



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 991**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07785504 .7**

96 Fecha de presentación : **08.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2049157**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Conjugados poliméricos de doxorubicina con liberación del fármaco regulada por pH y un método de preparación.**

30 Prioridad: **09.08.2006 CZ 20060505**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73 Titular/es: **ZENTIVA, K.S.**
U Kabelovny 130 Dolní Měcholupy
102 37 Praha 1, CZ

72 Inventor/es: **Etrych, Tomas y**
Ulbrich, Karel

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 356 991 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sector técnico

5 La presente invención se refiere a un método nuevo de preparación de agentes cancerostáticos poliméricos solubles en agua que permiten el transporte dirigido y la liberación regulada de agentes citostáticos en el organismo, preferentemente en el tejido tumoral y las células tumorales. Los agentes cancerostáticos poliméricos se preparan directamente mediante la copolimerización con un monómero que contiene un agente cancerostático en su estructura. La utilización de conjugados poliméricos se centra en la terapia dirigida de enfermedades tumorales en medicina humana.

Técnica anterior

10 El desarrollo de nuevas sustancias farmacológicamente potentes, que incluyen agentes cancerostáticos, se ha centrado cada vez más en nuevas formas que permiten la acción específica del fármaco activo únicamente en un tejido concreto o incluso en un tipo de célula concreta. Los fármacos dirigidos son útiles especialmente en los sectores donde los efectos secundarios del principio activo pueden dar lugar a un daño de las partes sanas del organismo. La preparación de fármacos dirigidos implica cada vez más la utilización de macromoléculas - polímeros, tanto naturales como sintéticos. En el pasado, se preparó y estudió una gran cantidad de conjugados poliméricos de agentes cancerostáticos y se demostró que, en la mayoría de los casos, es necesario asegurar la liberación de la sustancia citotóxica original de bajo peso molecular de su forma polimérica para que la forma polimérica del fármaco sea farmacológicamente eficaz. Naturalmente, la unión de un agente citostático a un polímero soluble en agua a través de un enlace químico también permite un incremento radical de la solubilidad de fármacos insolubles o poco solubles y, de forma significativa, disminuye su toxicidad. Finalmente, si bien no menos importante, el peso molecular más elevado de los polímeros evita una liberación rápida del fármaco del organismo a través de la filtración glomerular y, de este modo, asegura un tiempo prolongado de su circulación en sangre y de retención en el organismo y, por tanto, una biodisponibilidad más elevada del fármaco. Resulta ventajoso asegurar la liberación del agente citostático del portador polimérico a través de un espaciador biodegradable, utilizado para unir el fármaco al polímero, la degradación del cual en el tejido diana conduce a una liberación dirigida y regulada del fármaco en el tejido. Un grupo importante de los fármacos descritos anteriormente son los fármacos poliméricos preparados en base a copolímeros de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA). Una revisión de los resultados obtenidos en este sector hasta ahora se encuentra muy bien elaborada en G.S. Kwon y en J. Kopecek y otros [Kopecek y otros 2000, Kwon 2005]. Recientemente, se han publicado estudios sobre la preparación y la acción de fármacos poliméricos en los que la doxorubicina cancerostática está unida a un portador polimérico basado en copolímeros de HPMA a través de un enlace de hidrazona inestable hidrolíticamente [Etrych y otros 2001 y 2002, Rihova y otros 2001, Ulbrich y otros 2003, 2004a, 2004b] y se han patentado las sustancias [Ulbrich y otros]. Los fármacos descritos mostraron un descenso significativo de los efectos secundarios en el organismo, especialmente de los efectos tóxicos, y, simultáneamente, un aumento significativo de la eficacia antitumoral en comparación con los agentes citostáticos de bajo peso molecular utilizados habitualmente [Rihova y otros 2001, Kovar y otros 2004, Hovorka y otros 2002].

40 La síntesis de dichos conjugados se realizó en primer lugar mediante una reacción polimérica análoga de ésteres 4-nitrofenílicos poliméricos (ONp) con hidrazina y, posteriormente, mediante la copolimerización de HPMA con hidrazidas metacriloiladas protegidas con un grupo N-Boc (*tert*-butiloxicarbonilo). Posteriormente, se desarrolló un método nuevo de preparación de conjugados poliméricos que incluía la preparación del monómero de 6-(metacriloilamino)hexanoilhidrazina y su copolimerización con HPMA. El método representaba un progreso significativo en la síntesis y permitía una regulación exacta del peso molecular de los precursores poliméricos y el producto final [patente de Etrych]. En todos los métodos mencionados, el fármaco estaba unido al precursor polimérico que contenía grupos hidrazida libres a través de una reacción polimérica análoga.

45 Se sintetizaron conjugados de un fármaco y HPMA que contenían un espaciador de eliminación 1,6 mediante la copolimerización radical de HPMA con un monómero que contenía 9-aminocamptotecina [Gao y otros 2006]. El objetivo de la presente invención es un método nuevo de preparación de agentes citostáticos poliméricos basados en copolímeros de HPMA con doxorubicina unidos a través de un enlace hidrazona lábil al pH a un portador polimérico. El método que se propone permite la incorporación del fármaco en la estructura del conjugado polimérico directamente a través de la copolimerización de HPMA con un monómero que contenía doxorubicina, conectada al grupo polimerizable con un enlace hidrazona a través de un espaciador, es decir, sin necesidad de una reacción posterior de unión del espaciador del fármaco al precursor polimérico. La utilización del monómero mencionado en la síntesis permite preparar conjugados poliméricos con una estructura definida de manera exacta de la cadena polimérica que contiene sólo unidades monoméricas de HPMA y unidades monoméricas que portan el fármaco unido a hidrazona.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere esencialmente a un método de preparación de un conjugado polimérico de un copolímero de HPMA con doxorubicina unido al polímero a través de varios espaciadores que contienen enlaces hidrazona separables hidrolíticamente. El método consiste en una síntesis de dos etapas que

implica la síntesis de monómeros, a saber HPMA y derivados metacriloilados de aminoácidos y oligopéptidos, terminados con doxorubicina conectados a través del enlace hidrazona, y la síntesis directa de conjugados poliméricos a través de la copolimerización con el monómero mencionado que contiene la doxorubicina cancerostática unida mediante un enlace hidrazona covalente.

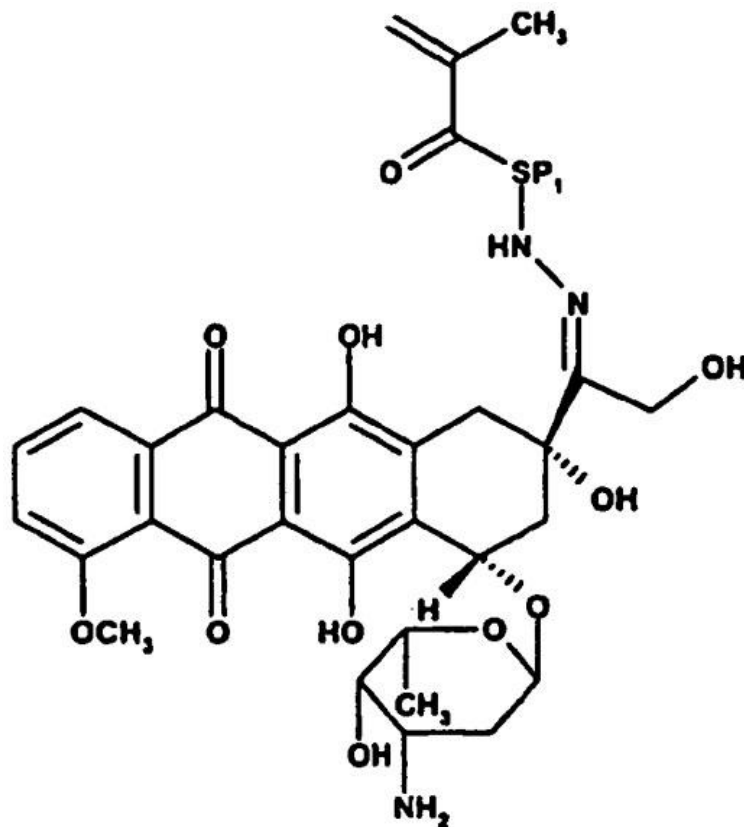
5 El fármaco polimérico preparado según la presente invención se caracteriza por el hecho de que su estructura está constituida por un copolímero hidrofílico soluble en agua que contiene unidades de HPMA y unidades de un derivado metacriloilado de aminoácidos u oligopéptidos, terminado con doxorubicina conectado a los residuos de aminoácidos u oligopéptidos (espaciadores) a través de un enlace hidrazona separable hidrolíticamente sensible al pH. Los espaciadores pueden estar constituidos por aminoácidos individuales, oligopéptidos u otras estructuras, que permiten su terminación con el grupo hidrazina y la unión de la doxorubicina a los mismos mediante un enlace hidrazona. El contenido de unidades comonoméricas (que contienen Dox) en el copolímero puede ser de 0,5 a 10% molar. El copolímero no contiene ninguna otra unidad poco definida, por ejemplo, hidrazidas metacriloiladas.

10 El polímero con el agente citostático unido químicamente es estable durante la circulación en el torrente sanguíneo, el enlace hidrazona entre doxorubicina y el polímero es relativamente estable en las condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo (pH 7,4). Después de la extravasación y atrapamiento en tumores, el conjugado disuelto molecularmente penetra en células tumorales individuales a través de la pinocitosis y, debido al descenso del pH desde el pH extracelular de 7,4 al pH intracelular de 5 a 6, deben tener lugar la hidrólisis del enlace hidrazona, la liberación del agente citostático en la célula diana y, por tanto, la activación de su efecto citotóxico. La viabilidad del mecanismo de acción propuesto anteriormente de los fármacos poliméricos según la presente invención se demuestra mediante experimentos de liberación modelada de doxorubicina del portador polimérico. Los resultados de dichas pruebas se presentan en la parte experimental de la solicitud.

15 La *síntesis de monómeros* empieza a partir de la síntesis del monómero de HPMA a través del método descrito anteriormente [Ulbrich 2000]. La síntesis de metacriloil(aminoacil)hidrazidas que difieren en la estructura del componente acilo es muy similar en todos los monómeros preparados y se realiza utilizando el procedimiento descrito anteriormente [patentes de Ulbrich, patente de Etrych]. Esta síntesis empieza a partir de la metacriloilación del éster metílico del clorhidrato del aminoácido u oligopéptido respectivos con cloruro de metacrililoilo, realizada en diclorometano en presencia carbonato de sodio anhidro. El producto resultante se convierte en una aminoacilhidrazina metacriloilada mediante la hidrazinólisis del éster metílico respectivo con hidrato de hidrazina, realizada en una solución en metanol o 2-propanol. Preferentemente, el aminoacilo en las metacriloil(aminoacil)hidrazinas puede ser glicilo, glicilglicilo, β -alanilo, 6-aminohexanoílo, 4-aminobenzoílo o un acilo complejo derivado de los oligopéptidos GlyPheGly, GlyLeuGly o GlyPheLeuGly. Como ejemplo de síntesis de una metacriloil(aminoacil)hidrazina, se presenta en el ejemplo 1 la síntesis de la 6-metacriloil(aminoacil)hidrazida.

20 La preparación de (metacriloilamino)acilhidrazida-doxorubicinas empieza a partir de la reacción de unión del clorhidrato de doxorubicina con metacriloil(aminoacil)hidrazinas produciendo el enlace hidrazona. La reacción se lleva a cabo preferentemente en metanol bajo catálisis con una cantidad definida de ácido acético con la adición de un inhibidor. La reacción se puede realizar también en dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etanol anhidro o dimetilacetamida. Si se utilizan otros disolventes aparte de metanol, la reacción tiene lugar de forma correcta, pero con un rendimiento inferior. La influencia de la estructura del espaciador en la evolución de la reacción de unión es mínima. Para conseguir un rendimiento óptimo del enlace y un contenido mínimo de doxorubicina no unida, es importante, en cualquier caso, adherir a las concentraciones de los reactivos y de ácido acético en la mezcla de reacción: una concentración de 19 mg/ml de doxorubicina (DOX), una concentración de 51 mg/ml de ácido acético. El tiempo de reacción óptimo es de 24 h a 25°C. Las condiciones especificadas anteriormente son óptimas, dando lugar a rendimiento máximos. La reacción también se puede llevar a cabo bajo condiciones de reacción ligeramente modificadas, ajustadas al tipo de disolvente utilizado, así como a la (metacriloilamino)acilhidrazida. Si se utiliza una concentración de DOX inferior (10 mg/ml), es necesario trabajar a una temperatura más elevada (hasta 35°C), la concentración de ácido acético se puede disminuir hasta 35 mg/ml, o de manera alternativa, se puede extender el tiempo de reacción (hasta 28 horas). A una concentración de DOX más elevada (30 mg/ml), es ventajoso incrementar la concentración de ácido acético hasta un máximo de 60 mg/ml y acortar el tiempo de reacción hasta 20 horas, o de manera alternativa, disminuir la temperatura hasta 20°C. Para extraer el fármaco libre del producto, se puede utilizar preferentemente una pequeña adición del polímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH₂), los grupos hidrazida del cual se unirán a la doxorubicina (DOX) no reaccionada. La mezcla de reacción se purifica posteriormente mediante filtración en gel, preferentemente en una columna LH-20 en metanol. Después de la concentración, se aísla la fracción derivada de DOX monomérica mediante precipitación en dietil éter. Las preparaciones de 6-(metacriloilamino)hexanoilhidrazida-doxorubicina y de metacriloilglicilfenilalanilglicilhidrazida-doxorubicina se presentan como ejemplos de la síntesis de (metacriloilamino)acilhidrazida-doxorubicina en la parte experimental.

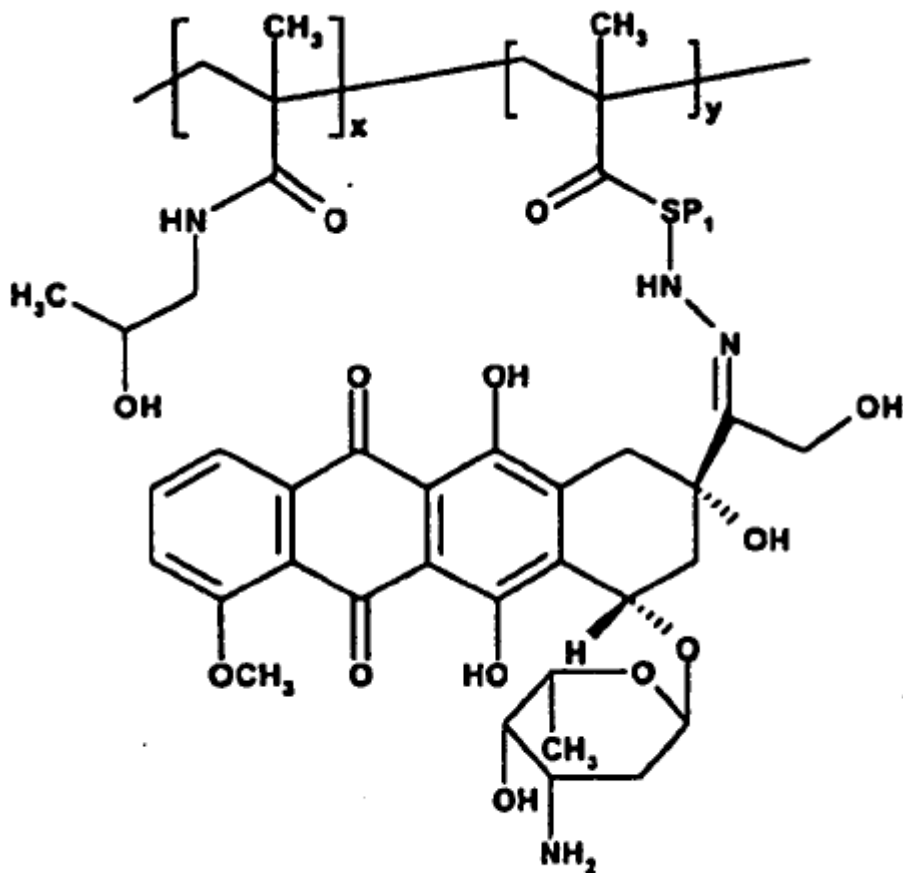
La síntesis de conjugados poliméricos de doxorubicina – copolímeros de HPMA con derivados metacriloilados de aminoácidos y oligopéptidos, terminados con doxorubicina conectados a través del enlace hidrazona, se basa en la copolimerización directa con radicales de HPMA con los correspondientes derivados de DOX metacriloilados de fórmula II



II

5 La polimerización se realiza en solución utilizando metanol, etanol, dimetilsulfóxido o dimetilformamida como medio de polimerización. La polimerización se inicia con iniciadores de polimerización con radicales degradables con el calor basados en iniciadores azo o peroxi. Se utilizan preferentemente azobis(isobutironitrilo) (AIBN), azobis(ácido isocianoaléxico) (ABIC) o diisopropilpercarbonato (DIP). La temperatura de polimerización depende del iniciador respectivo y el disolvente utilizado (50 a 60°C para AIBN, ABIC en metanol, etanol, DMF y DMSO, 40 a 50°C para DIP). Un tiempo de polimerización habitual es de 15 a 24 horas. La preparación de todos los conjugados poliméricos a través de la polimerización con radicales es análoga; por ejemplo, la copolimerización de HPMA con un derivado de DOX metacriloilado se presenta en el ejemplo 3. En comparación con la reacción de unión polimérica análoga utilizada anteriormente de DOX al precursor polimérico poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH₂), la copolimerización directa de HPMA con un derivado de DOX metacriloilado da lugar a conjugados poliméricos definidos de manera exacta.

El conjugado polimérico es un copolímero de HPMA con derivados metacriloilados de aminoácidos y oligopéptidos, terminados con doxorubicina, conectados con el enlace hidrazona, de fórmula I



I

estando caracterizado porque contiene de 90 a 99,5% molar de HPMA y de 10 a 0,5% molar de unidades (metacriloilamino) acilhidrazida-doxorubicina.

5 Se ha introducido una abreviatura para los espaciadores en las cadenas laterales de los conjugados y los monómeros en los esquemas estructurales de la presente invención – SP₁ es el aminoacilo en metacriloilacilhidrazida-doxorubicinas, por ejemplo, glicilo, glicilglicilo, β-alanilo, 6-aminohexanoílo (AH), 4-aminobenzoílo o un acilo complejo derivado de los oligopéptidos GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly y GlyPheLeuGly.

Descripción breve de los dibujos

10 La figura 1 representa un esquema de la estructura de los derivados metacriloilados de aminoácidos y oligopéptidos, terminados con doxorubicina conectados a través del enlace hidrazona ((metacriloilamino)-acilhidrazida-doxorubicina).

15 La figura 2 representa un esquema de la estructura del conjugado 1 – copolímero de HPMA y un derivado metacriloilado de aminoácidos y oligopéptidos, terminado con doxorubicina conectado a través del enlace hidrazona (x = 40 a 335, y = 1 a 25).

La figura 3 representa un gráfico de la tasa de liberación de DOX del conjugado polimérico 1 y del conjugado polimérico preparado a través de una reacción polimérica análoga (patente de Etrych) en un tampón con pH 5 (modelo de medio intracelular).

20 La figura 4 representa un gráfico de la tasa de liberación de DOX del conjugado polimérico 1 y del conjugado polimérico preparado a través de una reacción polimérica análoga (patente de Etrych) en un tampón con pH 7,4 (modelo de torrente sanguíneo).

Ejemplos*Ejemplo 1: Síntesis de monómeros*

Se preparó HPMA según el procedimiento que se describió anteriormente [Ulbrich y otros 2000]. Análisis elemental: calculado 58,8 % C, 9,16 % H, 9,79 % N; hallado 58,98 % C, 9,18 % H, 9,82 % N. El producto era cromatográficamente puro.

5 Se preparó la 6-(metacriloilamino)hexanoilhidrazida (N^1 -(6-hidrazino-6-oxohexil)-2-metilacrilamida) (MA-AH-NHNH₂) según el procedimiento descrito anteriormente [patentes de Ulbrich, patente de Etrych].

Se preparó la metacroilglicilfenilalanilleucil glicilhidrazida (MA-Gly-D,L-PheLeuGly-NHNH₂) según el procedimiento descrito anteriormente [patente de Etrych].

6-(Metacriloilamino)hexanoilhidrazida-doxorubicina (MA-AH-NHN=DOX)

10 Se disolvió la 6-(metacriloilamino)hexanoilhidrazida (40 mg, 0,188 mmol) en 6 ml de metanol a temperatura ambiente. La solución se vertió en un recipiente de reacción en el que se había colocado doxorubicina.HCl (115 mg, 0,198 mmol) y se agitó la suspensión de forma vigorosa. Se añadieron 310 μ l de ácido acético a la suspensión y la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 24 horas. El proceso de reacción se controló mediante placas de TLC - Silicagel 60 F254 (metanol:cloroformo:ácido acético 2:8:1, Rf(DOX) = 0,75, Rf(MA-AH-NHN=DOX) = 0,9). Durante la evolución de la reacción, la suspensión se disolvió de forma gradual y la solución era homogénea después de 20 horas de reacción. Después de 24 horas, se añadieron 100 mg del copolímero poli (HPMA-co-MA-AH-NHNH₂) a la mezcla homogénea (para unir la DOX libre residual) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otras 4 horas. El producto se purificó de las impurezas poliméricas y de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel en una columna (30 cm x 30 cm) rellena con Sephadex LH-20 en metanol. La fracción de bajo peso molecular se concentró hasta 2 ml y el producto se precipitó en 30 ml de dietil éter. El producto se succionó, se lavó con una pequeña cantidad de dietil éter, y se secó al vacío hasta peso constante. El rendimiento fue de 110 mg del producto (79%) con el punto de fusión de 172 a 175°C. TLC (metanol:cloroformo:ácido acético 2:8:1): una mancha a Rf = 0,9. MALDI-TOF MS: 762 (M+Na).

25 Metacroilglicilfenilalanilleucilglicilhidrazida-doxorubicina (MA-GFLG-NHN=DOX). La preparación de MAGFLG-NHN=DOX se realizó bajo condiciones similares como en el caso de MA-AH-NHN=DOX. Se disolvió la metacroilglicilfenilalanil leucilglicilhidrazida (122 mg, 0,258 mmol) en 8,2 ml de metanol a temperatura ambiente. La solución se vertió en un recipiente de reacción en el que se había colocado doxorubicina.HCl (157 mg, 0,271 mmol) y se agitó la suspensión de forma vigorosa. Se añadieron 420 μ l de ácido acético a la suspensión y la mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 24 horas. La evolución de la reacción se controló mediante placas de TLC - Silicagel 60 F₂₅₄ (metanol:cloroformo:ácido acético 2:8:1, Rf(DOX) = 0,75, Rf(MA-GFLG-NHN=DOX) = 0,95). Durante la evolución de la reacción, la suspensión se disolvió de forma gradual y la solución era homogénea después de 19 horas de reacción. Después de 24 horas, se añadieron 130 mg del copolímero de poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH₂) a la mezcla homogénea (para unir la DOX libre residual) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otras 4 horas. El producto se purificó de las impurezas poliméricas y de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel en una columna (30 cm x 30 cm) rellena con Sephadex LH-20 en metanol. La fracción de bajo peso molecular se concentró hasta 2,5 ml y el producto se precipitó en 40 ml de dietil éter. El producto se succionó, se lavó con una pequeña cantidad de dietil éter, y se secó al vacío hasta peso constante. El rendimiento fue de 210 mg del producto (78%) con el punto de fusión de 179 a 182°C. TLC (metanol:cloroformo:ácido acético 2:8:1): una mancha a Rf = 0,95. MALDI-TOF MS: 1023 (M+Na).

40 Ejemplo 2: Síntesis de un conjugado polimérico – Conjugado 1 – un copolímero de HPMA con MA-AH-NHN=DOX

Se preparó el copolímero de poli(HPMA-co-MA-AH-NHN=DOX)] mediante una copolimerización radical en solución de HPMA y MA-AH-NHN=DOX en metanol a 60°C.

45 Se disolvieron 840 mg de HPMA y 165 mg de MA-AH-NHN=DOX (18% en peso de los monómeros) en 5,7 ml de metanol y se añadieron 67 mg de ABIN (1,2% en peso) a la solución. Después de la filtración, se cargó la mezcla de polimerización, en una atmósfera de argón, en un reactor de polimerización (20 ml de volumen) situado en un termostato. Se introdujo nitrógeno por encima de la superficie durante varios minutos adicionales. La temperatura de la mezcla de polimerización se fijó a 60°C y la polimerización se desarrolló bajo agitación (50 rpm) en la atmósfera de nitrógeno. La mezcla de polimerización se extrajo del termostato después de 22 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente en un baño, y el polímero se aisló mediante precipitación con acetato de etilo (100 ml en total). El polímero precipitado se aisló mediante filtración a través de vidrio fritado S4. El precipitado se lavó con acetato de etilo y se secó a temperatura ambiente al vacío en una bomba de membrana durante aproximadamente 1 hora. El producto polimérico se purificó de impurezas de bajo peso molecular y el fármaco no unido utilizando cromatografía en gel en una columna rellena con Sephadex LH-20 en metanol. La fracción polimérica se atrapó, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío hasta un volumen de 5 ml, y el copolímero se aisló mediante precipitación con 50 ml de acetato de etilo. El producto se secó hasta peso constante.

El contenido de DOX total se determinó espectralmente. Se determinaron \overline{M}_w y \overline{M}_n mediante cromatografía líquida (LC AKTA) con detección basada en la dispersión de luz (detector DAWN DSP Multiangel, Wyatt).

5 Caracterización del fármaco polimérico: el rendimiento de la reacción de polimerización: 750 mg (75 %), contenido de DOX total 10,8% en peso, contenido de DOX libre 0,35% del contenido de DOX total, peso molecular $\overline{M}_w = 34000$, índice de polidispersidad $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,72$.

Ejemplo 3: Síntesis de un conjugado polimérico – conjugado 2 – un copolímero de HPMA con MA-AH-NHN=DOX

10 Se preparó el copolímero de poli(HPMA-co-MA-AH-NHN=DOX) mediante una copolimerización con radicales en solución de HPMA y MA-AH-NHN=DOX en metanol a 60°C mediante el mismo método que en el ejemplo 2, con la diferencia de que la composición de la mezcla de polimerización fue la siguiente: 770 mg de HPMA, 235 mg de MA-AH-NHN=DOX, 5,7 ml de metanol, 67 mg de ABIN (1,2% en peso). El aislamiento y purificación del producto se realizó mediante el mismo método que en el ejemplo 2. Caracterización del fármaco polimérico: el rendimiento de la reacción de polimerización: 740 mg (74%), contenido total de DOX 16,5% en peso, contenido de DOX libre 0,45% del contenido total de DOX, peso molecular $\overline{M}_w = 32800$, índice de polidispersidad
15 $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,78$.

Ejemplo 4: Síntesis de un conjugado polimérico – conjugado 2 – un copolímero de HPMA con MA-GFLG-NHN=DOX

20 Se preparó el copolímero de poli(HPMA-co-MA-GFLG-NHN=DOX) mediante una copolimerización con radicales en solución de HPMA y MA-GFLG-NHN=DOX en metanol a 60°C mediante el mismo método que en el ejemplo 2, con la diferencia de que la composición de la mezcla de polimerización fue la siguiente: 700 mg de HPMA, 183 mg de MA-GFLG-NHN=DOX, 5 ml de metanol, 64 mg de ABIN (1,3% en peso). El aislamiento y purificación del producto se realizó mediante el mismo método que en el ejemplo 2. Caracterización del fármaco polimérico: el rendimiento de la reacción de polimerización: 670 mg (76 %), contenido total de DOX 10,5% en peso, contenido de DOX libre 0,32% del contenido total de DOX, peso molecular $\overline{M}_w = 34800$, índice de polidispersidad
25 $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 1,82$.

Ejemplo 5: Liberación de doxorubicina de conjugados poliméricos injertados

30 Se midieron las cantidades de doxorubicina liberada de los conjugados poliméricos después de su incubación en un tampón fosfato con pH 5,0 (tampón fosfato 0,1 M que contenía NaCl 0,05 M), modelando el medio intracelular, y en un tampón fosfato con pH 7,4, modelando el medio del torrente sanguíneo. La cantidad de DOX liberada en la solución de incubación se determinó mediante HPLC (Shimadzu). En intervalos predeterminados, se tomaron muestras de 50 μ l de la solución de incubación y se analizaron en una columna TSKGel G 3000xl, con flujo isocrático de 0,5 ml/min de la fase móvil compuesta de la mezcla de metanol:tampón acetato de pH 6,5 (80:20 % en volumen). La cantidad de DOX se calculó a partir de las áreas de los picos de DOX libre y unida (detección UV-VIS a 488 nm). Después de la incubación de los conjugados (concentración de 5
35 mg/ml) en el medio fisiológico a 36°C (tampón fosfato, pH 7,4), sólo se libera una pequeña cantidad del fármaco (hasta el 10%/24 horas) (figura 4); en cambio, la tasa de liberación de DOX de los conjugados poliméricos injertados y, por tanto, la tasa de activación del fármaco citotóxico, es elevada en el medio ligeramente ácido a pH 5,0 (figura 3). Las tasas de liberación de fármaco a pH 7,4 y pH 5 de los conjugados poliméricos preparados mediante copolimerización directa utilizando 6-(metacriloilamino)

40 acilhidrazida-doxorubicinas son totalmente comparables con las detectadas para los conjugados de hidrazona preparados mediante una reacción polimérica análoga (reacción PA) [patente de Etrych]. Los resultados de las mediciones de la tasa de liberación *in vitro* del fármaco activo del portador polimérico en el medio que modela el medio sanguíneo (en el transporte del fármaco a través del organismo) y en el medio intracelular de la célula diana confirman lo apropiado de utilizar el agente citostático polimérico propuesto para terapias específicas para tumores.

45 Bibliografía:

Etrych, T., Jelinkova, M., Rihova, B. and Ulbrich K., New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH sensitive linkage. Synthesis, in vitro and in vivo biological properties. ("Nuevos copolímeros de HPMA que contienen doxorubicina unida mediante unión sensible al pH. Síntesis, propiedades biológicas in vitro e in vivo.") J. Controlled Release 73, 89-102 (2001).

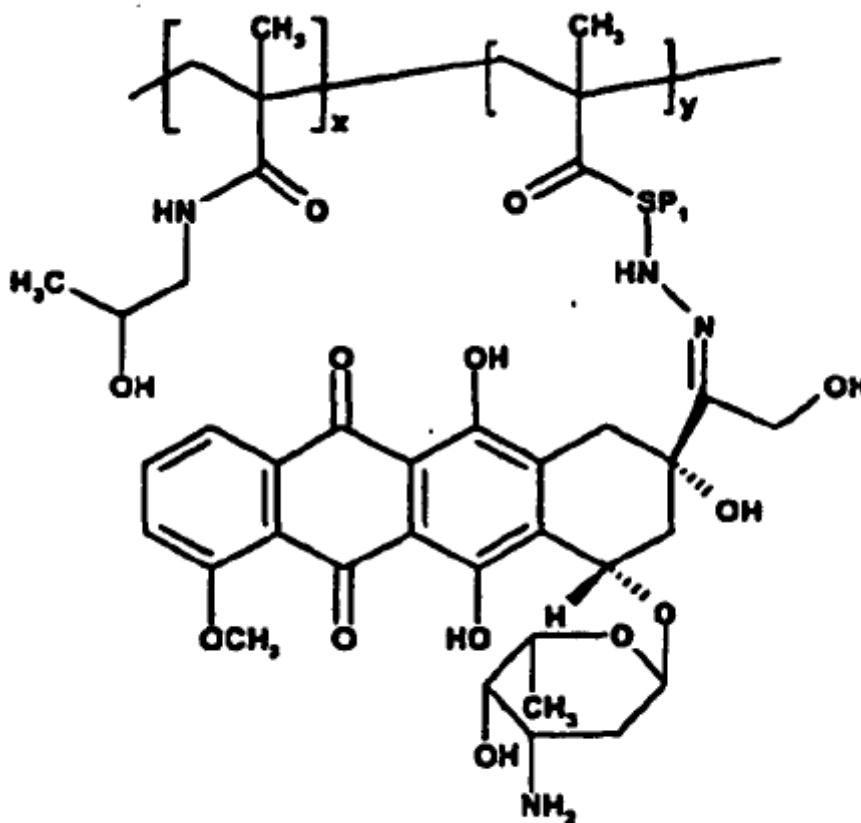
50 T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, K. Ulbrich, Synthesis of HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound via a Hydrazone Linkage. Effect of Spacer on Drug Release and in vitro Cytotoxicity. ("Síntesis de Copolímeros de HPMA que Contienen Doxorubicina Unida mediante una Unión Hidrazona. Efecto del Espaciador en la Liberación de Fármacos y Citotoxicidad in vitro.") Macromolecular Biosci. 2, 43-52 (2002)

Etrych T., Chytil P., Pechar M., Studenovsky M., Rihova B., Ulbrich K.: A method of preparing of polymeric

- conjugates of doxorubicin with pH-controlled release of the drug ("Método de preparación de conjugados poliméricos de doxorubicina con liberación del fármaco controlada por el pH."), CZ PV 2005-558
- 5 Gao, S., Lu, Z., Petri, B., Kopeckova, P., Kopecek, J.: Colon-specific 9-aminocamptothecin-HPMA copolymer conjugates containing a 1,6-elimination spacer ("Conjugados de 9-aminocamptotecina-copolímero de HPMA específicos de colon que contienen un espaciador de eliminación 1,6."). *J. Controlled Release* 110, 323-331 (2006).
- O. Hovorka, T. Etrych, M. Subr, J. Strohalm, K. Ulbrich, B. Rihova, Differences in the Intracellular Fate of Free and Polymer-Bound Doxorubicin. ("Diferencias en el Destino Intracelular de la Doxorubicina Libre y la Doxorubicina Unida a Polímero."). *J. Controlled Release* 80, 101-117 (2002).
- 10 J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. Lu, HPMA Copolymer-Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity, and Mechanism of Action. ("Conjugados de Copolímero de HPMA-Fármaco Anticancerígeno: Diseño, Actividad y Mecanismo de acción."). *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 50, 61 - 81 (2000).
- 15 M. Kovar, L.Kovar, V. Subr, T. Etrych, K. Ulbrich, T. Mrkvan, J. Loucka and B. Rihova, HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound by Proteolytically or Hydrolytically Cleavable Bond: Comparison of Biological Properties In Vitro. ("Copolímeros de HPMA que Contienen Doxorubicina Unida mediante un Enlace Proteolíticamente o Hidrolíticamente Separable: Comparación de Propiedades Biológicas In Vitro."). *J. Controlled Release* 99, 301-314 (2004).
- G.S. Kwon, *Polymeric Drug Delivery Systems, Series: Drugs and the Pharmaceutical Sciences* ("Sistemas de Liberación de Fármacos Poliméricos, Serie: Fármacos y la Ciencia Farmacéutica"), Vol. 148, Dekker, Marcel Incorporated, 2005.
- 20 B. Rihova, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelinkova, M. Stastny, O. Hovorka, M. Kovar, K. Ulbrich, Doxorubicin Bound to a HPMA Copolymer Carrier Through Hydrazone Bond is Effective also in a Cancer Cell Line with a Limited Content of Lysosomes. ("Doxorubicina Unida a un Portador de Copolímero de HPMA a Través de un Enlace Hidrazona es Eficaz también en una Línea de Células Cancerosas con un Contenido Limitado de Lisosomas."). *J. Controlled Release* 74, 225-232 (2001).
- 25 K. Ulbrich, V. Subr, J. Strohalm, D. Plocova, M. Jelinkova, B. Rihova, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules I. Synthesis and Physico-chemical Characterisation. (*Fármacos Poliméricos Basados en Conjugados de Macromoléculas Sintéticas y Naturales. Síntesis y Caracterización Físico-Química*). *J. Controlled Rel.* 64, 63-79 (2000)
- 30 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, HPMA Copolymers with pH-Controlled Release of Doxorubicin, In vitro Cytotoxicity and in vivo Antitumor Activity. ("Copolímeros de HPMA con Liberación de Doxorubicina Controlada por pH, Citotoxicidad In vitro y Actividad Antitumoral in vivo"). *J. Controlled Release* 87, 33-47 (2003).
- 35 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinkova, B. Rihova, Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with pH-Controlled Activation ("Conjugados de Polímero-Doxorubicina Dirigidos a Anticuerpo con Activación Controlada por pH."), *J. Drug Targeting* 12(8) (2004) 477-489]. (A)
- K. Ulbrich, V. Subr, Polymeric Anticancer Drugs with pH-Controlled Activation ("Fármacos Anticancerosos Poliméricos con Activación Controlada por pH"), *Adv. Drug Delivery Rev.* 56/7, 1025-1052 (2004) (B)
- 40 K. Ulbrich, T. Etrych, B. Rihova, M. Jelinkova, M. Kovar: pH Sensitive polymeric conjugates of an anthracycline cancerostatic for targeted therapy ("Conjugados poliméricos sensibles al pH de una antraciclina cancerostática para terapia dirigida"). CZ 293 787, CZ 293886.

REIVINDICACIONES

1.- Fármaco polimérico en forma de un conjugado de un copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida HPMA con doxorubicina, unido al polímero mediante espaciadores que contienen enlaces hidrazona hidrolíticamente separables, de fórmula I

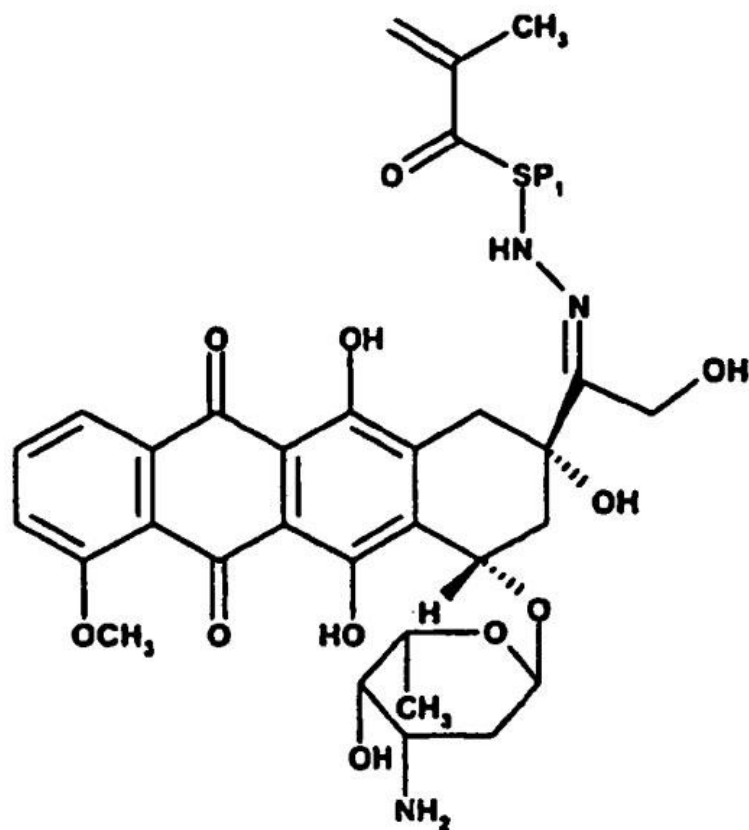


I

5 en la que SP_1 representa un espaciador aminoacilo seleccionado entre los grupos glicilo, glicilglicilo, β -alanilo, 6-aminohexanoilo, 4-aminobenzoilo o un acilo complejo derivado de los oligopéptidos GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly o GlyPheLeuGly, $x = 40$ a 335 , $y = 1$ a 25 .

que consiste en 90 a 99,5% molar de unidades de HPMA y de 10 a 0,5% molar de unidades comonoméricas que contienen doxorubicina.

10 2. Método para la preparación del conjugado polimérico de fórmula I, según la reivindicación 1, *caracterizado porque* la copolimerización directa del monómero que contiene doxorubicina de fórmula II



II

en la que SP_1 es tal como se define en la reivindicación 1,

con HPMA en una proporción molar de 90 a 99,5:10 a 0,5.

5 3. Método, según la reivindicación 2, *caracterizado porque* la polimerización se realiza en un medio de metanol, etanol, dimetilsulfóxido o dimetilformamida y se inicia con iniciadores de polimerización con radicales degradables con el calor.

4. Método, según la reivindicación 3, *caracterizado porque* los iniciadores de la polimerización con radicales se seleccionan del grupo que comprende azobis(isobutironitrilo) AIBN, azobis(ácido isocianoaléxico) ABIC y diisopropilpercarbonato DIP.

10 5. Método, según la reivindicación 4, *caracterizado porque* el iniciador se selecciona del grupo de AIBN o ABIC y la reacción tiene lugar a 50 a 60°C durante 15 a 24 horas.

6. Método, según la reivindicación 4, *caracterizado porque* se selecciona DIP como iniciador y la reacción tiene lugar entre 40 y 50°C durante 15 a 24 horas.

15 7. Método, según las reivindicaciones 2 a 6, *caracterizado porque* la unidad monomérica de fórmula II se prepara mediante la reacción de clorhidrato de doxorubicina con metacrilóil(aminoacil)hidrazinas de fórmula $MA-SP_1NHNH_2$, en la que MA es metacrilóilo y SP_1 es tal como se define en la reivindicación 1, en un disolvente orgánico en presencia de ácido acético.

20 8. Método, según la reivindicación 7, *caracterizado porque* en la mezcla de partida, la concentración de doxorubicina se selecciona del intervalo de 10 a 30 mg/ml y los intervalos de concentración de ácido acético se selecciona del intervalo de 35 a 60 mg/ml.

9. Método, según la reivindicación 8, *caracterizado porque* en la mezcla de reacción de partida, la concentración de clorhidrato de doxorubicina es 19 mg/ml y la de ácido acético es 51 mg/ml.

10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, *caracterizado porque* la reacción se realiza a una temperatura de 20 a 35°C durante 20 a 28 horas.

25 11. Método, según la reivindicación 10, *caracterizado porque* la reacción se realiza a 25°C durante

24 horas.

12. Método, según las reivindicaciones 7 a 11, *caracterizado porque*, después de completar la reacción, se utiliza un copolímero de HPMA con metacrililoil(aminoacil)hidrazida para eliminar el exceso de doxorubicina.

5 13. Método, según las reivindicaciones 7 a 12, *caracterizado porque* el medio de reacción está constituido por un disolvente orgánico seleccionado del grupo que comprende metanol, etanol anhidro, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida.

14. Método, según la reivindicación 13, *caracterizado porque* el medio de reacción está constituido por metanol.

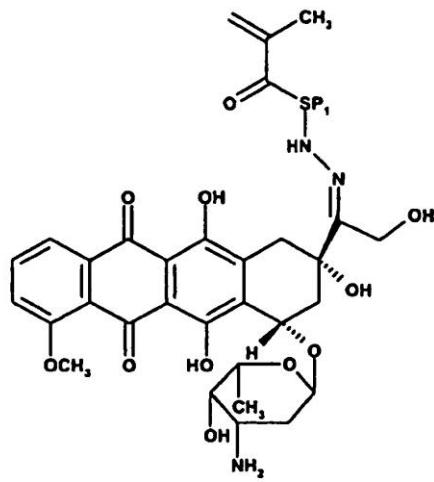


Figura 1. Esquema de la estructura de los derivados metacrilolados de aminoácidos y oligopéptidos, terminados con doxorubicina conectados a través del enlace hidrazona ((metacrilolilamino)-acilhidrazida-doxorubicina).

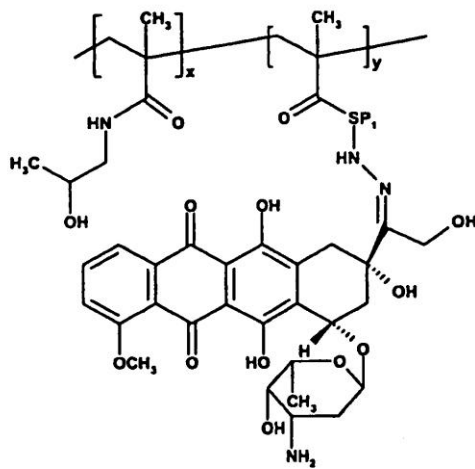


Figura 2. Esquema de la estructura del conjugado 1 - un copolímero de HPMA y un derivado metacrililado de aminoácidos y oligopéptidos, terminado con doxorubicina conectado a través del enlace hidrazona ($x = 40$ a 335 , $y = 1$ a 25).

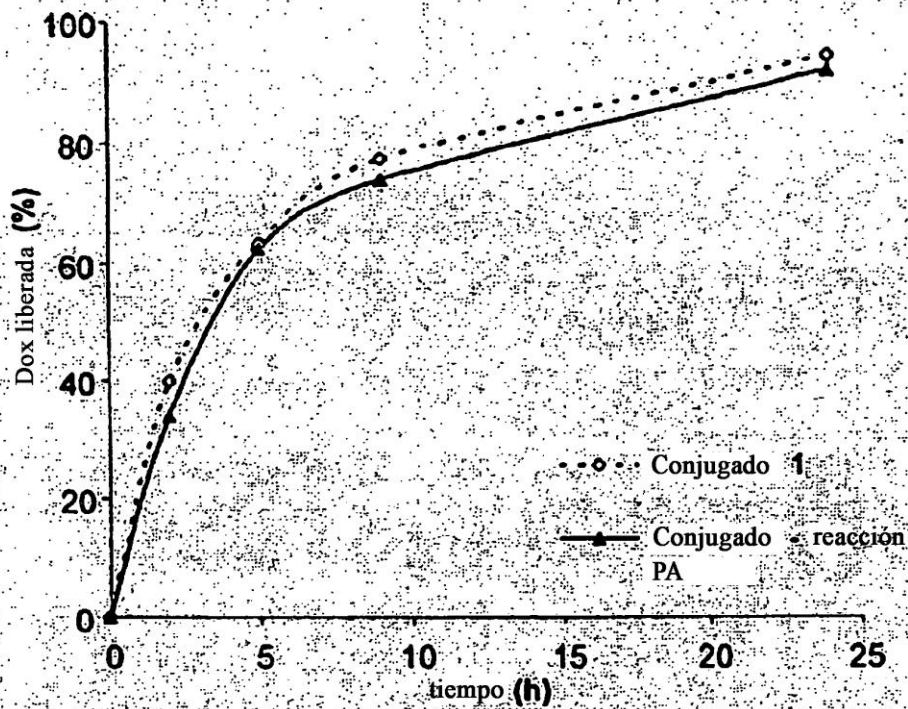


Figura 3. Gráfico de la tasa de liberación de DOX del conjugado polimérico 1 y del conjugado polimérico preparado a través de una reacción polimérica análoga (patente de Etrych) en un tampón con pH 5 (modelo de medio intracelular).

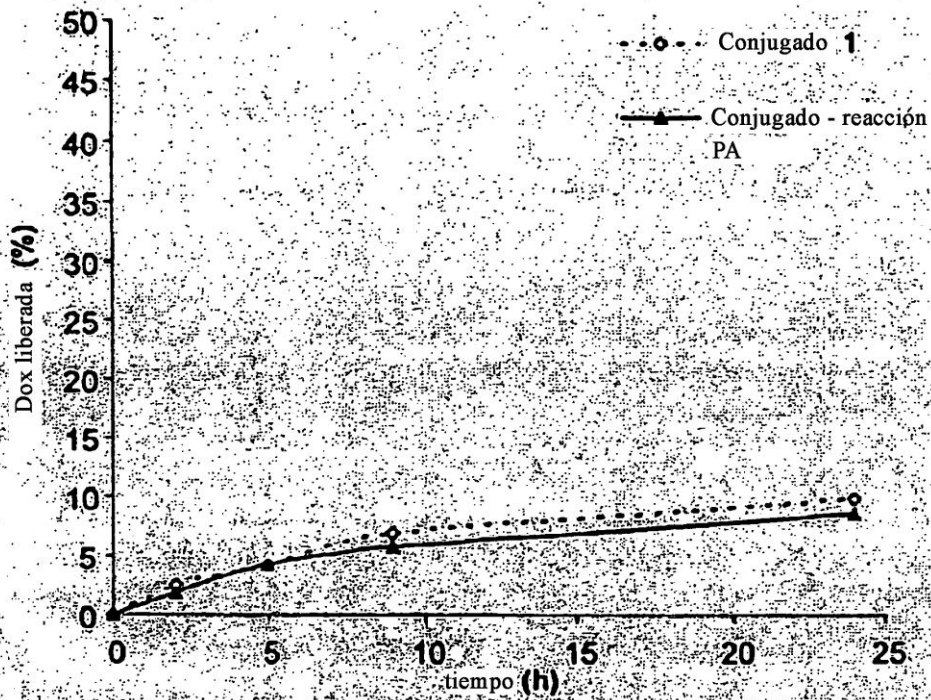


Figura 4. Gráfico de la tasa de liberación de DOX del conjugado polimérico 1 y del conjugado polimérico preparado a través de una reacción polimérica análoga (patente de Etrych) en un tampón con pH 7,4 (modelo de torrente sanguíneo).