

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 381**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2003 E 03723958 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1494662**

54 Título: **Conjugados del copolímero de ácido metacrílico-hpma-tnp-470 y sus usos**

30 Prioridad:

11.04.2002 US 371791 P

30.09.2002 US 414705 P

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

15.03.2013

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)**

**300 LONGWOOD AVENUE
BOSTON MASSACHUSETTS 02115, US**

72 Inventor/es:

**SATCHI-FAINARO, RONIT y
FOLKMAN, JUDAH**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 398 381 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

Conjugados del copolímero de ácido metacrílico-HPMA-TNP-470 y sus usos

5 En los últimos años, se ha hecho evidente que la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares de la vasculatura preexistente, es importante no sólo en procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario, ciclo reproductivo femenino, curación de heridas y regeneración de tejidos y órganos, sino también en procesos patológicos tales como la progresión tumoral y metástasis¹. La angiogénesis se reconoce ahora como un proceso crítico para todos los tumores malignos^{2,3}. Como resultado, la célula endotelial microvascular, que se recluta por los tumores, se ha convertido en un importante segundo objetivo en la terapia del cáncer. Se acepta ampliamente que la célula endotelial objetivo, a diferencia de las células tumorales propiamente dichas, es genéticamente estable¹. Los agentes antiangiogénicos han surgido recientemente como una nueva clase de fármacos; sin embargo, aún no se han dilucidado completamente los medios óptimos para usar estos agentes solos o en conjunto con los sistemas de entrega de fármacos y con la quimioterapia convencional.

15 La hipótesis de que el crecimiento del tumor es dependiente de angiogénesis se apoya en la evidencia biológica y farmacológica⁴ y se confirma con la evidencia genética^{3,5-7}. Ambos tipos de evidencia proporcionan una base científica para las actuales pruebas clínicas de inhibidores de la angiogénesis. La angiogénesis tumoral aumentada^{4,8} y niveles elevados de factores proangiogénicos tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF/VPF)^{8,9}, factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF)⁸, e interleuquina-8 (IL-8)¹⁰ se correlacionan con una supervivencia disminuida y el riesgo aumentado de recaída en los estudios de pacientes con tumores sólidos malignos. La importancia de la angiogénesis se apoya además por la observación de que los agentes antiangiogénicos inhiben el crecimiento tumoral en una variedad de modelos animales.

25 En los Estados Unidos existen actualmente más de 30 inhibidores de la angiogénesis en diversos ensayos clínicos para el cáncer de etapa tardía. Uno de estos inhibidores de la angiogénesis, el O-(cloracetil-carbamoil) fumagilol (TNP-470), es un análogo sintético de bajo peso molecular de la fumagilina¹¹, un compuesto secretado por el hongo *Aspergillus fumigatus* fresenius. El TNP-470 es un potente inhibidor endotelial *in vitro*¹². Recientemente, TNP-470 se probó como un potencial nuevo agente anticáncer. En modelos animales, el TNP-470 tiene el más amplio espectro anticáncer que cualquier agente conocido^{4,13}. El TNP-470 inhibió el crecimiento de tumores murinos hasta 91%, tumores humanos hasta 100% y tumores metastásicos hasta 100% en ratones (revisión en la referencia¹³). En la mayoría de los estudios, los ratones se trataron a la misma dosis óptima de 30 mg/kg por vía subcutánea en días alternos. En los ensayos clínicos TNP-470 mostró evidencia de actividad antitumoral cuando se usó como un agente sencillo, con una serie de respuestas objetivas reportadas con tumores malignos recidivantes y refractarios¹⁴⁻¹⁶. Además, se mostró prometedor cuando se usó en conjunto con la quimioterapia convencional^{17,18}. Sin embargo, muchos pacientes experimentan neurotoxicidad (malestar general, convulsiones raras, astenia, ansiedad y disforia)^{16,17,19,20} en las dosis donde se observó la actividad antitumoral. Debido a la neurotoxicidad dosis-limitante, TNP-470 se probó usando múltiples regímenes de dosificación, pero estos intentos de limitar su toxicidad no tuvieron éxito. En pocas excepciones, se observó pérdida de peso o fracaso para ganar peso en animales que recibieron TNP-470²¹, y dos informes indicaron una disminución en el peso esplénico^{22,23}. Por lo tanto, modificaciones de TNP-470 que pueden retener o aumentar su actividad mientras que reducen su toxicidad son altamente deseables.

45 Yashukawa y otros (*Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 1999, Vol. 40 (núm. 11), páginas 2690-2696), describen el efecto del TNP-470-conjugado con PVA en la proliferación *in vitro* de las células endoteliales y sobre la neovascularización coroidea experimental (CNV) *in vivo*.

50 Satchi y otros (*British Journal of Cancer*; 2001, Vol. 85 (núm. 7), páginas 1070-1076), describen la terapia de profármaco enzimático dirigida al polímero usando el profármaco polimérico del copolímero N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)-Gly-Phe-Leu-Gly-doxorrubicina conjugado con PK1 como profármaco modelo, y el copolímero de HPMA-catepsina B como un modelo para la activación del conjugado enzimático.

55 El documento WO-03/086178-A se refiere a métodos para disminuir o inhibir trastornos asociados con la hiperpermeabilidad vascular y con métodos para tamizar compuestos que afectan la permeabilidad, angiogénesis y estabilizan uniones herméticas.

Sumario de la invención

60 La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a los conjugados de polímeros solubles en agua y o-(cloracetil-carbamoil) fumagilol (TNP-470) y el uso de estos conjugados como portadores específicos intracelulares del TNP-470 en los vasos del tumor. La presente invención se refiere además al uso de estos conjugados para reducir la neurotoxicidad del TNP-470. El polímero tiene un peso molecular en el intervalo de 15 kDa a 40 kDa.

Los polímeros son copolímeros HPMA. Los copolímeros HPMA son portadores biocompatibles, no inmunogénicos y no tóxicos, que posibilitan la entrega específica en las células endoteliales del tumor superando las limitaciones de las toxicidad asociada con el fármaco (Duncan, y otros, Hum Exp Toxicol, 17:93-104 (1998)). Además, su distribución en el cuerpo está bien caracterizada y se conocen por acumularse selectivamente en el sitio del tumor debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) (Maeda, y otros, J Controlled Release, 65:271-284 (2000)). El conjugado puede incluir también una porción de orientación para dirigir el conjugado a los sitios de proliferación de células endoteliales o células de cáncer o a receptores o marcadores específicos asociados con las células proliferación de células endoteliales.

Los datos presentados en la presente descripción demuestran que TNP-470 conjugado con un copolímero HPMA: (i) evita niveles máximos del fármaco en la circulación (ii) evita la penetración de TNP-470 en el líquido cefalorraquídeo y previene así el problema de la neurotoxicidad; (iii) prolonga su vida media; (iv) facilita la acumulación de TNP-470 en los tejidos involucrados con la neovascularización; (v) convierte a TNP-470 en un inhibidor de la angiogénesis altamente eficaz y ampliamente útil. Sorprendentemente descubrimos también que la conjugación de TNP-470 con HPMA resulta en una composición soluble en agua.

La presente invención se refiere además al uso de los conjugados en los métodos para disminuir la neurotoxicidad de TNP-470. La enfermedad angiogénica susceptible al tratamiento con la presente invención incluye pero no se limita a retinopatía diabética, degeneración macular, fibroplasia retrolental, tracoma, glaucoma neovascular, psoriasis, angio-fibromas, inflamación inmune y no inmune, formación capilar dentro de las placas ateroscleróticas, hemangiomas, reparación de herida excesiva, tumores sólidos, metástasis, sarcoma de Kaposi

Otros aspectos de la invención se describen *infra*.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A ilustra la estructura del copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-etilendiamina-TNP-470. La Figura 1B muestra la liberación *in vitro* de TNP-470 a partir del copolímero HPMA en presencia (-■-) y ausencia (-◆-) de catesina B.

La Figura 2A muestra la inhibición de la proliferación de BCE *in vitro* después de 72 h. TNP-470 (-▲-) y el copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-en-TNP-470 (-■-) tuvieron un efecto citostático similar sobre la proliferación de las células endoteliales inducida por bFGF a dosis inferiores a 1 µg/ml y efecto citotóxico a dosis superiores a 1 µg/ml. La línea con puntos (- - -) representa la proliferación de las células BCE inducida por bFGF y la línea sólida (-) representa la proliferación de células BCE en la ausencia de bFGF. La Figura 2B muestra el anillo aórtico de pollo en el ensayo de germinación endotelial. El efecto de TNP-470 (panel central) y copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-en-TNP-470 (panel derecho) se muestran a 100 pg/ml de dosis equivalente de TNP-470, y un anillo aórtico de pollo control (panel izquierdo) con abundante germinación.

La Figura 3A muestra una representación esquemática del modelo de hepatectomía. Los hígados no tratados se regeneran en 8 días, pero no se regeneran cuando se tratan con TNP-470 30 mg/kg/días alternos por vía subcutánea. La Figura 3B muestra que el TNP-470 libre (columnas con rayas), inhibió la regeneración del hígado cuando se usó a 30 mg/kg/días alternos por vía subcutánea. Sin embargo, no inhibió la regeneración del hígado en otros esquemas de dosificación. El TNP-470 conjugado (columnas sólidas) inhibió la regeneración del hígado a 30 mg/kg/días alternos por vía subcutánea o 60 mg/kg/cada 2 días por vía subcutánea o incluso a una sola dosis de 120 mg/kg/día de operación por vía subcutánea en comparación con el grupo control regenerado (columnas con puntos). La Figura 3C muestra que el TNP-470 libre (-●-) causa retardo en el desarrollo de ratones recién nacidos, pero no afectó el peso corporal cuando se usó en la forma conjugada (-▲-) similar a los ratones del control (-■-). Las flechas representan los días de tratamiento. Los datos representan la media±SE, n=9 de ratones por grupo.

La Figura 4 muestra la actividad antitumoral medida usando ratones SCID machos con melanoma humano A2058. La Figura 4A muestra el efecto de TNP-470 (-●-); copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-en-TNP-470 (-▲-); y ratones del control (-■-) en los tumores. Los datos representan la media ± SE, n=8 de ratones por grupo. Los valores de P <0.05 se marcaron como *, P<0.03 como **, P<0.01 como ***. La Figura 4B muestra los ratones SCID y los tumores extirpados que se correlacionan con el panel (A) en el día 8 de tratamiento. La Figura 4C muestra la tinción de H&E de los tumores extirpados en el día 8 a partir de los diferentes grupos de animales con elevada o poca alimentación.

La Figura 5 muestra la actividad antitumoral medida usando ratones C57 machos con LLC. La Figura 5A muestra el efecto de TNP-470 a 30 mg/kg/días alternos por vía subcutánea (-●-); HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-en-TNP-470 a 30 mg/kg/días alternos por vía subcutánea (-▲-) sobre el crecimiento tumoral; se muestran también los ratones del control (-■-). Los datos representan la media ± SE, n=10 ratones por grupo. La Figura 5B muestra ratones C57 representativos que se correlacionan con (A) en el día 10 después del tratamiento. La Figura 5C muestra el

crecimiento de dosis del copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly -en-TNP-470: a 30 (-▲-), a 60 (-●-) y a 90 mg/kg/días alternos por vía subcutánea (-◆-) y se muestran los ratones de control (-■-). Los datos son la media ± SE, $n=10$ ratones por grupo. La Figura 5D muestra los ratones C57 que se correlacionan con (C). Los valores de $P<0.05$ se marcaron como *, $P<0.03$ como **, $P<0.01$ como ***.

5

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de Miles.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los conjugados de polímero y copolímero de TNP-470.

10

De acuerdo con la presente invención, el TNP-470 se enlaza a un polímero soluble en agua degradable o no degradable que tiene un peso molecular en el intervalo de 100 Da a 800 kDa. Los componentes de la cadena principal polimérica comprenden el copolímero de hidroxipropil(met)acrilamida-ácido metacrílico. El polímero comprende un peso molecular mayoritario en el intervalo de 15 a 40 kDa.

15

El TNP-470 y el polímero se conjugan mediante el uso de un enlazador que comprende al menos un enlace peptídico escindible. Con mayor preferencia, el enlace peptídico es capaz de escindirse por enzimas celulares pre-seleccionadas, por ejemplo, las que se encuentran en los lisosomas de células cancerosas o células endoteliales en proliferación.

20

La escisión del enlazador del conjugado resulta en la liberación del TNP-470 activo. Así el TNP-470 se debe conjugar con el polímero de manera que no se modifica la actividad del agente. El enlazador comprende al menos un enlace peptídico escindible. Preferentemente, el enlazador es un grupo oligopéptido escindible por enzima que comprende preferentemente unidades de aminoácidos suficientes para permitir la unión y escisión específica por una enzima celular seleccionada. Preferentemente, el enlazador es al menos dos aminoácidos de largo, con mayor preferencia al menos tres aminoácidos de largo.

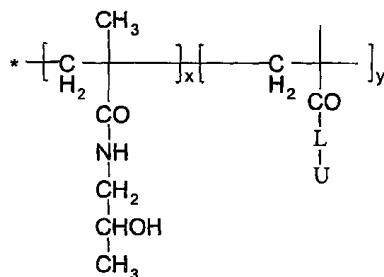
25

Los polímeros para usar con la presente invención son los copolímeros HPMA con ácido metacrílico con grupos de largos oligopéptidos unidos a través de enlaces peptídicos al ácido metacrílico con grupos carboxílicos terminales activados tales como derivados de paranitrofenilo o etilendiamina.

30

El esqueleto polimérico comprende un copolímero del copolímero hidroxipropil(met)acrilamida (HPMA). El HPMA antes de fijarse al TNP-470 tiene la estructura que se muestra a continuación:

35



40

y puede estar en el intervalo de 0.01-100 y x puede estar en el intervalo de 0 a 99.99 y está preferentemente en el intervalo de 0.04-20 y x está preferentemente en el intervalo de 80-99.96. Preferentemente L es un grupo oligopéptido que contiene entre 2 y 10 porciones de péptido, con mayor preferencia 3 ó 4.

45

En una modalidad más preferida, L es un enlace Gly-Phe-Leu-Gly. En una modalidad, U es un grupo ONp, en donde Np es un grupo p-nitrofenilo. Preferentemente y está en el intervalo de 0.3 a 15 y x está en el intervalo de 99.7 a 85. Con la máxima preferencia, y está en el intervalo de 5-10 y x está en el intervalo de 90-95. La cadena principal polimérica es el copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-etilendiamina que tiene los valores para x e y como se definió anteriormente.

50

En una modalidad más preferida el copolímero HPMA conjugado con TNP-470 tiene la estructura que se muestra en la Figura 1A.

Los polímeros de HPMA y sus usos se describen en el documento WO 01/36002.

En otra modalidad, el conjugado es un conjugado de liposoma/TNP-470. Preferentemente, el conjugado es un TNP-470 pegilado liposomal. Un conjugado ilustrativo comprende:

- 5 a) TNP-470;
 b) sal sódica de N-(carbonil-metoxipolietilen glicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina;
 c) fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada;
 d) colesterol;

10 La histidina, ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio, sulfato de amonio, y sacarosa; en donde la relación de porcentaje en peso de a: b: c: d es de aproximadamente 1.0: 1.60: 4.80: 1.60 mg/ml respectivamente.

15 Mientras que la conjugación del agente antiangiogénico puede depender de su orientación en un tumor sólido, u otros sitios de angiogénesis activa, principalmente después del EPR, puede ser deseable fijar ligandos que permiten la orientación activa. Un ligando de orientación preferido se dirige a la integrina un V β 3 y contiene la secuencia de tripéptido RGD. Los anticuerpos o ligandos dirigidos a los receptores celulares u otras moléculas negativamente reguladas presentes en la superficie celular se pueden usar también. Ver, por ejemplo 28.

20 El conjugado de la presente invención es útil en la inhibición de la función angiogénica de las células endoteliales tanto in vitro como in vivo. De particular interés es la prevención o inhibición de la diferenciación de células endoteliales en las estructuras capilares. Las células endoteliales susceptibles a la inhibición por el conjugado están presentes en varios sitios de un mamífero e incluyen, pero no se limitan a dermis, epidermis, endometrio, retina, sitios quirúrgicos, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, sistema reproductivo, piel, hueso, músculo, sistema endocrino, cerebro, sistema linfático, sistema nervioso central, sistema respiratorio, cordón umbilical, tejido de la
 25 mama, tracto urinario. El método de tratamiento usando el conjugado de la presente invención es particularmente útil en la prevención o inhibición de la angiogénesis por las células endoteliales en sitios de inflamación y tumorigénesis.

30 El conjugado es particularmente útil en métodos para inhibir la angiogénesis en un sitio de la tumorigénesis en un mamífero. El conjugado administrado en dichos sitios previene o inhibe la formación de vasos sanguíneos en el sitio inhibiendo de ese modo el desarrollo y crecimiento del tumor. Los tumores que se pueden prevenir o inhibir mediante la prevención o inhibición de la angiogénesis con el conjugado incluyen, pero no se limitan al melanoma, metástasis, adenocarcinoma, sarcomas, timoma, linfomas, tumores de pulmón, tumores de hígado, tumores de colon, tumores renales, linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemias, tumores uterinos, tumores de mama, tumores de próstata, tumores renales, tumores ováricos, tumores pancreáticos, tumores cerebrales, tumores testiculares, tumores óseos, tumores de músculo, tumores de la placenta, tumores gástricos.

35 Proporcionar a un mamífero con el conjugado, preferentemente a un ser humano, la dosis de conjugado administrada variará en dependencia de factores tales como edad del mamífero, peso, altura, sexo, condición médica general, historial médico anterior, progresión de la enfermedad, carga tumoral, vía de administración, formulación y similares. Por ejemplo, una dosis adecuada del conjugado para un mamífero que necesita del tratamiento como se describe en la presente descripción está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg de TNP-470 por kilogramo de peso corporal.

40 La vía de administración puede ser intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP), intratecal (IT), intrapleurales, intrauterina, rectal, intratumoral vaginal, tópica, y similares.

45 La presente invención se puede usar en conjunto con la terapia en la que el conjugado se usa en conjunto con un agente quimioterapéutico tales como taxol, ciclofosfamida, cisplatino, ganciclovir y similares. El agente quimioterapéutico puede estar también conjugado a un polímero. Dicha terapia es particularmente útil en situaciones en las que el mamífero que se trata presenta una gran masa tumoral preexistente que está bien vascularizada. El agente quimioterapéutico sirve para reducir la masa tumoral y el conjugado previene o inhibe la neovascularización dentro o alrededor de la masa tumoral. El agente quimioterapéutico se puede administrar también a dosis inferiores que las que normalmente se usan y dichas dosis pueden actuar como un agente antiangiogénico.

50 La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para ayudar al entendimiento de la invención y no se deben interpretar como una limitación de esta.

EJEMPLO 1

60 **Métodos**

Materiales

Un copolímero aleatorio HPMA copolimerizado con el éster de metacrililoil-Gly-Phe-Leu-Gly-p-nitrofenilo (copolímero HPMA-MA-GFLG) que incorpora aproximadamente 10 mol% de las unidades monómero MA-GFLG-ONP, se preparó como se indicó previamente²⁴ y se proporcionó por Polymer Laboratories (Reino Unido). El precursor polimérico se usó para la incorporación de etilendiamina (en) y el producto del copolímero HPMA-GFLG-en tuvo un Mw de 31,600 Da y polidispersidad (PD) de 1.66. El TNP-470 se proporcionó gentilmente por Douglas Figg del NCI (Estados Unidos). El 2-propanol, metanol, ácido ortofosfórico y cloroformo eran de Sigma (todos de grado HPLC). La dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) eran de Aldrich (Estados Unidos). Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica de Aldrich (Estados Unidos) y Fisher Chemicals (Estados Unidos) a menos que se indique lo contrario. Vivacell 70 ml (MW de corte 10 kDa de PES) era de VivaScience (Estados Unidos). El isoflurano se adquirió de Baxter Healthcare Corporation (Estados Unidos). La matriz de membrana basal Matrigel (de tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm) se adquirió de Becton Dickinson (Estados Unidos). La Avertina se adquirió de Fisher (Estados Unidos).

Las células de melanoma humano A2058 eran de ATCC. Las células LLC se pasaron de ratón a ratón como se describió anteriormente⁴⁷. Las células se mantuvieron en medio DMEM que contiene 10% de suero bovino fetal inactivado (Life Technologies, Inc.), 0.29 mg/ml de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (GPS) (Gibco) en una incubadora humidificada con 5% CO₂ a 37 °C. Las células BCE se aislaron en nuestro laboratorio, y cultivaron en una incubadora humidificada con 10% CO₂ a 37 °C según se describió⁴⁸. Las células BCE se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero de ternero bovino (BCS), GPS, y 3 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF). Los ratones C57BL/6J se adquirieron de Jackson Laboratories (Estados Unidos), los ratones SCID del Hospital General de Massachusetts (Estados Unidos) y los ratones BALB/c de Charles River (Estados Unidos).

Síntesis

El TNP-470 se conjugó con el copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-etilendiamina a través del ataque nucleofílico sobre el α-carbonilo en el TNP-470 liberando el cloro. En resumen, el copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-etilendiamina (100 mg) se disolvió en DMF (1.0 ml). Entonces, el TNP-470 (100 mg) se disolvió en 1.0 ml de DMF y se adicionó a la solución. La mezcla se agitó en la oscuridad a 4 °C por 12 h. El DMF se evaporó y el conjugado de copolímero HPMA-TNP-40 producto se re-disolvió en agua, dializó (MWCO 10 kDa) contra agua para excluir el TNP-470 libre y otros contaminantes de bajo peso molecular, se liofilizó y almacenó a -20 °C. El análisis por fase reversa de HPLC usando una columna C18, se usó para caracterizar el conjugado.

Ensayo de proliferación de células endoteliales capilares bovinas (BCE)

Las células BCE se obtuvieron y se cultivaron como se describió anteriormente⁴⁸. Para el ensayo de proliferación, las células se lavaron con PBS y se dispersaron en una solución de tripsina al 0.05%. Las células se suspendieron (15,000 células/ml) en DMEM suplementado con 10% de BCS y GPS 1%, sembraron en placas de cultivo gelatinizadas de 24 pocillos (0.5 ml/pocillo) y se incubaron por 24 h (37 °C, 10% CO₂), el medio se reemplazó con 0.25 ml de DMEM, 5% de BCS y 1% de GPS y se aplicó a la muestra de prueba. Las células se estimularon con TNP-470 libre o conjugado (10 pg/ml para 1 µg/ml de concentración equivalente de TNP-470). Después de 30 min de incubación, medio y bFGF se adicionaron para obtener un volumen final de 0.5 ml de DMEM, 5% de BCS, 1% de GPS y 1 ng/ml de bFGF. Las células de control se cultivaron con o sin bFGF. Después de 72 h, las células se dispersaron con tripsina, resuspendieron en Hematall (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania), y contaron en un contador Coulter.

Ensayo del Anillo Aórtico de Pollo:

Arcos aórticos se disecaron a partir de embriones de pollo de 14 días, cortaron en fragmentos de sección transversal, e implantaron *in vitro* en el Matrigel usando una modificación de los métodos anteriormente descritos (V. Muthukkaruppan, comunicación personal). Cuando se cultivaron en el medio MCDB-131 suplementado con 5% de suero fetal bovino, las células endoteliales germinaron y se produjo formación del canal vascular dentro de 24-48 horas. TNP-470 libre o conjugado (10 pg/ml a 1 µg/ml) se adicionó al cultivo.

Modelo de hepatectomía

Ratones machos C57BL/6J se sometieron a una hepatectomía parcial a través de una incisión de línea media después de la anestesia con isoflurano³³. TNP-470 libre o conjugado (30 mg/kg) se administraron por vía subcutánea días alternos durante 8 días comenzando en el día de la cirugía de acuerdo con el esquema descrito en la Figura 4a. Como alternativa, las dosis administradas fueron 60 mg/kg el día de la cirugía y 4 días después, o una de 120 mg/kg en el día de la hepatectomía parcial. El hígado se recolectó en el 8^{vo} día, pesado y analizado por histología.

Evaluación de la distribución corporal de TNP-470 libre y copolímero HPMA-TNP-470 en ratones con LLC subcutáneo

Ratones machos C57BL/6J se inocularon por vía subcutánea con 5×10^6 células viables LLC y el tumor se dejó crecer hasta un volumen aproximadamente de 100 mm^3 . Los animales se inyectaron por vía intravenosa con TNP-470 libre o conjugado (30 mg/kg). La remoción intracerebral del LCR del cerebro de ratones C57BL/6J se realizó usando un aparato estereotáxico modelo (Stoelting Co., Wooddale IL) de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas descritas en el atlas de cerebro de ratón⁴⁹ y el método descrito en Waynforth⁵⁰. Una vez que se obtuvo la cantidad de fluido deseado (aproximadamente 20 μl), el animal se sacrificó a través de la dislocación cervical en tiempos de hasta 72 h. Los tumores, órganos principales, orina sangre y LCR se recogieron y homogeneizaron. A continuación, el TNP-470 se extrajo en cloroformo. Seguido la evaporación del cloroformo, las muestras se redisolviaron y se usó la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)/Espectrometría de Masas en tándem (LC-MS/MS) para determinar la cantidad de TNP-470 libre en las muestras como se describió anteriormente³⁶.

Evaluación de la Actividad Antitumoral del copolímero HPMA-TNP-470

Ratones machos C57BL/6J (~8 semanas, ~20 g) se inocularon vía subcutánea con 5×10^6 células de LLC viable o melanoma A2058. Los tumores se dejaron crecer hasta un volumen de aproximadamente 100 mm^3 . Los animales se inyectaron por vía intravenosa con TNP-470 libre o copolímero HPMA-TNP-470 (30 mg/Kg equivalente-TNP) o salina (250 μl vía intravenosa). Cada grupo consistió de 5 ratones. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron o superaron un tamaño equivalente al 30% de su peso corporal. Los animales se pesaron diariamente y observaron para los signos de progresión del tumor y se sacrificaron si su peso corporal disminuyó por debajo de 80% de su peso inicial. Los animales se supervisaron para la salud en general, pérdida de peso, y progresión del tumor. Al terminar, los ratones se sometieron a examen post mortem y los tumores se cortaron y pesaron. Un experimento similar se repitió, cuyo tratamiento con dosis crecientes del conjugado se inició cuando los tumores alcanzaron 500 mm^3 . El mismo programa de dosificación se repitió con ratones SCID machos blancos (~8 semanas, ~20 g) inoculados por vía subcutánea con 5×10^6 células A2058 de melanoma humano viable y tratados como se describió anteriormente.

Métodos Estadísticos

Todos los datos *in vitro* se expresan como media \pm desviación estándar de la media (S.D.). Todos los datos *in vivo* se expresan como media \pm error estándar de la media (S.E.). La significación estadística se evaluó usando la prueba t de Student. Los valores de *P* de 0.05 o menos se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Síntesis y caracterización

El copolímero HPMA-Gly-Phe-Leu-Gly-etilendiamina-conjugado con TNP-470 (Figura 1A) se sintetizó, purificó y caracterizó por HPLC. El enlazador polímero Gly-Phe-Leu-Gly -TNP-470 se diseñó para permitir la liberación intralisosomal de TNP-470 debido a la acción de las cisteína-proteasas lisosomales²⁹, tales como catepsina B. Se demostró que la catepsina B se sobreexpresa en muchas células tumorales³⁰. El conjugado se acumula selectivamente en el tejido del tumor debido al efecto EPR y se internaliza lentamente dentro de las células endoteliales en el lecho del tumor por pinocitosis de fase fluida. El conjugado no se debe internalizar en las células endoteliales quiescentes normales, por lo tanto no se expondrá a las enzimas lisosomales dejando intacto el enlazador. El TNP-470 libre se eluyó como un único pico con un tiempo de retención de 13.0 min, mientras que el conjugado eluyó como un pico más ancho en 10.0 min (resultados no mostrados). El fármaco libre fue insignificante (<0.01% del total de TNP-470) después de la purificación repetida por diálisis. TNP-470 no es soluble en agua pero se convirtió en soluble después de la conjugación con el copolímero de HPMA. El conjugado fue estable por tres días en solución salina regulada con fosfato o tampón citrato, pH 5.5, 0.2 M a 37 °C. Sin embargo, bajo las mismas condiciones con la adición de la enzima lisosomal catepsina B, el enlazador entre el polímero y el fármaco (Gly-Phe-Leu-Gly³¹) se escindió y se liberó el TNP-470 (Figura 1B). Estas condiciones imitan el entorno lisosomal en las células endoteliales donde se presentan las enzimas lisosomales, tales como la catepsina B. TNP-470 que se libera a partir del conjugado alcanzó una meseta en 5 h de incubación con catepsina B y no aumentó apreciablemente incluso después de 5 días. La solución incubada se analizó después y tuvo un contenido de TNP-470 de aproximadamente 10 mol%. A continuación probamos la actividad *in vitro* del conjugado de copolímero HPMA-TNP-40 en dos ensayos de angiogénesis: proliferación de células endoteliales y ensayos de anillo aórtico de pollo.

Proliferación de célula endotelial capilar bovina (BCE)

Para determinar si el copolímero HPMA-TNP-470 era activo en las células endoteliales probamos su efecto inhibitor sobre la proliferación *in vitro* de células BCE. El crecimiento de células BCE, estimulada por bFGF, se inhibió de manera similar por TNP-470 y el copolímero HPMA-TNP-470 (Figura 2A). Tanto el TNP-470 libre como conjugado inhibió la proliferación de células BCE inducida por bFGF (efecto citostático) de la concentración equivalente-TNP-470 de 10 pg/ml a 1 µg/ml. Sin embargo, a dosis mayores de 1 µg/ml, tanto TNP-470 libre como conjugado fueron citotóxicos. Estos datos están de acuerdo con resultados publicados de TNP-470 libre en diferentes células endoteliales^{11,32}.

Ensayo del anillo aórtico de pollo

Se demostró que el conjugado inhibió *in vitro* el crecimiento de células endoteliales, un modelo *ex vivo* de los anillos aórticos de pollo implantados en Matrigel se utilizó para caracterizar mejor el conjugado del copolímero HPMA-TNP-470. Tanto TNP-470 libre como conjugado redujeron el número y longitud de brotes vasculares que crecen desde el anillo aórtico de pollo a 50 pg/ml y a 100 pg/ml previnieron completamente la expansión (Figura 2B). Un anillo aórtico de control (panel izquierdo) mostró abundante brotación. Similar dependencia de dosis se encontró para TNP-470 libre en un ensayo de anillo aórtico de ratón (Moulton, resultados no publicados).

Hepatectomía

Demostramos que el copolímero HPMA-TNP-470 era igualmente activo *in vitro* que el TNP-470 libre. Por tanto, se evaluó su actividad antiangiogénica *in vivo*.

Antes de probar el conjugado en modelos de tumores *in vivo*, establecimos la eficacia del conjugado de copolímero HPMA-TNP-40 en el modelo de hepatectomía (Figura 3A). Este modelo no neoplásico es un proceso relativamente rápido (8 días) dependiente de la angiogénesis *in vivo*³³. Se empleó el modelo de la hepatectomía para comparar la actividad inhibitora del TNP-470 libre y conjugado en la célula endotelial, ya que la regeneración del hígado post-hepatectomía es dependiente de la angiogénesis, similar al crecimiento del tumor^{33,34}. Después de una hepatectomía parcial, los ratones del control regeneraron su hígado extirpado a su masa pre-operatoria (~1.2 g) en el día 8 post-operatorio (Figura 3B). En los ratones tratados por vía subcutánea (s.c.) con el TNP-470 libre o su forma de polímero conjugado a 30 mg/kg en días alternos (q.o.d), la regeneración del hígado se inhibió y los hígados alcanzaron el tamaño medio de 0.7 g en el día 8 post-operatorio (Figura 3B). El TNP-470 libre no inhibió la regeneración del hígado cuando se inyectó a 60 mg/kg cada cuatro días o en una única inyección de 120 mg/kg en el día de la hepatectomía. Sin embargo, el conjugado de copolímero HPMA-TNP-470 tuvo un efecto equivalente al del programa de dosificación de 30 mg/kg en días alternos cuando se administró cada 4 días (cada 4 días) a 60 mg/kg o en una dosis única de 120 mg/kg en el día de la hepatectomía. Esto sugiere que el conjugado tiene un tiempo de circulación *in vivo* más extenso que el TNP-470 libre y/o que el conjugado se acumula en el sitio de proliferación de las células endoteliales, conduciendo a la liberación sostenida de TNP-470 a partir del polímero. Debido a que la regeneración del hígado se regula por células endoteliales^{33,34}, se espera que un efecto similar se puede presentar con la proliferación de células endoteliales en el tejido tumoral, donde el conjugado se acumula debido al efecto EPR

Desarrollo precoz del ratón

TNP-470 libre y conjugado se inyectaron en ratones BALB/c de 7 y 17 días de edad para probar sus efectos en el desarrollo normal. TNP-470 libre inhibió el crecimiento, inhibiendo la ganancia de peso a esta edad crítica. Sin embargo, los ratones tratados con el conjugado de copolímero HPMA-TNP-470 se desarrollaron de manera similar al grupo control inyectados con solución salina (Figura 3C). Estos resultados difieren de los resultados obtenidos a partir de los experimentos de hepatectomía. El conjugado de copolímero HPMA-TNP-470 inhibió la regeneración hepática después de la hepatectomía pero no inhibió el desarrollo normal en los ratones recién nacidos. Una posible explicación es que el conjugado se extravasó a través de vasos permeados en el hígado después de la cirugía (es decir, la misma inhibición que se observa en la curación de heridas retardada por TNP-470³⁵). Sin embargo, el conjugado no se escapó de los vasos normales que se desarrollan en el recién nacido.

Evaluación de la actividad antitumoral del copolímero HPMA-TNP-470 en ratones SCID con melanoma humano A2058 subcutáneo

Los ratones con melanoma A2058 subcutáneo mostraron supervivencia aumentada cuando se trataron con TNP-470 libre y conjugado (T/C = 0.34 para TNP-470 y 0.12 para el conjugado) (Figura 4A). T/C se definió como la relación del volumen medio del tumor de los animales tratados (T) dividido por el volumen medio de tumor del grupo control sin tratar (C). Durante este estudio no hubo ni muertes debido a la toxicidad ni pérdida de peso en los ratones tratados con el conjugado, indicando que es posible el crecimiento de la dosis del conjugado. Una disminución

significativa en la tasa de crecimiento tumoral se observó en los animales tratados con TNP-470 ($P < 0.03$) y con el copolímero HPMA-TNP-470 ($P < 0.05$) comparado con los controles (Figura 4A, B, C). La Figura 4C presenta las secciones histológicas de los tumores que representan los tres grupos tratados (solución salina, TNP-470 libre o conjugado) teñidas con H & E y que muestran en todos las células tumorales viables.

5 **Evaluación de la actividad antitumoral del copolímero HPMA-TNP-470 en ratones C57BL/6J con LLC subcutáneo**

10 Los ratones con LLC subcutáneo mostraron la supervivencia aumentada cuando se trataron con TNP-470 libre y unido en una concentración equivalente de TNP-470 de 30 mg/kg en días alternos. El copolímero HPMA-TNP-470 presentó una actividad antitumoral superior en comparación con el TNP-470 libre. En el día 8, cuando se sacrificaron los ratones del control, el copolímero HPMA-TNP-470 inhibió el crecimiento tumoral en 86% ($P < 0.03$) mientras que TNP-470 libre en 67% ($P < 0.05$) (Figura 5A,B). Además, el conjugado no indujo la pérdida de peso mientras que el TNP-470 libre lo hizo (datos no mostrados). Ya que el copolímero HPMA-TNP-470 no indujo la pérdida de peso, probamos el conjugado en ratones con LLC a dosis más altas de 60 y 90 así como 30 mg/kg/en días alternos. El conjugado inhibió el crecimiento tumoral igualmente a 30 o 60 mg/kg/en días alternos ($P < 0.03$, T/C = 0.4, día 8). La supresión tumoral fue significativamente mejorada a 90 mg/kg/en días alternos ($P < 0.05$, T/C = 0.24, día 8) (Figura 5C, D). Incluso en la dosis más alta de 90 mg/kg/en días alternos, no hubo pérdida de peso del animal, indicando que no alcanzamos la dosis máxima tolerada (MTD). Se conoce que a estas dosis el TNP-470 libre es tóxico para los ratones. En este conjunto de experimentos el tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron 500 mm³, por lo tanto, los resultados difieren de los experimentos anteriores en los que el tratamiento se inició cuando los tumores eran de 100 mm³.

25 **Evaluación del TNP-470 y copolímero de HPMA-TNP-470 en el líquido cefalorraquídeo de los ratones con LLC subcutáneo**

30 HPLC-espectrometría de masas (LC-MS/MS) mostró que el TNP-470 libre está presente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los ratones con tumor LLC subcutáneo después de la administración intravenosa del fármaco. Sin embargo, cuando el conjugado de copolímero HPMA-TNP-470 se inyectó, ni TNP-470 ni sus metabolitos conocidos³⁶ se detectaron en el LCR. Estos resultados sugieren que la neurotoxicidad asociada con TNP-470 se puede evitar cuando TNP-470 se conjuga con el copolímero HPMA. La distribución corporal total y farmacocinética del TNP-470 libre y conjugado en los tejidos normales, sangre, orina y tumor analizados por LC-MS/MS se publicarán por separado.

35 **Conclusiones**

40 A pesar de un nuevo cambio en la terapia del cáncer, varios conjugados de polímero-fármaco se encuentran ya en los primeros ensayos clínicos³⁷. Estos incluyen el copolímero HPMA-doxorrubicina (PK1, FCE28068), copolímero HPMA-paclitaxel (PNU 166945), copolímero HPMA-camptotecina, polietilenglicol (PEG)-camptotecina, ácido poliglútamico-paclitaxel, un copolímero HPMA-platinato (AP5280) y también un conjugado del copolímero HPMA-doxorrubicina que porta además galactosamina (PK2, FCE28069)³⁸. La toxicidad y actividad reducida en la quimioterapia de los pacientes refractarios se describió. En la fase I, PK1 mostró una dosis máxima tolerada de 320 mg/m² (en comparación con 60 mg/m² para la doxorrubicina libre) y mostró también actividad antitumoral³⁹. Además, los datos de farmacocinética clínica (PK1 $t_{1/2\alpha}$ = 1.8 h sin dependencia de la dosis de holgura en comparación con unos pocos minutos para la doxorrubicina libre) fueron muy similares a los reportados en animales²⁵. PK1 demostró la capacidad de dirigirse a tumores sólidos mediante el efecto EPR⁴⁰ con la eliminación renal concomitante lo que resulta en bajos niveles sanguíneos dentro de 1-5 h en animales y en los seres humanos^{25,39}.

50 Los conjugados del polímero inhibidor de la angiogénesis pueden aprovechar la capacidad de las macromoléculas de dirigirse pasivamente al tejido objetivo de tumor sólido por el efecto EPR²⁶ (similar a PK1). Este efecto se produce debido a la vasculatura tumoral pobremente organizada⁴¹ lo que resulta en la 'permeabilidad mejorada' hacia moléculas circulantes. El drenaje linfático pobre en el tejido tumoral conduce a la 'retención' aumentada. Se acepta que la principal razón para la actividad antitumoral mejorada de los conjugados de polímero-fármaco, con respecto al fármaco libre, es que se orienta al tumor como resultado de este efecto EPR³⁷. El enlazador polimérico Gly-Phe-Leu-Gly-TNP-470 usado en este estudio se diseñó para permitir la liberación intralisosomal de TNP-470 debido a la acción de las cisteína proteasas lisosomales²⁹. Para ejercer un efecto antitumoral, una especie activa de TNP-470 se debe liberar en el sitio del tumor e interactuar con metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2) en las células endoteliales. MetAP2 es un objetivo molecular de TNP-470, que se identificó recientemente, aunque el mecanismo exacto que fundamenta su efecto selectivo sobre la proliferación de las células endoteliales aún se debe entender⁴². Por lo tanto, los valores T/C para el conjugado de 0.12- 0.14 indicaron que el TNP-470, que se unió a la cadena principal polimérica durante la circulación, se liberó en el sitio del tumor. El mecanismo para la liberación de una porción de TNP-470 involucra la captación celular, seguida por la escisión enzimática del péptido enlazador dentro de los lisosomas de las células endoteliales. Es probable que algunos de los conjugados que se acumulan en el tumor será

captado por las células tumorales. Sin embargo, una concentración más alta de TNP-470 se necesitará para afectar las células tumorales (superior a 3-logs).

5 Muchos estudios de inductores e inhibidores de la angiogénesis *in vitro* o *in vivo* dependen de modelos según los indicadores de eficacia. Sin embargo, tan valiosos como estos modelos son, las limitaciones existentes para cada uno de ellos. Por lo tanto, los múltiples ensayos usados, involucrando ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, son en la actualidad la mejor manera de minimizar los problemas inherentes de cualquier ensayo específico⁴³. De esta manera, se logró una evaluación adecuada y la comparación entre el TNP-470 libre y conjugado.

10 En resumen, demostramos que la tasa de crecimiento tumoral se puede reducir significativamente por la entrega sistémica de un agente antiangiogénico que se dirige a la vasculatura del tumor. Además, este conjugado conduce probablemente a una toxicidad reducida y no causa la pérdida de peso en ratones recién nacidos y adultos porque, a diferencia de la forma libre, no entra al LCR. El efecto de actuación prolongado y mejorado del conjugado en comparación con el del TNP-470 libre (como se describió en el modelo de hepatectomía), se puede atribuir a una
15 acumulación aumentada en los tejidos neovascularizados y a mayor estabilidad del conjugado. Diversos componentes de esta estrategia contribuyen a su actividad antitumoral pronunciada, lo que puede facilitar la futura terapia en los seres humanos. En primer lugar, el copolímero de HPMA usado en este estudio tiene multivalentes cadenas laterales, que hacen posible dirigir la alta carga de TNP-470 u otros fármacos a los vasos sanguíneos angiogénicos, debido al efecto EPR. En segundo lugar, es posible conjugar una porción de orientación a la célula
20 endotelial con las cadenas laterales en el esqueleto polimérico⁴⁴. En tercer lugar, podemos destacar que: (a) los inhibidores de la angiogénesis suprimen el crecimiento endotelial desde el interior del lumen vascular y pueden atravesar también los vasos tumorales permeados; (b) el conjugado copolímero HPMA-TNP-470 proporciona una exposición prolongada del fármaco en el endotelio; y (c) el TNP-470 conjugado no puede atravesar normal la barrera sanguínea cerebral. Por último, los polímeros son menos inmunogénicos que los vectores virales y se conocen por
25 disminuir o incluso anular la inmunogenicidad de las proteínas unidas y prolongar el tiempo de circulación^{24,45}. Los conjugados de polímero-enzima tal como polietilenglicol (PEG)-L-asparaginasa (Oncaspar®) para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda se aprobaron por la FDA y se convirtieron en comercialmente disponibles⁴⁶. Por lo tanto, puede ser posible entregar genes o proteínas terapéuticas repetidamente a los vasos sanguíneos angiogénicos para el tratamiento sostenido de enfermedades que dependen de la angiogénesis y remodelación vascular. Este estudio representa un ejemplo de cómo se puede mejorar significativamente un inhibidor eficaz de la
30 angiogénesis y disminuir su toxicidad conjugándolo con un polímero.

EJEMPLO 2

35 Ensayo de Miles:

Uno de los problemas con enfermedades dependientes de la angiogénesis es la permeabilidad aumentada de los vasos (debido a los altos niveles de VPF) que resulta en edema y pérdida de proteínas. Una disminución en la permeabilidad de los vasos es beneficiosa en esas enfermedades. Encontramos, usando el ensayo de Miles (Claffey y otros, Cancer Res., 56: 172-181 (1996)), que TNP-470 libre y unido bloquean la permeabilidad. En resumen, un colorante, azul de Evans, se inyectó por vía intravenosa a ratones anestesiados. Después de 10 minutos, el VEGF₁₆₅ recombinante humano se inyectó por vía intradérmica en la piel dorsal. La fuga del colorante unido a proteína se detectó como manchas azules en la parte inferior de la piel dorsal alrededor del sitio de inyección. Después de 20 minutos, los ratones se sacrificaron. Luego, la piel se extirpó, dejó en formamida por 5 días para extraer y leer la
45 solución a 620 nm. Los inhibidores potenciales de la angiogénesis tales como TNP-470 libre y conjugado se inyectaron diariamente 3 días antes del reto con VEGF. Lo mismo se repitió en ratones que portan el tumor para evaluar el efecto de los inhibidores de la angiogénesis en la permeabilidad de los vasos del tumor.

50 Comparamos el TNP-470 libre y conjugado con otros inhibidores de la angiogénesis en el ensayo de Miles. Encontramos que el TNP-470 libre y copolímero HPMA-TNP-470 tuvieron similar efecto inhibitorio en la permeabilidad de los vasos inducida por VEGF en oposición a los grupos controles e inhibidores indirectos de la angiogénesis tales como Herceptina y talidomida (Figura 6).

Referencias

- 55
1. Folkman, J. Angiogenesis, in Harrison's Textbook of Internal Medicine (ediciones. Braunwald, E. y otros) 517-530 (McGraw Hill, Nueva York, 2001).
 2. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86, 353-64 (1996).
 - 60 3. Volpert, O.V. y otros, Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. Cancer Cell 2, 473-483 (2002).
 4. Folkman, J. Tumor angiogenesis, in Cancer Medicine (eds. Holland, J. y otros) 132-152 (B. C. Decker Inc., Ontario, Canada, 2000).

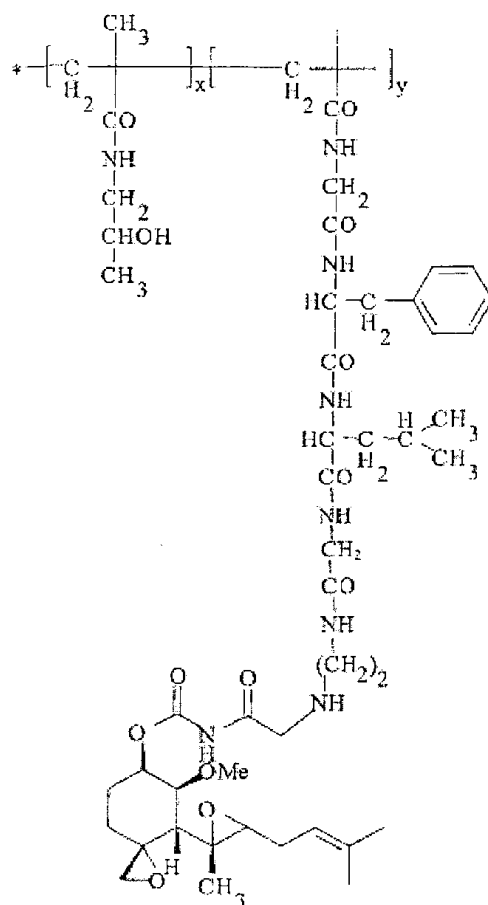
5. Lyden, D. y otros, Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-7 (1999).
6. Streit, M. y otros, Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14888-93 (1999).
- 5 7. Chin, L. y otros, Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-72 (1999).
8. Tabone, M.D. y otros, Are basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor prognostic indicators in pediatric patients with malignant solid tumors? *Clin Cancer Res* 7, 538-43 (2001).
9. Yao, Y. y otros, Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 143, 159-66 (2001).
- 10 10. Yuan, A. y otros, Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 20, 900-910 (2002).
11. Ingber, D. y otros, Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348, 555-7 (1990).
- 15 12. Antoine, N. y otros, AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 54, 2073-6 (1994).
13. Folkman, J. Tumor angiogenesis in Accomplishments in cancer research (eds. Wells, S.J. & Sharp, P.) 32-44 (Lippincott Williams & Wilkins, Nueva York, 1998).
- 20 14. Kudelka, A.P., Verschraegen, C.F. & Loyer, E. Complete remission of metastatic cervical cancer with the angiogenesis inhibitor TNP-470. *N Engl J Med* 338, 991-2 (1998).
15. Kudelka, A.P. y otros, A phase I study of TNP-470 administered to patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *Clin Cancer Res* 3, 1501-5 (1997).
16. Bhargava, P. y otros, A Phase I and pharmacokinetic study of TNP-470 administered weekly to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1989-95 (1999).
- 25 17. Herbst, R.S. y otros, Safety and pharmacokinetic effects of TNP-470, an angiogenesis inhibitor, combined with paclitaxel in patients with solid tumors: evidence for activity in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 20, 4440-7 (2002).
18. Kim, E.S. & Herbst, R.S. Angiogenesis inhibitors in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 4, 325-33 (2002).
- 30 19. Stadler, W.M. y otros, Multi-institutional study of the angiogenesis inhibitor TNP-470 in metastatic renal carcinoma. *J Clin Oncol* 17, 2541-5 (1999).
20. Logothetis, C.J. y otros, Phase I trial of the angiogenesis inhibitor TNP-470 for progressive androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7, 1198-203 (2001).
21. Rupnick, M.A. y otros, Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10730-5 (2002).
- 35 22. Schoof, D.D. y otros, The influence of angiogenesis inhibitor AGM-1470 on immune system status and tumor growth in vitro. *Int J Cancer* 55, 630-5 (1993).
23. Nagabuchi, E., VanderKolk, W.E., Une, Y. & Ziegler, M.M. TNP-470 antiangiogenic therapy for advanced murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 32, 287-93 (1997).
- 40 24. Rihova, B. y otros, Biocompatibility of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers containing adriamycin. Immunogenicity, and effect on haematopoietic stem cells in bone marrow in vivo and mouse splenocytes and human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomaterials* 10, 335-42. (1989).
25. Seymour, L.W., Ulbrich, K., Strohal, J., Kopecek, J. & Duncan, R. The pharmacokinetics of polymer-bound adriamycin. *Biochem Pharmacol* 39, 1125-31 (1990).
- 45 26. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65, 271-84 (2000).
27. Duncan, R., Coatsworth, J.K. & Burtles, S. Preclinical toxicology of a novel polymeric antitumour agent: HPMA copolymer-doxorubicin (PK1). *Hum Exp Toxicol* 17, 93-104 (1998).
28. Satchi-Fainaro, R. Targeting tumour vasculature: Reality or a dream? *J Drug Targeting* 10, 529-533 (2002).
- 50 29. Duncan, R., Cable, H.C., Lloyd, J.B., Rejmanova, P. & Kopecek, J. Polymers containing enzymatically degradable bonds. 7. Design of oligopeptide side chain in poly N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers to promote efficient degradation by lysosomal enzymes. *Makromol Chem* 184, 1997-2008 (1984).
30. Foekens, J.A. y otros, Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol* 16, 1013-21 (1998).
- 55 31. Gianasi, E. y otros, HPMA copolymer platinates as novel antitumour agents: in vitro properties, pharmacokinetics and antitumour activity in vivo. *Eur J Cancer* 35, 994-1002 (1999).
32. Kusaka, M. y otros, Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). *Br J Cancer* 69, 212-6 (1994).
33. Greene, A.K. y otros, Endothelial directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Annals of Surgery* in press(2003).
- 60 34. Drixler, T.A. y otros, Liver regeneration is an angiogenesis- associated phenomenon. *Ann Surg* 236, 703-12 (2002).

35. Klein, S.A., Bond, S.J., Gupta, S.C., Yacoub, O.A. & Anderson, G.L. Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits murine cutaneous wound healing. *J Surg Res* 82, 268-74 (1999).
36. Whalen, C.T., Hanson, G.D., Putzer, K.J., Mayer, M.D. & Mulford, D.J. Assay of TNP-470 and its two major metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 40, 214-8 (2002).
- 5 37. Brocchini, S. & Duncan, R. Polymer-Drug conjugates: drug release from pendent linkers, in *Encyclopaedia of controlled release* (ed. Mathiovitz, E.) 786-816 (Nueva York: Wiley, 1999).
38. Duncan, R. y otros, Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. *J Control Release* 74, 135-46 (2001).
- 10 39. Vasey, P.A. y otros, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Clin Cancer Res* 5, 83-94 (1999).
40. Seymour, L.W. y otros, Tumour tropism and anti-cancer efficacy of polymer-based doxorubicin prodrugs in the treatment of subcutaneous murine B16F10 melanoma. *Br J Cancer* 70, 636-41 (1994).
- 15 41. Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T. & Dvorak, A.M. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 133, 95-109 (1988).
42. Griffith, E.C. y otros, Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chem Biol* 4, 461-71 (1997).
43. Auerbach, R., Akhtar, N., Lewis, R.L. & Shinnars, B.L. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 19, 167-72 (2000).
- 20 44. Seymour, L.W. y otros, Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* 20, 1668-76 (2002).
45. Francis, G.E., Delgado, C. & Fisher, D. PEG-modified proteins. in *Stability of proteins pharmaceuticals (Part B)* (ed. Ahem TJ, M.M.) 235-263 (Plenum Press, Nueva York, 1992).
- 25 46. Ho, D.H. y otros, Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos* 14, 349-52 (1986).
47. O'Reilly, M.S. y otros, Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-28 (1994).
48. Folkman, J., Haudenschild, C.C. & Zetter, B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 76, 5217-21 (1979).
- 30 49. Paxinos, J. & Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, (Academic Press, 2001).
50. Waynforth, H.B. Routes and methods of administration, Intracerebral injection, in *Experimental and Surgical technique in the rat*, Vol. 2.9 34-36 (Academic Press, London, 1980).

35

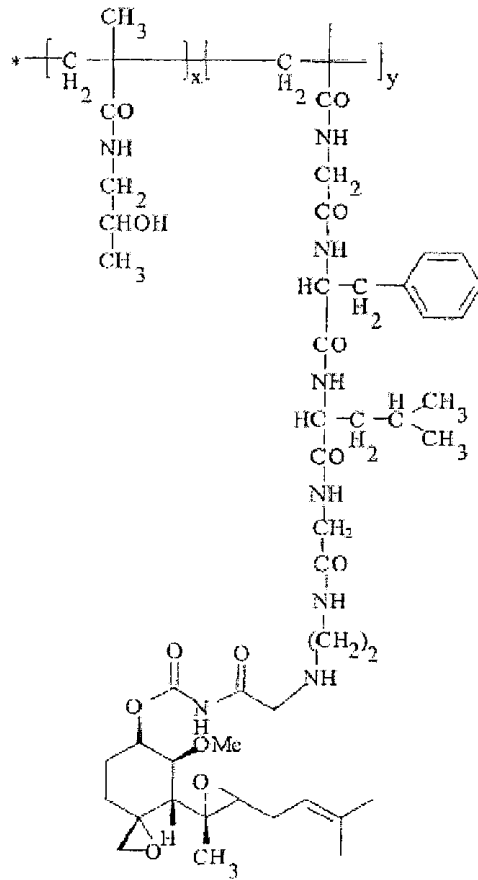
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un TNP-470 conjugado con un polímero usando un enlazador, en donde el polímero es soluble en agua y tiene un peso molecular en el intervalo de 15 a 40 kDa, en donde el polímero es un copolímero de hidroxipropil(met)acrilamida-ácido metacrílico, y en donde el enlazador comprende por lo menos un enlace peptídico escindible.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el enlazador comprende Gly-Phe-Leu-Gly.
3. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un ligando de orientación, en donde el ligando de orientación contiene la secuencia tripéptido RGD.
4. La composición de la reivindicación 1, que comprende la estructura:

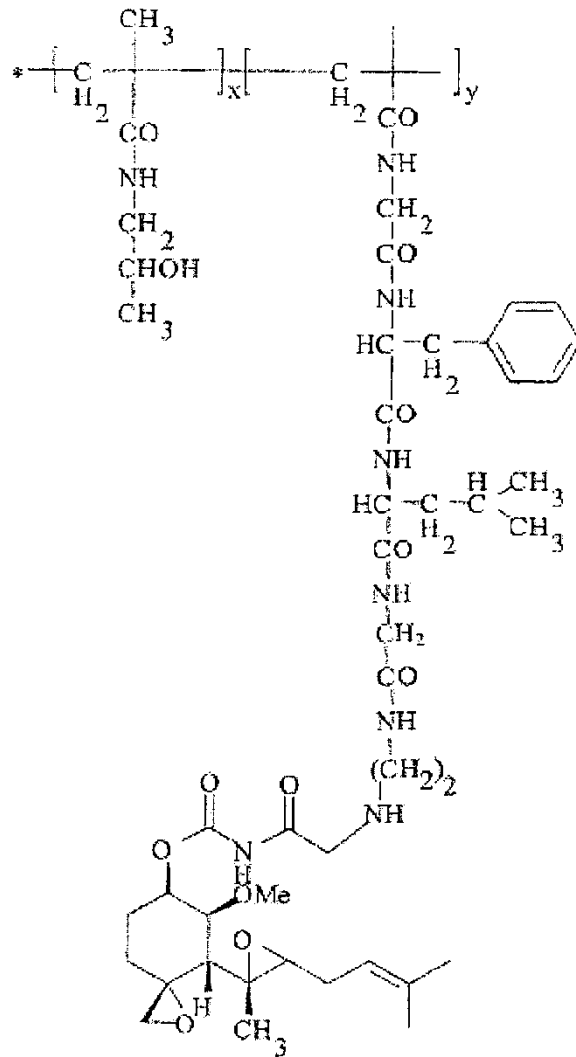


5. en donde y está en el intervalo de 0.04-20 y x está en el intervalo de 80-99.96.
6. Una composición como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar como un medicamento.
7. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en el tratamiento de una enfermedad angiogénica en un mamífero que lo necesita.
8. La composición para el uso de la reivindicación 6, en donde la enfermedad angiogénica es un tumor sólido.
9. Un método que comprende conjugar el TNP-470 a un polímero mediante un enlazador, en donde el polímero es soluble en agua y tiene un peso molecular en el intervalo de 15 a 40 kDa, en donde el polímero es un copolímero de hidroxipropil(met)acrilamida-ácido metacrílico, en donde el enlazador comprende al menos un enlace peptídico escindible, y en donde se disminuye la neurotoxicidad de TNP-470

9. El método de la reivindicación 8, en donde el producto de la conjugación del TNP-470 con el polímero comprende la estructura:



- 5 en donde y está en el intervalo de 0.04-20 y x está en el intervalo de 80-99.96.
10. El método de la reivindicación, en donde y es 5-10 y x es 90-95.
11. Un conjugado HPMA-TNP-470 que comprende la estructura:



en donde x es 90-95 y y es 5-10.

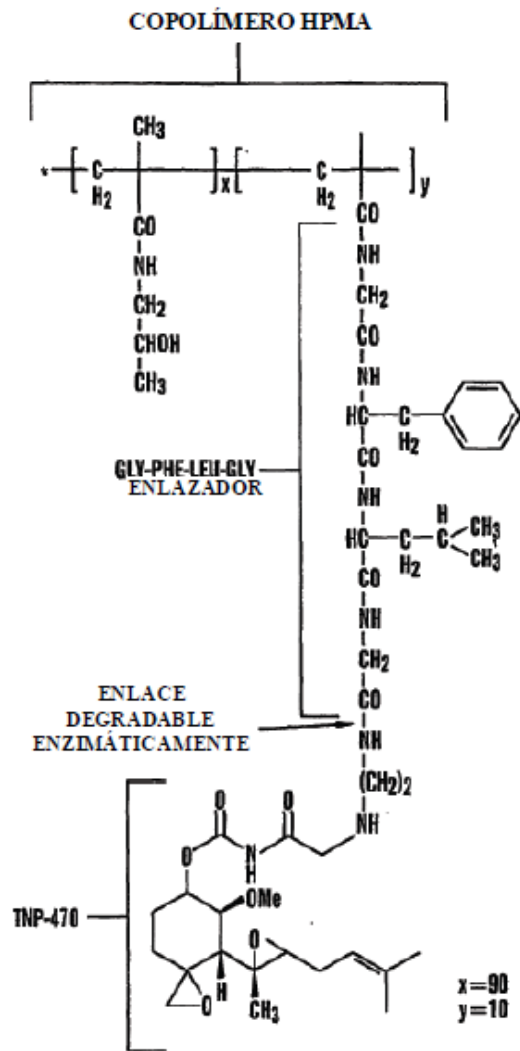


FIG. 1A

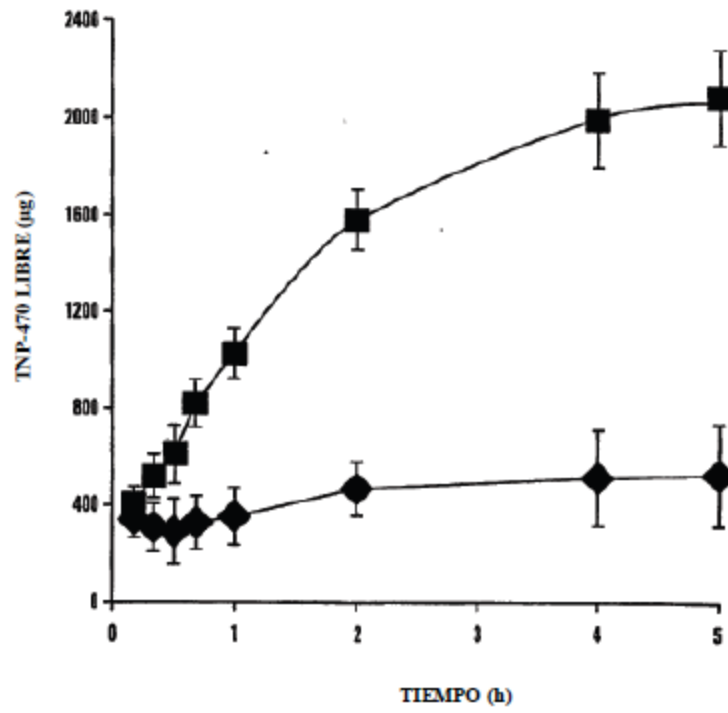


FIG. 1B

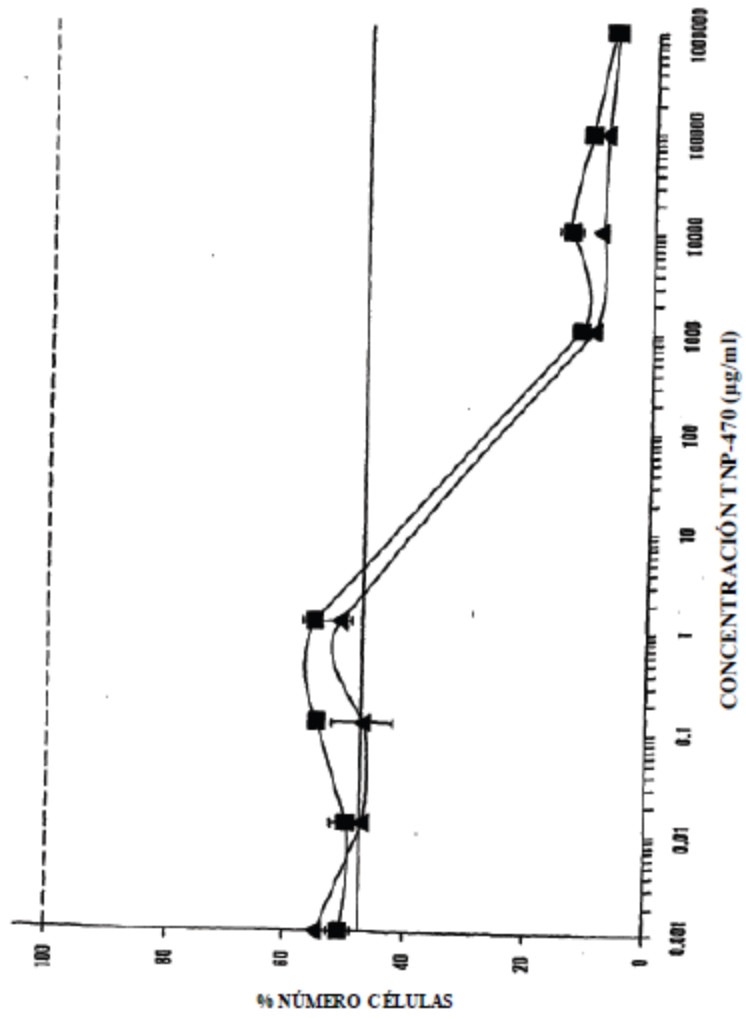


FIG. 2A

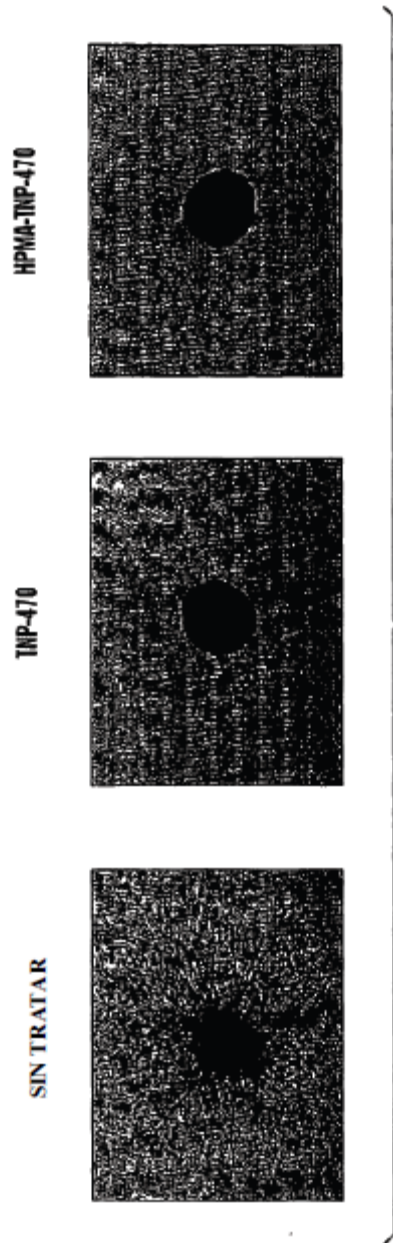


FIG. 2B

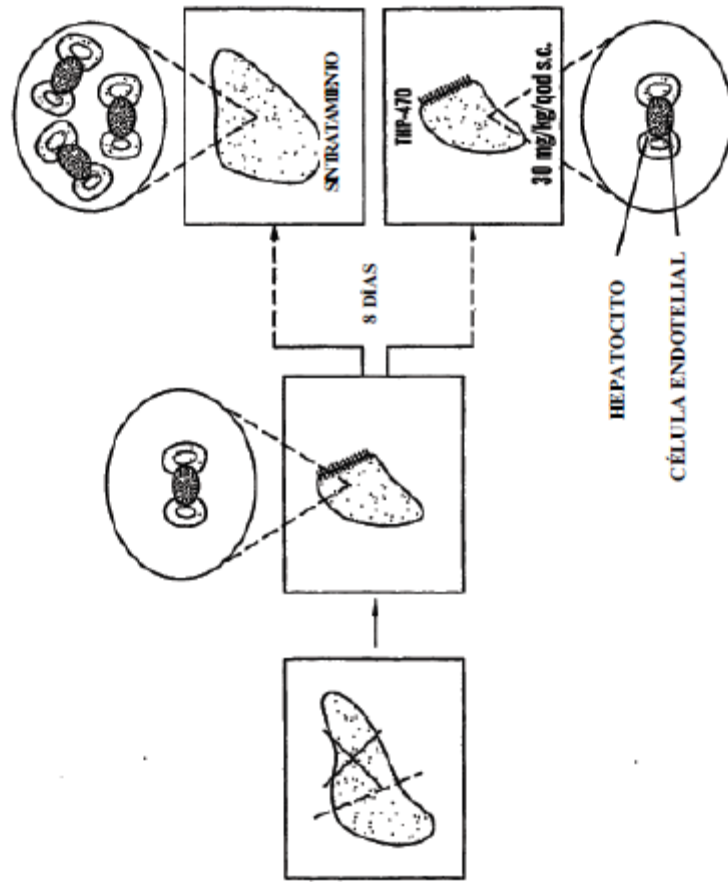


FIG. 3A

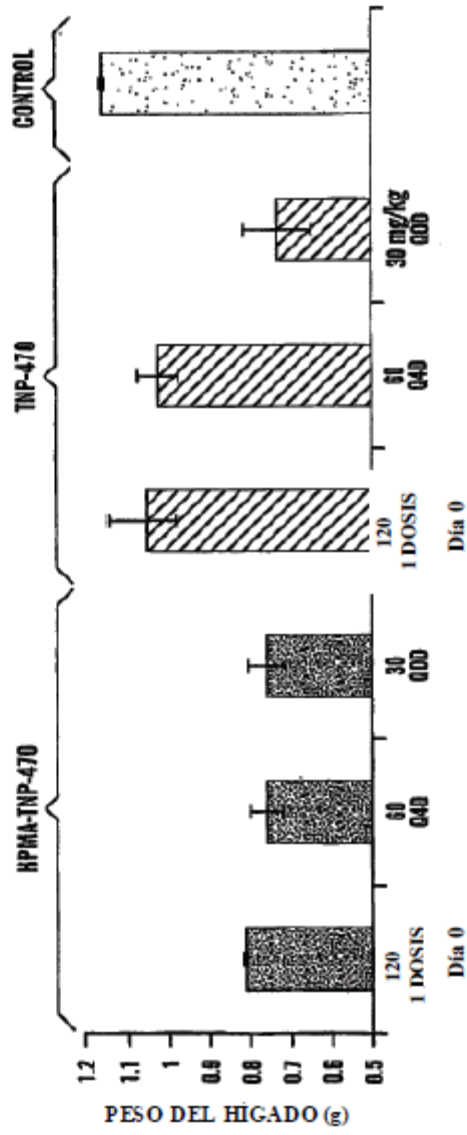


FIG. 3B

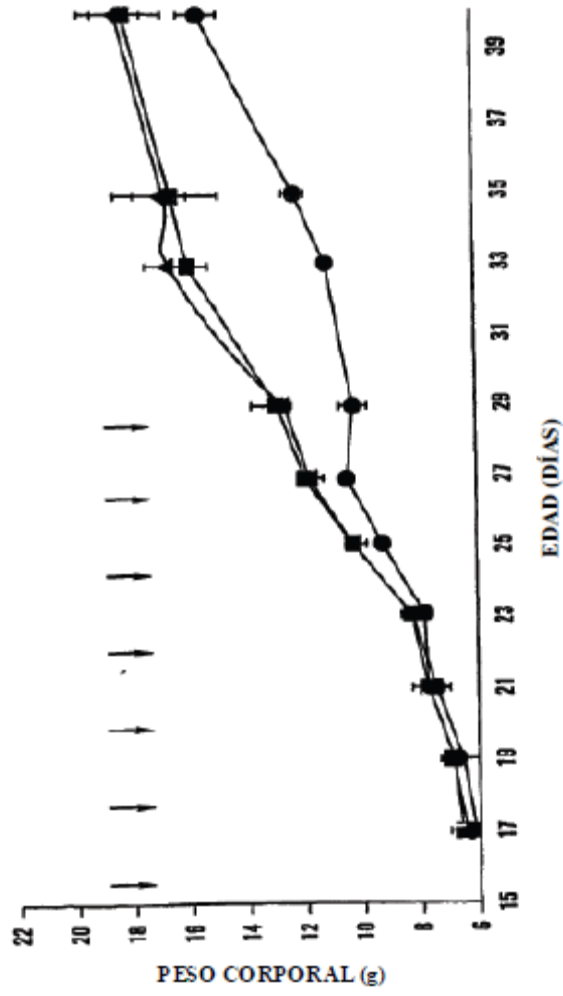


FIG. 3C

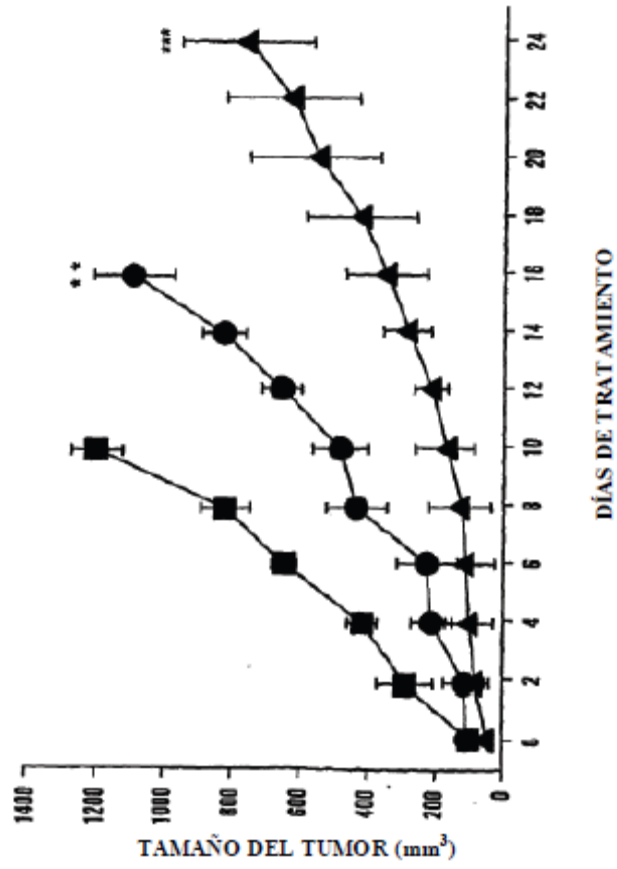


FIG. 4A



FIG. 4B

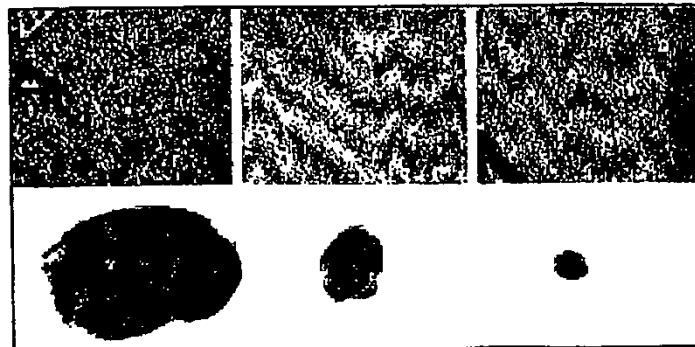


FIG. 4C

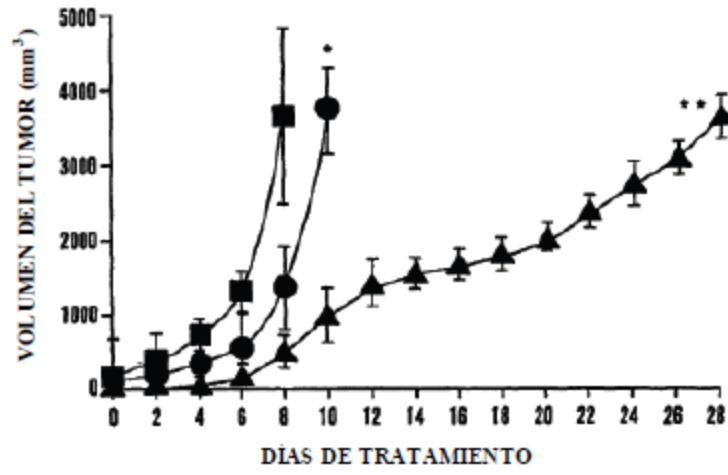


FIG. 5A

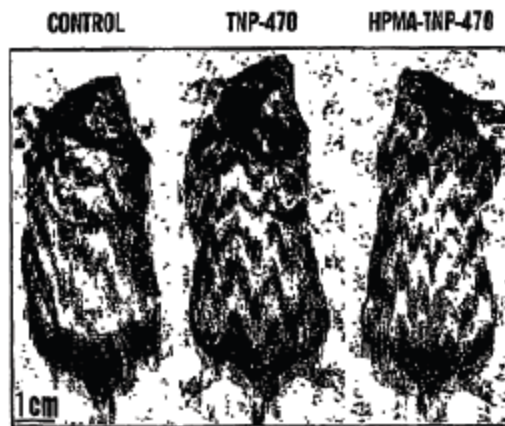


FIG. 5B

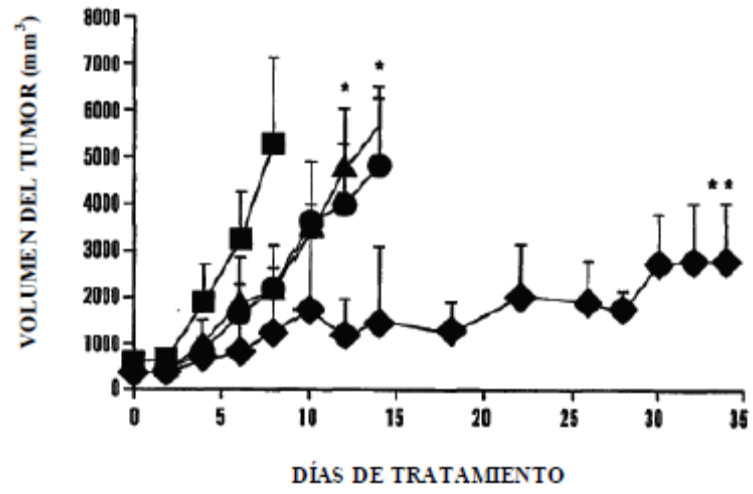


FIG. 5C

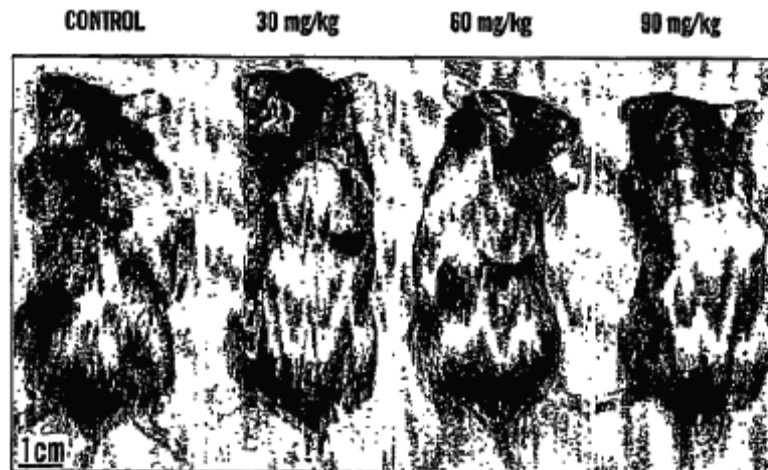
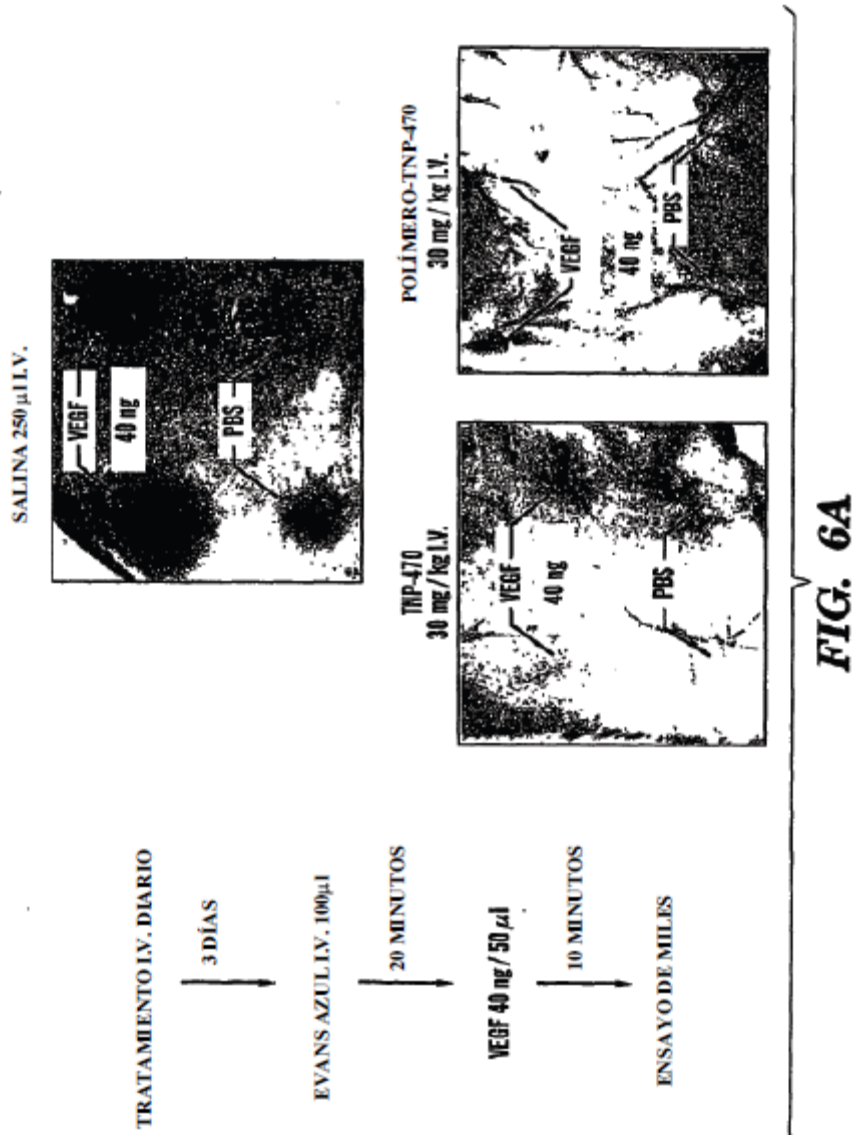
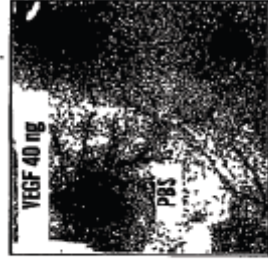


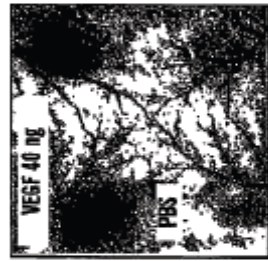
FIG. 5D



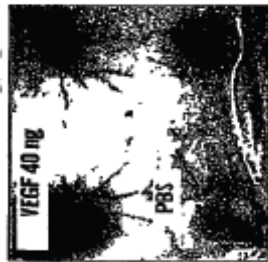
METIL CELULOSA 250 μ l I.P.



HERCEPTINA 20 mg/kg I.P.



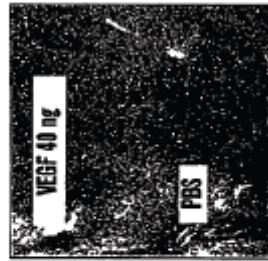
TALIDOMIDA 50 mg/kg I.P.



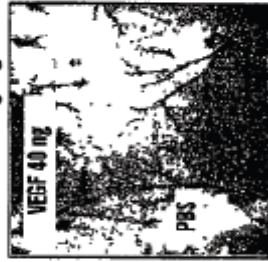
SALINA 250 μ l I.V.



ANGIOSTATINA 20 mg/kg I.V.



HPMA-TNP 30 mg/kg I.V.



TNP-470 30 mg/kg I.V.

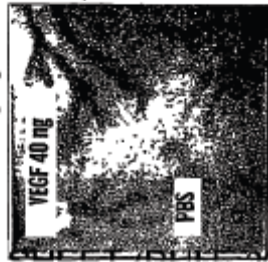


FIG. 6B