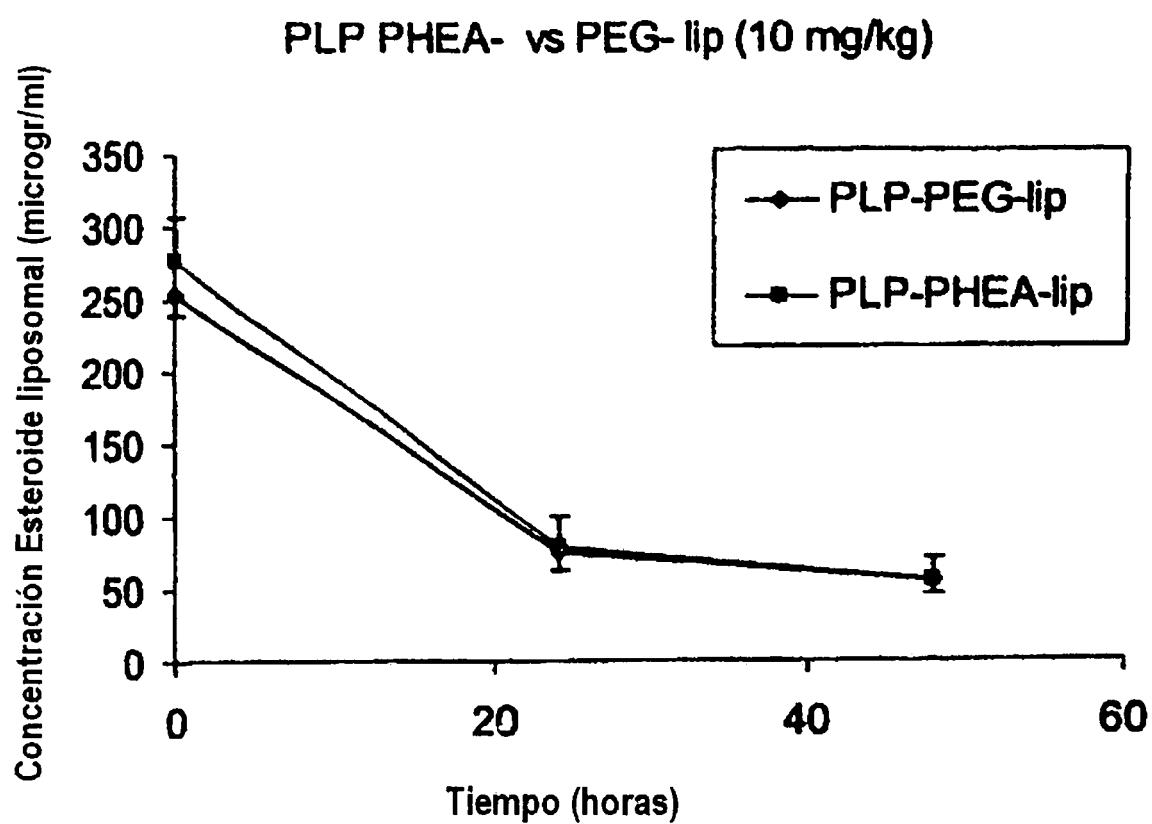


FIGURA 4

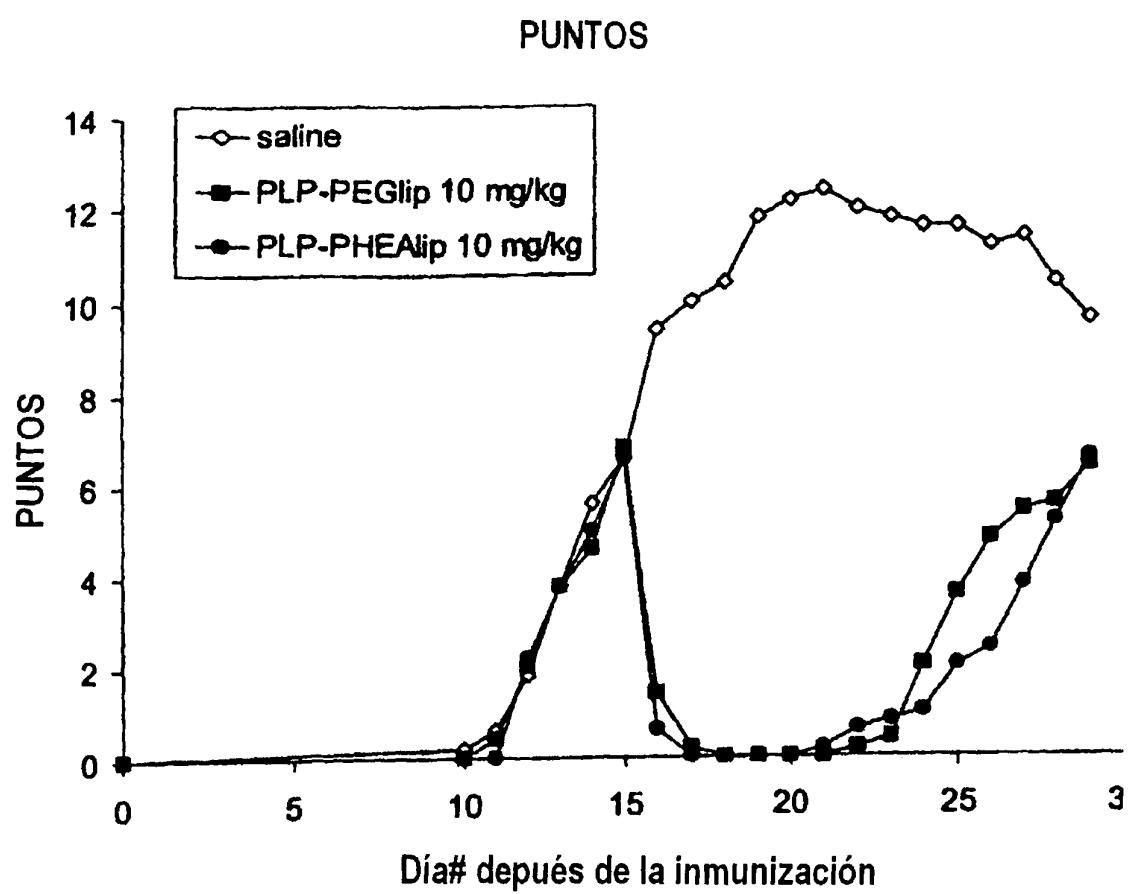


FIGURA 5

ES 2 282 439 T3

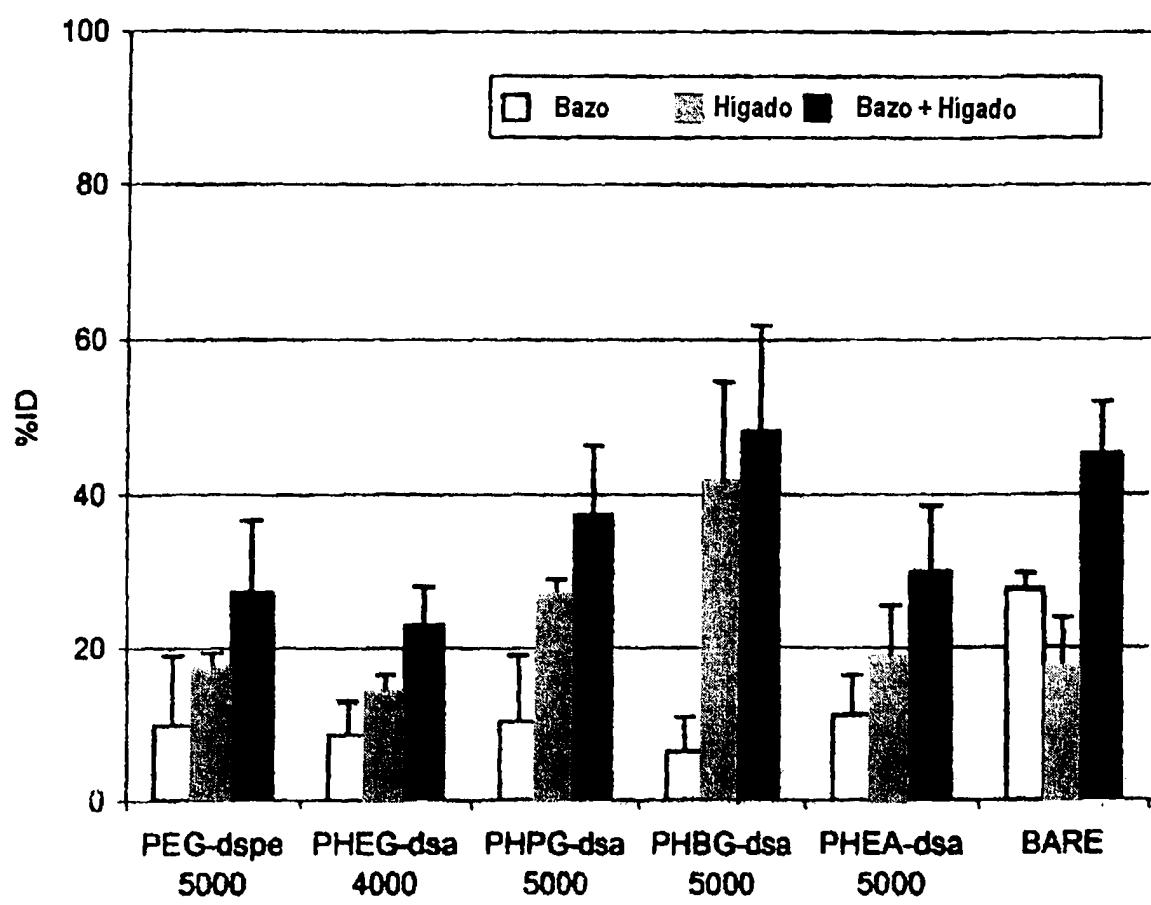


FIGURA 6