



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 031**

51 Int. Cl.:
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06793626 .0**
96 Fecha de presentación : **19.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1937310**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Uso de conjugados de doxorrubicina con albúmina lactosaminada.**

30 Prioridad: **20.09.2005 IT MI05A1743**

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:
**Università di Bologna Dipartimento di Patologia
Via San Giacomo 14
40126 Bologna, IT
Università di Bologna**

72 Inventor/es: **Fiume, Luigi y
Di Stefano, Giuseppina**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 357 031 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

Uso de conjugados de doxorubicina con albúmina lactosaminada

El objeto de la presente invención es el uso de un conjugado de doxorubicina con albúmina humana lactosaminada para la preparación de una composición farmacéutica útil en el tratamiento de carcinomas hepatocelulares (*hepatocellular carcinoma*, HCC) que no expresan el receptor de la asialoglicoproteína (ASGP-R). El conjugado, que fue previamente preparado y estudiado únicamente para el tratamiento de HCC que expresan el ASGP-R, ahora ha mostrado inesperadamente poseer la potencialidad de un uso beneficioso también en el tratamiento de los HCC que no tienen el receptor. Por lo tanto, las composiciones que contienen el conjugado podrían ser administradas para el tratamiento de todas los HCC, sin necesidad de una biopsia tumoral preliminar para demostrar la presencia o la ausencia del receptor. En experimentos anteriores, acoplamos doxorubicina (DOXO) a albúmina humana lactosaminada (*lactosaminated human albumin*, L-HSA) con objeto de incrementar la actividad anticancerosa del fármaco y reducir sus efectos secundarios tóxicos en el tratamiento de aquellos carcinomas hepatocelulares cuyas células expresan el receptor para las asialoglicoproteínas (ASGP-R) (Di Stefano G, y col. Doxorubicin coupled to lactosaminated human albumin... *Dig Liver Dis* 2003; 35: 428-433; Fiume L, y col. Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin... *J Hepatol* 2005; 43: 645-652). Los HCC son tumores resistentes a los agentes quimioterapéuticos; la DOXO es activa en los HCC, pero muestra unas graves reacciones adversas a las dosis eficaces (Llovet JM. Updated treatment... *J Gastroenterol* 2005; 40: 225-235). Los efectos tóxicos de la DOXO son producidos principalmente en el corazón, la médula ósea y el intestino (Mazuè G, y col. Anthracyclines: a review... *Int J Oncol* 1995; 7: 713-26). El ASGP-R está presente únicamente en la superficie de los hepatocitos. Media en la captación y la degradación lisosómica de los péptidos terminados en galactosilo (Ashwell G, y col. Carbohydrate-specific... *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 531-534), que pueden ser usados como vectores para la administración selectiva del fármaco a las células hepáticas parenquimatosas (Fiume L, y col. Liver targeting of antiviral nucleoside analogs through the asialoglycoprotein receptor. *J Viral Hep* 1997; 4: 363-370). La L-HSA es una neoglicoproteína terminada en galactosilo que se ha usado con éxito como portador de fármacos hepatotropos en seres humanos (Torrani Cerenzia MR, y col. Adenine arabinoside monophosphate... *Hepatology* 1996; 23: 657-661; Zarski JP, y col. Efficacy and safety of L-HSA-ara-AMP... *J Hepatol* 2001; 34: 487-488). La DOXO se acopló a la L-HSA mediante un enlace hidrazona sensible a ácido que permite que la DOXO sea liberada intracelularmente desde el portador en los compartimentos endosómico y lisosómico (Greenfield RS, y col. Evaluation *in vitro* of adriamycin... *Cancer Res* 1990; 50: 6600-6607). (El procedimiento de conjugación está cubierto por una patente depositada por la Universidad de Bolonia (PCT/IT2005/000257)). El ASGP-R está conservado en las células neoplásicas de la mayoría de los HCC humanos bien diferenciados (*well differentiated*, WD), mientras que no es expresado en las células de la mayoría de los HCC poco diferenciados (*poorly differentiated*, PD) (Hyodo I, y col. Distribution of asialoglycoprotein receptor... *Liver* 1993; 13: 80-85; Trerè D, y col. The asialoglycoprotein receptor... *Br J Cancer* 1999; 81: 404-408; Sawamura T, y col. "Hyperasialoglycoproteinemia in patients..." *Gastroenterology* 1984; 87: 1217-1221). La presencia o la ausencia del ASGP-R en los HCC humanos puede determinarse inmunohistoquímicamente usando biopsias con agujas o fragmentos procedentes de tumores extirpados quirúrgicamente. En ratas con HCC inducidos por dietilnitrosamina (DENA) se encontró la capacidad de los tumores de internalizar la L-HSA a través del ASGP-R en todos los 7 HCC WD estudiados, en 4 de los 5 tumores moderadamente diferenciados (*moderately differentiated*, MD), mientras que se observó una baja capacidad de captación de la L-HSA sólo en 2 de los 5 HCC PD (Di Stefano G, y col. Enhanced uptake of lactosaminated... *Liver Int* 2005; 25: 854-860).

En experimentos sobre la distribución de una L-HSA-DOXO radioactiva en HCC y órganos de ratas, realizamos dos observaciones inesperadas y relacionadas:

1 - Los HCC PD internalizan cantidades de conjugado tres veces mayores que las de L-HSA

2 - En todas las formas de HCC, independientemente de su grado de diferenciación, el conjugado producía altas concentraciones de DOXO, 5-8 veces mayores que las medidas en intestino y corazón.

Materiales y Métodos50 *Síntesis y caracterización de la L^[14C]HSA-DOXO*

Se obtuvo albúmina humana (HSA) de Kedrion (Lucca, Italia). Se filtró en gel con Sephacryl S-200 HR (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) y el monómero (> 90% del material de partida) se recogió y usó. La HSA se marcó con [¹⁴C]-sacarosa. La [¹⁴C]-sacarosa es un marcador radioactivo que permanece dentro de las células en las que penetra, permitiendo una determinación exacta de la captación de proteínas en los tejidos (Pittman RC, y col. "Radiolabeled sucrose..." *J Biol Chem.* 1979; 254: 6876-6879). Se diluyó [¹⁴C]-sacarosa (500 mCi/mmol, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) hasta una actividad específica de 3,2 x 10⁵ dpm/μg. El acoplamiento de la [¹⁴C]-sacarosa a la HSA se realizó según Pittman RC y col. ("Radiolabeled sucrose..." *J Biol Chem.* 1979; 254: 6876-6879). Dado que este procedimiento provoca una oligomerización de la proteína, la HSA marcada se cromatografió en una columna Sephacryl S200 HR sobre gel, y se recogió

el monómero (70% de la preparación). La proporción molar [^{14}C]-sacarosa/HSA se determinó midiendo la radioactividad y midiendo la proteína según Lowry OH y col. ("Protein measurement..." J Biol Chem 1951; 193: 265-275), y era de 0.2. Se acopló α -lactosa (Sigma) a la [^{14}C]HSA mediante una aminación reductora (Wilson G. "Effect of reductive lactosamination..." J Biol Chem 1978; 253: 2070-2072). La proporción molar lactosa/[^{14}C]HSA se determinó midiendo el azúcar según Dubois M y col. ("Colorimetric method for determination..." Anal Chem 1956; 28: 350-356) y era de 26. El acoplamiento de la DOXO a la L-[^{14}C]HSA se realizó usando el derivado (6-maleimidocaproyl)hidrazona del fármaco (DOXO-EMCH), sintetizado según Willner D, y col. ("(6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative..." Bioconj Chem 1993; 4: 521-527). El acoplamiento de la DOXO-EMCH con la L-[^{14}C]HSA se llevó a cabo según Di Stefano G, y col. ("A novel method for coupling..." Eur J Pharm Sci 2004; 23: 393-397), adjuntado aquí como referencia, pero permitiendo que los compuestos reaccionen a 20°. Las proporciones molares DOXO/L-[^{14}C]HSA se calcularon midiendo la concentración de proteínas según Lowry OH, y col. (Protein measurement... J Biol Chem 1951; 193: 265-275) y la DOXO mediante absorbancia a λ_{495} [λ_{495} (pH 7,4) de DOXO-EMCH = $9250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Era de 5,8 (había 1 mg de DOXO contenida en 24 mg de conjugado; 24 mg de conjugado contenían 22,5 mg de L-HSA).

15 *Inducción de HCC en ratas; distribución del conjugado y concentraciones de DOXO en tumores y órganos.*

Se usaron ratas Wistar macho. Se obtuvieron de Harlan Italia (Udine, Italia) y se mantuvieron en una instalación para animales en el Departamento de Patología Experimental, Bolonia. Los protocolos de los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de La Universidad de Bolonia.

20 Los HCC fueron inducidos mediante dietilnitrosamina (DENA) administrada en el agua de bebida (100 mg/l) durante 8 semanas. Entre seis y ocho semanas después del último día de la administración de la DENA, a los animales se les inyectaron por vía i.v. los siguientes compuestos: L-[^{14}C]HSA (22,5 $\mu\text{g/g}$), L-[^{14}C]HSA-DOXO (24 $\mu\text{g/g}$, correspondientes a 22,5 $\mu\text{g/g}$ de L-[^{14}C]HSA y a 1 $\mu\text{g/g}$ de DOXO) y DOXO libre (1 $\mu\text{g/g}$). Los compuestos fueron inyectados en la vena dorsal del pene, en un volumen de 10 $\mu\text{l}/10 \text{ g}$ de peso corporal, bajo anestesia con isoflurano. Se usaron cuatro ratas para cada compuesto. Cuatro horas después de la inyección, los animales fueron sacrificados bajo anestesia con isoflurano. Los órganos se extrajeron rápidamente y se congelaron, y los nódulos neoplásicos fueron diseccionados con precisión desde el hígado circundante. Una parte de cada nódulo tumoral se congeló; la otra parte se fijó en formalina al 10% y se procesó para histología. Las muestras de órganos y nódulos congelados se usaron para medir la radioactividad y la determinación de los niveles de DOXO. La DOXO se midió según Bots AM, y col. (Analysis of adriamycin... J Chromatogr 1983; 272: 421-427), con modificaciones (Di Stefano G, y col. Doxorubicin coupled to lactosaminated... Dig Liver Dis 2003; 35: 428-433).

Resultados

35 En ratas, la DENA inducía formas bien, moderadamente y poco diferenciadas de HCC (HCC WD, MD y PD, respectivamente). Mostraban características histológicas superponibles a las de los HCC humanos. Según describen Di Stefano G y col. ("Enhanced uptake of lactosaminated..." Liver Int 2005; 25: 854-860), en los HCC WD los hepatocitos neoplásicos eran isomorfos con citoplasma eosinófilo; eran similares a sus contrapartidas no neoplásicas con un patrón trabecular y espacios vasculares interpuestos. En los HCC PD, el tejido tumoral mostraba un aspecto sólido; las células neoplásicas eran polimorfas con un citoplasma basófilo. Los HCC MD mostraban un aspecto histológico intermedio entre el de los HCC WD y el de los PD. La distribución de la L-[^{14}C]HSA y de la L-[^{14}C]HSA-DOXO en los HCC, corazón e intestino se aporta en la Tabla 1. De acuerdo con Di Stefano G y col. ("Enhanced uptake of lactosaminated..." Liver Int 2005; 25: 854-860), en cuatro de los seis HCC PD examinados, la L-[^{14}C]HSA alcanzaba unas concentraciones no superiores a las medidas en corazón e intestino, órganos que no expresan el ASGP-R ($\text{dpm/g/SA} = 9,1 \pm 0,1$). El conjugado L-[^{14}C]HSA-DOXO era internalizado por los HCC PD en unas cantidades cuatro veces mayores que las de la L-[^{14}C]HSA ($p = 0,004$, según la prueba t de Student) y se introducía en todos los siete HCC PD examinados en unas cantidades al menos siete veces superiores a las captadas por el corazón e intestino.

50 Un hallazgo importante fue que en los animales inyectados con el conjugado, las concentraciones de DOXO eran más de ocho y cinco veces superiores a las medidas en corazón e intestino, respectivamente ($p = 0,006$). Por el contrario, en los animales inyectados con el fármaco libre, las concentraciones de DOXO medidas en corazón e intestino eran mayores a las determinadas en los HCC (Tabla 2).

55 En conclusión, al contrario que la DOXO no conjugada, la L-HSA-DOXO produce en todos los HCC concentraciones de fármaco superiores a las de corazón e intestino, órganos diana de la acción tóxica de la DOXO, independientemente del grado de diferenciación de los tumores y de su capacidad de internalizar la L-HSA. Como consecuencia, el conjugado, preparado anteriormente para incrementar la eficacia antineoplásica y para reducir la toxicidad de la DOXO en el tratamiento de los HCC que conservan la capacidad de internalizar proteínas que exponen residuos de galactosilo, sobre la base de las presentes observaciones, muestra la potencialidad de mejorar el índice quimioterapéutico de la DOXO en el tratamiento de todas las formas de HCC, incluyendo las poco diferenciadas, que muestran poca o ninguna capacidad de acumular L-HSA con respecto a los tejidos extrahepáticos.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es el suministro de L-SA-DOXO y particularmente de L-HSA-DOXO para la quimioterapia de los HCC que no expresan el ASGP-R.

TABLA 1

5 **Distribución de L-[¹⁴C]HSA y L-[¹⁴C]HSA-DOXO en HCC con diferentes grados de diferenciación, en corazón e intestino**

Compuesto	dpm/g/SA ^{a)}				
	HCC WD	HCC MD	HCC PD	Corazón	Intestino
L-[¹⁴ C]HSA ^{b)}	178,3 ± 12,4 (6) ^{d)}	85,6 ± 4,4 (5)	32,6 ± 14,9 (6)	8,7 ± 0,9	8,9 ± 1,5
L-[¹⁴ C]HSA-DOXO ^{c)}	180,9 ± 27,8 (7)	135,5 ± 19,3 (10)	124,8 ± 20,2 (7)	9,0 ± 0,8	9,8 ± 0,8

Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos. Las ratas fueron sacrificadas 4 h después de la inyección i.v. de los compuestos. Para cada compuesto se usaron 4 animales. Los datos son los valores promedio ± error estándar.

- 10 a) SA = Actividad Específica (*Specific Activity*)
 b) Se inyectó L-[¹⁴C]HSA a la dosis de 22,5 µg/g.
 c) Se inyectó L-[¹⁴C]HSA-DOXO a la dosis de 24 µg/g (24 µg de conjugado contenían 22,5 µg de L-[¹⁴C]HSA y 1 µg de DOXO).
 d) Número de HCC examinados

15 **TABLA 2**

Concentraciones de DOXO en HCC con diferentes grados de diferenciación, en corazón e intestino, medidas tras la administración de L-[¹⁴C]HSA-DOXO y DOXO libre

Compuesto	nmoles de DOXO/g ^{a)}				
	HCC WD	HCC MD	HCC PD	Corazón	Intestino
L-[¹⁴ C]HSA-DOXO ^{b)}	10,2 ± 2,0 (9) ^{d)}	7,6 ± 0,9 (14)	6,8 ± 1,1 (8)	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2
DOXO ^{c)}	3,4 ± 0,6 (5)	3,1 ± 0,4 (4)	3,6 ± 0,4 (8)	4,7 ± 0,3	4,2 ± 0,6

20 Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los datos son los valores promedio ± error estándar.

- a) En los animales inyectados con el conjugado, la DOXO se midió como fármaco libre, es decir, liberada desde el portador L-HSA dentro de las células.
 b) La L-[¹⁴C]HSA-DOXO se inyectó a la dosis de 24 µg/g (24 µg de conjugado contenían 1 µg

de DOXO).

- c) La DOXO se inyectó a la dosis de 1 µg/g
- d) Número de HCC examinados

REIVINDICACIONES

1. Uso de un conjugado de doxorubicina con albúmina lactosaminada para la preparación de un medicamento para el tratamiento de los carcinomas hepatocelulares que no expresan el receptor de las asialoglucoproteínas.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la administración del conjugado no comprende la demostración preliminar de la presencia o la ausencia del receptor de las asialoglucoproteínas en las células tumorales.
3. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicha albúmina lactosaminada es albúmina humana lactosaminada.
- 10 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicho medicamento es administrable mediante vía parenteral.
5. Uso según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho medicamento es administrable mediante vía intravenosa, mediante bolo o mediante infusión.
- 15 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicho medicamento es una disolución acuosa.
7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha disolución acuosa contiene excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.