

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 577**

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: **30.09.2009 E 09759869 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2349343**

54 Título: **Composición polimérica con efecto sinérgico en el tratamiento de enfermedades tumorales**

30 Prioridad:

23.10.2008 CZ 20080661

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

11.12.2013

73 Titular/es:

**ZENTIVA, K.S. (100.0%)
U Kabelovny 130
102 37 Praha 10, CZ**

72 Inventor/es:

**ETRYCH, TOMAS;
ULBRICH, KAREL;
HOVORKA, ONDREJ y
RIHOVA, BLANKA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 433 577 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

Composición polimérica con efecto sinérgico en el tratamiento de enfermedades tumorales

5 **Sector técnico**

La presente invención se refiere a una composición polimérica que comprende una mezcla de dos fármacos poliméricos (conjugados de doxorrubicina) que proporciona un tratamiento muy eficaz de enfermedades tumorales. La utilización de la composición polimérica se centra en una terapia dirigida de enfermedades tumorales, en particular de tumores sólidos, en medicina humana.

10 **Técnica anterior**

La quimioterapia de las enfermedades tumorales está dirigida a la utilización de fármacos con efectos secundarios minimizados sobre tejidos sanos y un efecto específico máximo sobre un tejido tumoral o incluso células tumorales particulares. La utilización de portadores poliméricos en la preparación de nuevas generaciones de agentes cancerostáticos ofrece tanto la posibilidad de conseguir un transporte dirigido de un fármaco cancerostático a un tejido tumoral, como la activación controlada del fármaco unido al portador en el punto del efecto requerido, es decir, en el tejido tumoral o incluso en el interior de una célula tumoral. Se observó que un peso molecular apropiado de un portador polimérico puede proporcionar una deposición preferente del fármaco polimérico en el tejido tumoral en toda la gama de tumores sólidos (denominado efecto EPR) [Maeda y otros 2000]. La liberación del agente citoestático del portador polimérico se puede realizar a través de un enlace biodegradable utilizado para unir el fármaco al polímero. La degradación y, por tanto, la liberación del fármaco puede tener lugar a través de una hidrólisis enzimática y/o química.

Un grupo importante de estos fármacos incluye fármacos poliméricos preparados con una base a copolímeros de *N*-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA). Se desarrolló una gama de agentes cancerostáticos poliméricos, preparados con una base de copolímeros de *N*-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA), que proporcionan tanto un acceso pasivo [Kopeček y otros 2000, Říhová y otros 2001, Lammers y otros 2005 y 2006, Kissel y otros 2001, Ulbrich y otros 2000] como activo [Říhová y otros 2000, Jelínková y otros 2003, Šírová y otros 2007, Ulbrich y otros 2004] de dicho agente cancerostático al tumor. La primera de dichas sustancias cancerostáticas poliméricas que proporciona un acceso pasivo del agente cancerostático a tumores sólidos, que se probó clínicamente, fue un conjugado de copolímero de HPMA con doxorrubicina (DOX) denominado PK1 [Duncan y otros 1985, Vasey y otros 1999, Julian y otros, 1999]. La DOX en este fármaco se unía al portador polimérico utilizando una secuencia de oligopéptido degradable en el medio biológico mediante enzimas lisosómicas. Recientemente, se ha demostrado [Hovorka y otros, 2002] que dicho fármaco polimérico penetra muy rápidamente en las células tumorales, se une a membranas de orgánulos celulares, tales como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas y endosomas y provoca la destrucción de la célula que, de manera mayoritaria, tiene lugar debido a los cambios necróticos en la célula. Aunque se demostró un efecto antitumoral significativo de dicho fármaco en pacientes con varios tipos de tumores con una disminución simultánea en la toxicidad secundaria [Říhová y otros, 2003a, 2003b y 2005], el efecto terapéutico no era tan convincente para que este fármaco se pudiera utilizar comercialmente.

En 1985 se patentó un fármaco estructuralmente muy similar, aunque conteniendo en su estructura unidades que permiten el acceso dirigido del agente cancerostático polimérico a receptores de membrana de células tumorales [Duncan y otros 1985]. Para este acceso se utilizaron algunos aminoazúcares, hormonas y, en particular, anticuerpos. El efecto antitumoral de un conjugado de copolímero de HPMA, doxorrubicina y anticuerpos de Intraglobina o Endobulina también se verificó clínicamente [y otros 2003, 2005]. Los experimentos *in vivo* en ratones mostraron una actividad antitumoral elevada de otros conjugados dirigidos por anticuerpos monoclonales. En todos los casos, la DOX estaba unida a un portador polimérico a través de una secuencia de oligopéptido enzimáticamente escindible. En el monográfico de G.S. Kwon y el trabajo de J. Kopeček y otros [Kopeček y otros 2000, Kwon 2005] y otros [Kim 2003] se elabora muy bien un resumen de los resultados conseguidos hasta ahora en esta área].

Recientemente, se han publicado algunos estudios que tratan de los efectos de fármacos poliméricos, en los que la doxorrubicina cancerostática estaba unida a un portador polimérico preparada con una base de copolímeros de HPMA a través de enlaces de hidrazona (HIDRAZONA) hidrolíticamente inestables [Etrych y otros, y 2002, íhová y otros 2001, Ulbrich y otros 2003, 2004] y estas sustancias se patentaron en varias solicitudes de patente [Ulbrich y otros CZ 293886, Etrych y otros PA de 2005 y 2006, Chytila y otros PA de 2006]. Dichos fármacos mostraron una reducción significativa de los efectos secundarios, en particular de los efectos tóxicos, en un organismo sano con un incremento significativo simultáneo en el efecto antitumoral en comparación con los agentes citoestáticos utilizados habitualmente [Říhová y otros 2001, Kovář y otros 2004, Hovorka y otros 2002], incluso en comparación con el conjugado de PK1, tanto en una forma no dirigida como dirigida por un anticuerpo. Se observó que en el caso de la HIDRAZONA, el modo del efecto del agente cancerostático polimérico es diferente de los efectos de los conjugados del tipo PK1 y las células tumorales mueren, en particular, debido a la apoptosis [Hovorka y otros 2002, Kovář y otros 2004, Kovář y otros 2007].

El objetivo de la presente invención es una composición que comprende dos tipos de los fármacos poliméricos

mencionados anteriormente que difieren en el modo del efecto en las células tumorales, mezclados en proporciones que dan lugar a un efecto sinérgico de ambos tipos de fármacos y, de este modo, a un efecto antitumoral particularmente significativo con una toxicidad muy baja de un fármaco no específico. La producción de un efecto antitumoral autoestimulante es otro efecto significativo que acompaña a la terapia con la composición.

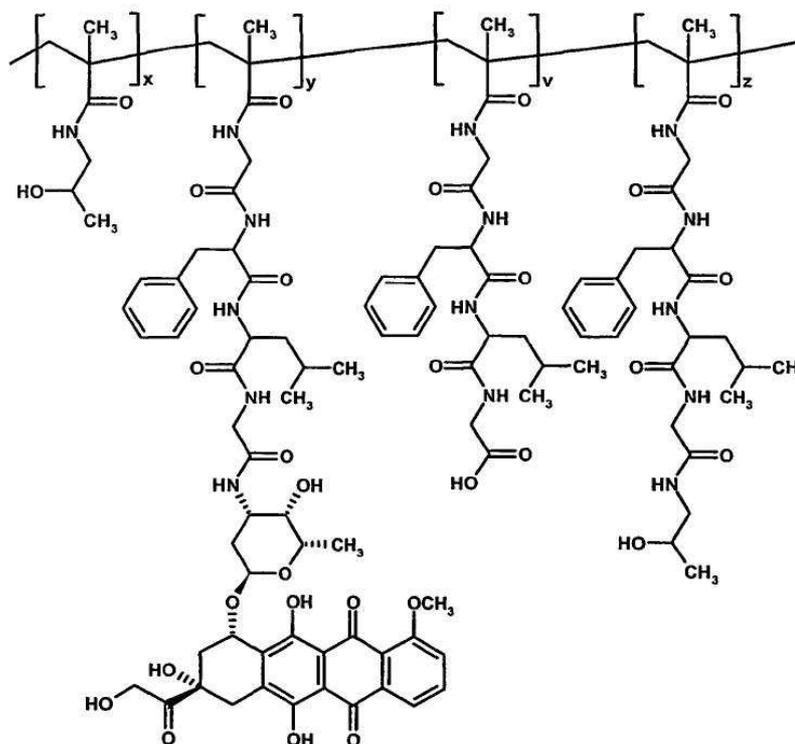
Descripción de la invención

La esencia de la presente invención es una composición que comprende conjugados poliméricos de dos componentes con doxorubicina destinada al tratamiento de enfermedades tumorales que poseen una actividad antitumoral citotóxica significativa y, de manera simultánea, un efecto antitumoral autoestimulante.

El primer componente que forma la composición es un copolímero de HPMA (PK1), en el que el principio se basa en que la DOX está unida al portador polimérico a través de la secuencia del oligopéptido GlyPheLeuGly enzimáticamente escindible. La cadena polimérica comprende de 50 a 1000 unidades monoméricas que comprende del 80 al 99% molar de unidades de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), del 1 al 5% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con un enlace amida de la doxorubicina unida, del 0 al 10% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con un grupo carboxilo, del 0 al 10% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con el grupo 2-hidroxipropilamida, o del 0,5 al 10% molar de unidades del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con una molécula de anticuerpo no específico humano (Hulg, Endobulina, Intraglobina) o anticuerpo monoclonal (Erbitux, Herceptin).

El segundo componente es un copolímero de HPMA (HIDRAZONA, H), el principio del cual se basa en la DOX unida al portador polimérico a través de un espaciador que comprende un enlace hidrazona hidrolíticamente lábil sensible al pH. El copolímero comprende de 30 a 3.500 unidades monoméricas conectadas en una cadena polimérica lineal o ramificada formada por del 60 al 98,5% de unidades HPMA y, comprende además del 1 al 20% de unidades de hidrazonas metacrililadas de α -aminoácidos, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos terminados con la molécula de doxorubicina, del 0,5 al 15% de unidades de hidrazidas de hidrazonas metacrililadas de α -aminoácidos, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos o sus sales sódicas. El conjugado puede estar unido a del 0,5 al 5% de unidades de α -aminoácidos metacrililados, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos terminados con una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo monoclonal específico.

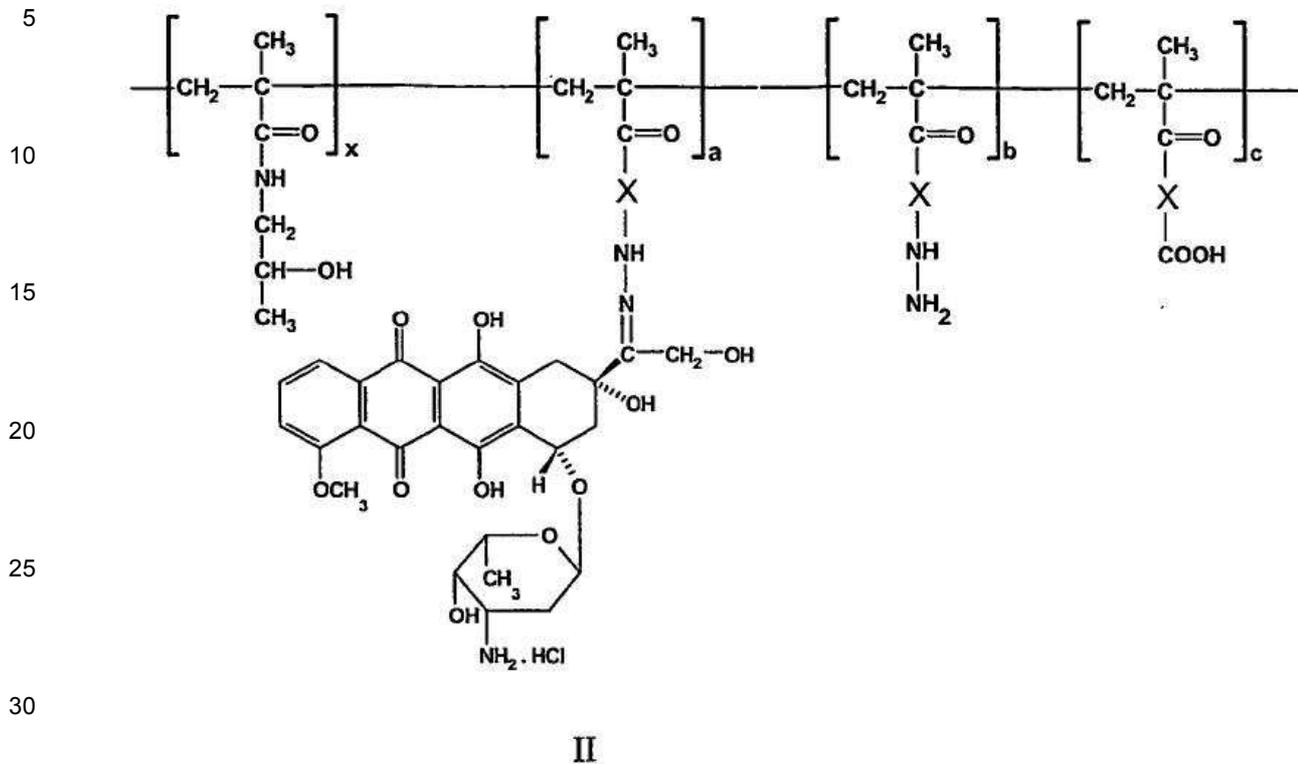
De manera preferente, la composición de la presente invención puede estar compuesta de dos componentes, el primero de los cuales se puede ilustrar mediante la fórmula I



I

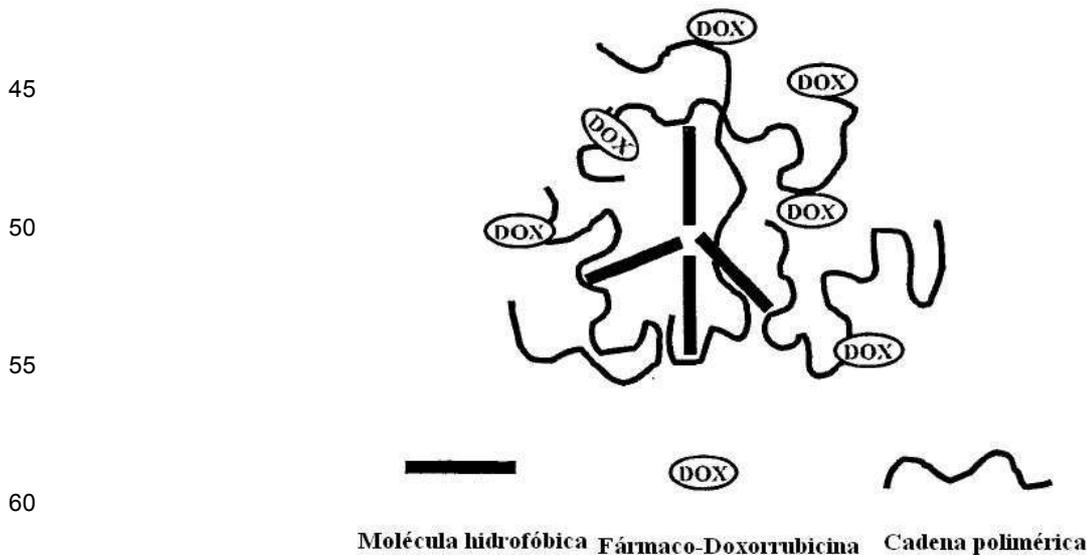
en la que x, y, v y z presentan los valores: x = 40 a 990; y = 1 a 50; v = 0 a 100 y z = 0 a 100.

El segundo componente se puede ilustrar mediante la fórmula II:



35 en la que los parámetros x, a, b, c presentan los valores: x = 20 a 3000; unidades A, a = 1 a 700; unidades B, b = 1 a 450 y unidades C, c = 1 a 450; X representa un enlace formado por un α -aminoácido, ϵ -aminoácido, aminoácido aromático u oligopéptido, de manera opcional en forma de sus sales sódicas.

40 El segundo componente también puede estar representado por una micela polimérica según el documento de patente de la República Checa PV 2006/207 [Chytil 2006]. El esquema de la micela polimérica se puede ilustrar mediante la fórmula III



65 La superficie hidrofílica de esta micela comprende un copolímero de HPMA del tipo I o II. El componente hidrofóbico

son carbohidratos alifáticos o cíclicos o sus derivados.

A la cadena principal de HPMA en ambos tipos de componente se pueden unir cadenas laterales. Dicho copolímero injertado se describe en detalle en la solicitud de patente de la República Checa PV 2006/592 [Etrych 2006]. La conexión entre la cadena lateral y la cadena principal se realiza en una célula tumoral a través de un enlace degradable.

Tanto la disposición en micelas como la disposición en un copolímero injertado permitirán una mejor penetración del conjugado en el tejido tumoral de tumores sólidos mediante el efecto EPR descrito anteriormente. Ambos tipos de conjugado se degradan, junto con una liberación simultánea del principio activo, hasta unidades poliméricas más pequeñas que se excretan fácilmente del cuerpo. Ambos efectos se describen en detalle en las respectivas solicitudes de patente de la República Checa PV 2006/2007 y PV 2006/592.

Según la presente invención, la composición se caracteriza por los componentes individuales (conjugados poliméricos) mezclados en el producto, de manera que la proporción resultante del peso de la doxorubicina unida mediante el enlace amida (PK) y la unida mediante el enlace hidrazona (H) se encuentra en una proporción de PK/H de 1:3 a 3:1, de manera preferente en la proporción 1:2 (calculada como la proporción de la cantidad del fármaco en los componentes individuales del sistema).

Breve descripción de los dibujos:

La figura 1 ilustra la supervivencia de ratones de la cepa B/6 con linfoma de células T EL 4 inoculado (s.c) tratados con una dosis de 15 mg de equivalente de DOX/kg de la composición (proporción en peso de fármaco en PK 1/H 1:2), el conjugado PK1 y el conjugado de hidrazina administrados mediante inyección (IV) en el día 8 después de la inoculación de las células tumorales.

La figura 2 ilustra la supervivencia de ratones de la cepa C57BL/6 con linfoma de células T EL 4 inoculado subcutáneamente tratados con una dosis de 10 mg de equivalente de DOX/kg de la composición administrada mediante inyección (IV) en el día 8 después de la inoculación de las células tumorales.

La figura 3 ilustra la supervivencia de ratones de la cepa C57BL6 con linfoma de células T EL 4 inoculado subcutáneamente tratados con una dosis de 5 ó 7,5 mg de equivalente de DOX/kg de la composición administrada mediante inyección (IV) en el día 9 después de la inoculación de las células tumorales.

La figura 4 ilustra la supervivencia de ratones de la cepa C57BL/6 curados del linfoma de células T EL 4 mediante la administración de la composición según el ejemplo 1 inoculado con una dosis letal del mismo tumor y sin tratamiento.

Ejemplos:

En los ejemplos se utilizaron los componentes mencionados anteriormente denominados PK1 e Hidrazona con la siguiente especificación:

PK1 comprendía el 95,2% molar ($x = 0,952$) de unidades de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), el 1,9% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con un enlace amida de la doxorubicina unida (fórmula I) ($y = 0,019$), el 2,9% molar ($z = 0,029$) del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacrililado terminado con el grupo 2-hidroxipropilamida (fórmula III). El contenido de unidades carboxilo fue mínimo ($v=0$) y su contenido se encontraba dentro de los límites de precisión de la medición. La hidrazona comprendía el 94,2% molar ($x = 0,942$) de unidades HPMA y también comprendía el 3,8% molar ($a = 0,038$) de unidades de hidrazona metacrililada de ácido 6-aminohexanoico terminado con una molécula de doxorubicina y el 2% molar ($b = 0,02$) de unidades de ácido 6-aminohexanoico metacrililado.

El contenido de las unidades con carboxilo (c) estaba de nuevo dentro de los límites de error de la medición.

Ejemplo 1

Se inocularon de manera subcutánea 1×10^5 células del linfoma de células T EL 4 a hembras de la cepa C57BL/ 6. Después de 8 días de incubación cuando el tumor se hizo palpable (con un tamaño de 120-150 mm³), se administró de manera intravenosa a los animales una dosis de una solución de la composición en la proporción 1:2 del contenido en peso de doxorubicina en los conjugados PK1 e Hidrazona PK, una solución del conjugado PK1 e Hidrazona en 0,2 ml de solución salina, de manera que la concentración final de doxorubicina correspondía siempre a la dosis de 15 mg de equivalente de DOX/kg. Se utilizó la solución salina como control (0,2 ml). El producto comprendía Hidrazona ($P_M = 34,7$ kDa, contenido de grupos hidrazida libres del 2% molar, contenido de DOX del 13,5% en peso) y conjugado PK1 ($P_M = 25$ kDa, contenido de secuencias GFLG del 4,9% molar y contenido de DOX del 6,6% en peso). Se observaron el crecimiento del tumor, el peso de los ratones y la supervivencia de los animales. En comparación con los ratones de control que murieron entre los días 24 y 31, en los ratones tratados se

inhibió el crecimiento del tumor, que era lo más destacable después de la administración de la composición. En el día 73, no se detectó el tumor en ninguno de los animales supervivientes tratados con la composición (7 ratones con una supervivencia larga de 8 ratones tratados). La eficacia del tratamiento con los conjugados PK1 solo y/o Hidrazona fue considerablemente inferior, lo cual se manifestó tanto en una inhibición considerablemente menor del crecimiento del tumor como en un menor número de animales supervivientes (3 supervivientes de 8 tratados), véase la figura 1. No se observó una toxicidad secundaria reflejada en una pérdida de peso con ninguno de los conjugados o la composición.

Ejemplo 2

Se inocularon de manera subcutánea 1×10^5 células del linfoma murino de células T EL 4 a hembras de la cepa C57BL/6. Después de 8 días de incubación cuando el tumor se hizo palpable con un tamaño de 100-150 mm³, se administró a los animales una dosis intravenosa de una solución de la composición de tres constituciones diferentes (con diferentes proporciones de PK1 e Hidrazona mezclados, de manera que la proporción resultante del fármaco en el producto era de PK/H en las proporciones 2:1, 1:1 y 1: 2) en 0,2 ml de solución salina, de manera que la concentración final correspondía siempre a la dosis total de 10 mg de equivalente de DOX/kg. La composición comprendía Hidrazona ($P_M = 34,7$ kDa, contenido de grupos hidrazida libres del 2% molar, contenido de DOX del 13,5% en peso) y conjugado PK1 ($P_M = 25$ kDa, contenido de secuencias GFLG del 4,9% molar y contenido de DOX del 6,6% en peso). En comparación con los ratones de control, que murieron entre los días 24 y 35, se inhibió de manera significativa el crecimiento de tumores en los ratones tratados y, a continuación, se curaron los ratones con eficacia dependiendo de la composición del producto. Con la composición de PK/H 1:1, 7 de los 8 animales experimentales sobrevivieron a largo plazo. Con la composición de PK/H 1:2, 4 de 4 ratones sobrevivieron a largo plazo, igualmente con la proporción PK/H 2:1. Con esta dosis inferior no es posible curar ningún animal en el mismo régimen terapéutico que con el conjugado PK1; se puede conseguir la misma eficacia del tratamiento con el conjugado de Hidrazona sólo con la dosis de 25 mg de equivalente de DOX/kg y superiores.

Ejemplo 3

Se aplicó una composición de la misma constitución que en el ejemplo 2 a hembras de la cepa C57BL/6 que portaban un tumor inoculado de linfoma murino de células T EL 4 (1×10^5 células) en el día 9 después de la inoculación en una cantidad de 5 y 7,5 mg de equivalente de DOX/kg. Incluso esta dosis inferior del fármaco activo, dependiendo de la constitución y la dosis de la composición, dio lugar a una curación a largo plazo de un porcentaje significativo de animales tratados (27-75 %). Al igual que en el ejemplo 1, no es posible curar animales experimentales con el conjugado PK1 con una dosis tan baja administrada en el mismo régimen terapéutico. Para curar aproximadamente el 25% de los animales experimentales, se debe utilizar la dosis de 25 mg de equivalente de DOX/kg y superiores. Se puede conseguir la misma eficacia del tratamiento con el conjugado de Hidrazona (siete de ocho animales) sólo con la dosis de aproximadamente 25 mg de equivalente de DOX/kg y superiores.

Ejemplo 4:

En el día 73 después de la administración del primer trasplante del linfoma murino de células T EL 4 se volvieron a trasplantar hembras de ratones endogámicos de la cepa C57BL/6 curados mediante la administración de la composición tal como se menciona en el ejemplo 1, con una dosis letal (1×10^5 células) de las mismas células tumorales y se dejaron sin administración de la composición. El grupo de control consistía en ratones convencionales a los que se administró la misma dosis de células tumorales. Se observó el crecimiento del tumor y se registró la supervivencia a largo plazo (% de los denominados LTS = supervivientes a largo plazo). Aunque los ratones de control murieron entre los días 28 y 43, el 57% de los ratones del grupo curados mediante la administración de la composición según el ejemplo 1 y vueltos a trasplantar con las mismas células tumorales, sobrevivieron durante 60 días y más. Esta supervivencia a largo plazo de la dosis letal de las células tumorales sin quimioterapia puede explicarse únicamente por el hecho de que con el tratamiento eficaz con la composición según el ejemplo 1, el sistema inmunitario se estimula simultáneamente y protege de manera eficaz los animales vueltos a trasplantar del desarrollo de tumores.

Referencias:

R. Duncan, J.B. Lloyd, J. Kopeček, P. Rejmanová, J. Strohalm, K. Ulbrich, B. Říhová, V. Chytrý, Synthetic Polymeric Drugs ("Fármacos poliméricos sintéticos"). Patente de la República Checa PV 0095/1985

T. Etrych, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich, 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 a través de un enlace sensible al pH. Síntesis, propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo*") J. Controlled Rel. 73, 89-102 (2001)

T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, 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 a través de un enlace de hidrazona. Efecto del espaciador

- en la liberación de fármacos y la citotoxicidad *in vitro*). *Macromolecular Biosci.* 2, 43-52 (2002)
- 5 T. Etrych, K. Ulbrich, P. Chytil, M. Studenovský, M. Pechar, Způsob přípravy polymerních konjugátů doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva. Patente de la República Checa PV 524-2005
- T. Etrych, P. Chytil, M. Pechar, M. Studenovský, B. Říhová a K. Ulbrich, Způsob přípravy polymerních konjugátů doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva. Patente de la República Checa PV 2005-558
- 10 T. Etrych, K. Ulbrich: Způsob přípravy polymerních konjugátů doxorubicinu s pH-řízeným uvolňováním léčiva. Method of preparing polymeric conjugates of doxorubicin with pH-regulated release of the drug ("Procedimiento de preparación de conjugados poliméricos de doxorubicina con una liberación del fármaco regulada por el pH"). Patente de la República Checa PV-2006-505
- 15 T. Etrych, P. Chytil, K. Ulbrich, T. Mrkvan, B. Říhová, Roubované vysokomolekulární konjugáty doxorubicinu s protinádorovou aktivitou a způsob jejich výroby, PV 2006 – 592
- O. Hovorka, T. Etrych, M. Šubr, J. Strohalm, K. Ulbrich, B. Říhová, Differences in the Intracellular Fate of Free and Polymer-Bound Doxorubicin ("Diferencias en el destino intracelular de doxorubicina libre y unida a polímero"). *J. Controlled Release* 80, 101-117 (2002)
- 20 P. Chytil, T. Etrych, M. Hrubý, K. Ulbrich, B. Říhová: Micelární nosiče léčiv s protinádorovou aktivitou. Patente de la República Checa PV 2006-207
- M. Jelínková, J. Strohalm, T. Etrych, K. Ulbrich, B. Říhová, Starlike versus Classic Macromolecular Prodrugs: Two Different Antibody-Targeted HPMA Copolymers of Doxorubicin Studied In Vitro and In Vivo as Potential Anticancer Drugs ("Profármacos macromoleculares novedosos y clásicos: dos copolímeros diferentes de HPMA con doxorubicina dirigidos a anticuerpo estudiados *in vitro* e *in vivo* como potenciales fármacos anticancerígenos"). *Pharm. Res.* 20, 1556-1564 (2003)
- 25 J.A. Kim, Targeted Therapies for the treatment of cancer ("Terapias dirigidas para el tratamiento del cancer"). *Am. J. Surgery* 186, 264-268 (2003)
- M. Kissel, P. Peschke, V. Šubr, K. Ulbrich, J. Schuhmacher, J. Debus, E. Friedrich, Synthetic Macromolecular Drug Carriers: Biodistribution of Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] and its Accumulation in Solid Rat Tumors ("Portadores sintéticos de fármacos macromoleculares: biodistribución de poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] y su acumulación en tumores sólidos de rata"). *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 55, 191- 201 (2001)
- 35 J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z. Lu, HPMA Copolymer-Anticancer Drug Conjugates: Design, Activity, and Mechanism of Action ("Conjugados de copolímeros y fármacos anticancerígenos: diseño, actividad y mecanismo de acción"). *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 50, 61 - 81 (2000)
- M. Kovář, L.Kovář, V. Šubr, T. Etrych, K. Ulbrich, T. Mrkvan, J. Loucká y B. Říhová, HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound by Proteolytically or Hydrolytically Cleavable Bond: Comparison of Biological Properties In Vitro ("Copolímeros de HPMA que contienen doxorubicina unida por un enlace proteolítica o hidrolíticamente escindible: comparación de propiedades biológicas *in vitro*"). *J. Controlled Release* 99, 301-314 (2004)
- 45 L. Kovář, J. Strohalm, P. Chytil, T. Mrkvan, M. Kovář, O. Hovorka, K. Ulbrich, B. Říhová, The same drug but a different mechanism of action: comparison of free doxorubicin with two different N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer- bound doxorubicin conjugates in EL-4 cancer cell line ("El mismo fármaco, pero un mecanismo de acción diferente: comparación de la doxorubicina libre con dos conjugados diferentes de doxorubicina unida al copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida en la línea celular cancerosa EL-4"). *Bioconjugate Chemistry*, 18, 894-902 (2007)
- G.S. Kwon, *Polymeric Drug Delivery Systems, Series: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Volumen 148*, Dekker, Marcel Incorporated, 2005
- 55 T. Lammers, R. Kühnlein, V. Šubr, K. Ulbrich, G. Storm, P. Peschke, P. Huber, Effect of intratumoral injection on the biodistribution and therapeutic potential of HPMA copolymers ("Efecto de la inyección intratumoral en la biodistribución y el potencial terapéutico de copolímeros de HPMA"). *Neoplasia* 8, 788 - 795 (2006)
- 60 T. Lammers, R. Kühnlein, M. Kissel, V. Šubr, T. Etrych, R. Pola, M. Pechar, K. Ulbrich, G. Storm, P. Huber, P. Peschke: Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers ("Efecto de la modificación fisicoquímica en la biodistribución y la acumulación tumoral de copolímeros de HPMA"). *J. Controlled Release* 110, 103-118 (2005)
- 65 H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review ("Permeabilidad vascular tumoral y el efecto EPR en agentes terapéuticos

- macromoleculares: una revisión”). J Control Release 65, 271-284 (2000).
- 5 B. Říhová, M. Jelínková, J. Strohalm, M. Št'astný, M. Hovorka, D. Plocová, M. Kovář, L. Drábelová, K. Ulbrich, The Anti-proliferative effect of Lectin- and Anti-Thy-1.2 Antibody-targeted HPMA Copolymer-bound Doxorubicin on Primary and Methastatic Human Colorectal Carcinoma and on Human Colorectal Carcinoma Transfected with Mouse Thy-1.2 Gene (“Efecto antiproliferativo de la doxorubicina unida a copolímero HPMA dirigida a lectina y anticuerpo contra Thy-1.2 en el carcinoma colorrectal humano primario y metastático y en el carcinoma colorrectal humano con el gen Thy-1.2 de ratón”). Bioconjugate Chemistry, 11, 664-673 (2000)
- 10 B. Říhová, T. Etrych, M. Pechar, M. Jelínková, M. Št'astný, O. Hovorka, M. Kovář, 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 (“La doxorubicina unida a un portador de copolímero de HPMA a través de un enlace hidrazona es también eficaz en una línea celular cancerosa con un contenido limitado de lisosomas”). J. Controlled Release 74, 225-232 (2001)
- 15 Říhová, J. Strohalm, K. Kubáčková, M. Jelínková, L. Rozprimová, M. Šírová, D. Plocová, T. Mrkvan, M. Kovář, J. Pokorná, T. Etrych, K. Ulbrich, Drug-HPMA-Hulg Conjugates Effective Against Human Solid Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology (“Conjugados de fármaco-HPMA-Hulg eficaces contra el cancer sólido humano. Avances en la medicina y biología experimental”), Volumen 19. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Maeda et al Eds., Nueva York, 125 - 143 (2003a)
- 20 B. Říhová, K. Kubáčková, Clinical Implications of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers (“Implicaciones clínicas de copolímeros de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida”). Current Pharmaceut. Biotech. 4, 311- 322 (2003b)
- 25 B. Říhová, J. Strohalm, M. Kovář, T. Mrkvan, V. Šubr, O. Hovorka, M. Šírová, L. Rozprimová, K. Kubáčková, K. Ulbrich, Induction of Systemic Antitumor Resistance with Targeted Polymers (“Inducción de la resistencia antitumoral sistémica con polímeros dirigidos”). Scandinavian J. Immunology 62, 100 - 105 (2005)
- 30 M, Šírová, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, T. Mrkvan, K. Ulbrich, B. Říhová, Treatment with HPMA copolymer based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces systemic and long-lasting anti-tumor immunity in mice (“El tratamiento con un conjugado de doxorubicina basado en un copolímero de HPMA que contiene inmunoglobulina humana induce una inmunidad antitumoral sistémica y duradera en ratones”). Cancer Immunol. Immunother. 56, 35-47 (2007)
- 35 K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules I. Synthesis and Physicochemical Characterisation (“Fármacos poliméricos basados en conjugados de macromoléculas sintéticas y naturales I. Síntesis y caracterización físicoquímica”). J. Controlled Rel. 64, 63-79 (2000)
- 40 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with pH-Controlled Activation (“Conjugados de polímero y doxorubicina dirigidos a anticuerpo con actividad controlada por el pH”). J. Drug Targeting, 12, 477-490 (2004)
- 45 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelínková, B. Říhová, HPMA Copolymers with pH-Controlled Release of Doxorubicin. In vitro Cytotoxicity and in vivo Antitumor Activity (“Copolímeros de HPMA con liberación de la doxorubicina controlada por el pH. Citotoxicidad *in vitro* y actividad antitumoral *in vivo*”). J. Controlled Release 87, 33-47 (2003)
- 50 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Pechar, M. Jelínková, B. Říhová, Polymeric Anticancer Drugs with pH-Controlled Activation (“Fármacos anticancerígenos poliméricos con activación controlada por el pH”). Int. J. Pharm. 277/1-2 67-72 (2004)
- 55 K. Ulbrich, T. Etrych, B. Říhová, M. Jelínková, M. Kovář: pH Senzitivni polymerní konjugáty doxorubicinu pro cílenou terapii. Patente de la República Checa 293886, solicitud de patente europea 06025316.8-1216

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que presenta una actividad antitumoral citotóxica importante y un efecto antitumoral autoestimulante simultáneo, con el principio activo doxorubicina, en la que la composición comprende dos componentes, en la que:
- 10 a) el primer componente que forma la composición es un copolímero de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA) denominado PK1, en el que la doxorubicina está unida al portador polimérico a través de la secuencia del oligopéptido GlyPheLeuGly enzimáticamente escindible, en el que la cadena polimérica comprende de 50 a 1.000 unidades monoméricas que comprende del 80 al 99% molar de unidades de N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida (HPMA), del 1 al 5% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacriloilado terminado con un enlace amida de la doxorubicina unida, del 0 al 10% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacriloilado terminado con un grupo carboxilo, del 0 al 10% molar del oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacriloilado terminado con el grupo 2-hidroxiopropilamida y, de manera opcional, del 0,5 al 10% molar de unidades de un oligopéptido (GlyPheLeuGly) metacriloilado terminado con una molécula de un anticuerpo no específico humano, tal como HuIg, Endobulina, Intraglobina, o anticuerpo monoclonal, tal como Erbitux, o Herceptin;
- 15 b) el segundo componente es un copolímero de HPMA denominado H, en el que la doxorubicina está unida al portador polimérico a través de un espaciador que comprende un enlace hidrazona hidrolíticamente lábil sensible al pH, que comprende de 30 a 3.500 unidades monoméricas conectadas en una cadena polimérica lineal o ramificada formada del 60 al 98,5% de unidades de HPMA y comprende además del 1 al 20% de unidades de hidrazonas metacriloiladas de α -aminoácidos, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos terminados con una molécula de doxorubicina, del 0,5 al 15% de unidades de hidrazidas de hidrazonas metacriloiladas de α -aminoácidos, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos o sus sales sódicas, y, de manera opcional, del 0,5 al 5% de unidades de α -aminoácidos metacriloilados, ϵ -aminoácidos, aminoácidos aromáticos u oligopéptidos terminados con una molécula de una inmunoglobulina o un anticuerpo monoclonal específico.
- 20 2. Composición, según la reivindicación 1, **caracterizada por el hecho de que** los componentes están mezclados, de manera que la dosis resultante de doxorubicina del primer componente PK1 en el que está unido la doxorubicina mediante un enlace amida y el segundo componente H en el que está unido mediante un enlace hidrazona se encuentra en una proporción en peso PK1/H de 1:3 a 3:1.
- 30 3. Composición, según la reivindicación 2, **caracterizada por el hecho de que** los componentes se encuentran en una proporción tal que la dosis resultante de PK1/H con doxorubicina se encuentra en una proporción en peso 1:2.
- 35 4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por el hecho de que**, como mínimo, uno de los componentes está formado por un sistema de micelas poliméricas, la superficie hidrofílica de las cuales comprende un copolímero de HPMA, mientras que el núcleo hidrofóbico está formado por carbohidratos C₉ a C₃₀ alifáticos, o sus derivados, o está formado por carbohidratos C₆ a C₃₀ cíclicos o policíclicos.
- 40 5. Composición, según la reivindicación 4, **caracterizada por el hecho de que** la molécula hidrofóbica se selecciona del grupo que comprende acilos de ácidos grasos C₁₀ a C₁₈, o ácidos grasos insaturados o los ácidos cólico, colánico (5 β -colano-24-oico) o 7-deshidrocólico.
- 45 6. Composición, según la reivindicación 4, **caracterizada por el hecho de que** la molécula hidrofóbica se selecciona del grupo que comprende ésteres de colesterol o 7-deshidrocolesterol, colestanol, vitamina D o alcoholes alifáticos con cadenas C₉ a C₁₈.
- 50 7. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por el hecho de que** la estructura, como mínimo, de uno de los componentes comprende la cadena principal de HPMA que contiene el principio activo y las cadenas laterales de injertos de HPMA que, de manera opcional, también pueden contener el principio activo, estando dichos injertos conectados a la cadena principal a través de un enlace escindible en una célula tumoral.
- 55 8. Composición, según la reivindicación 7, **caracterizada por el hecho de que** el peso molecular del componente que comprende cadenas laterales se encuentra entre 50.000 y 400.000 g/mol.
9. Composición, según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada por el hecho de que** los enlaces que unen la cadena principal y las cadenas laterales son degradables de una manera enzimática o reductora.

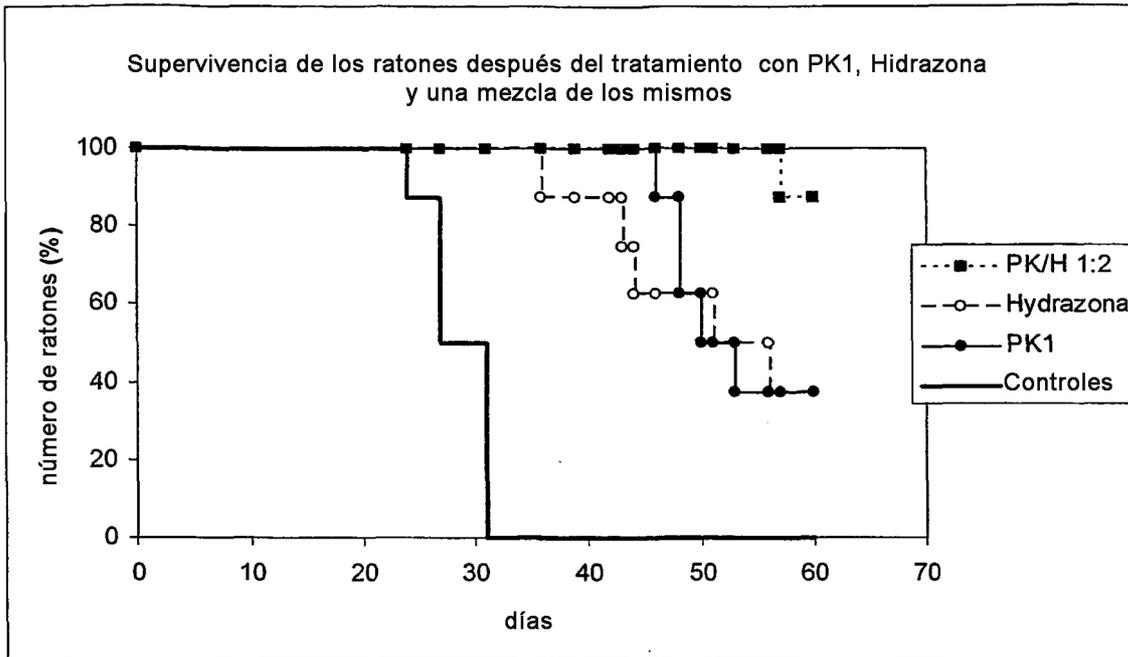


Fig. 1

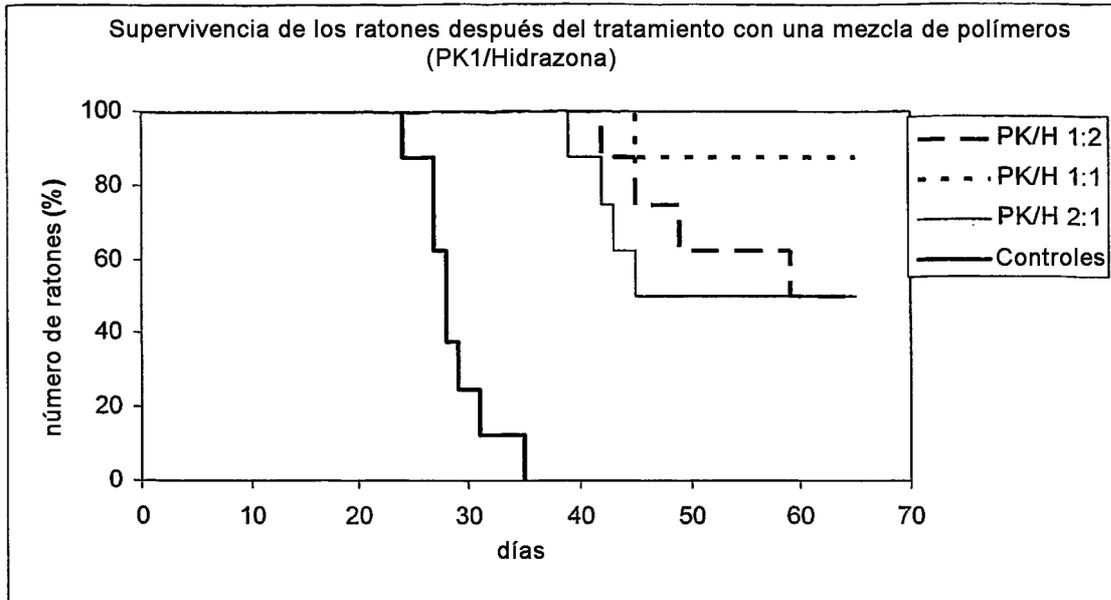


Fig. 2

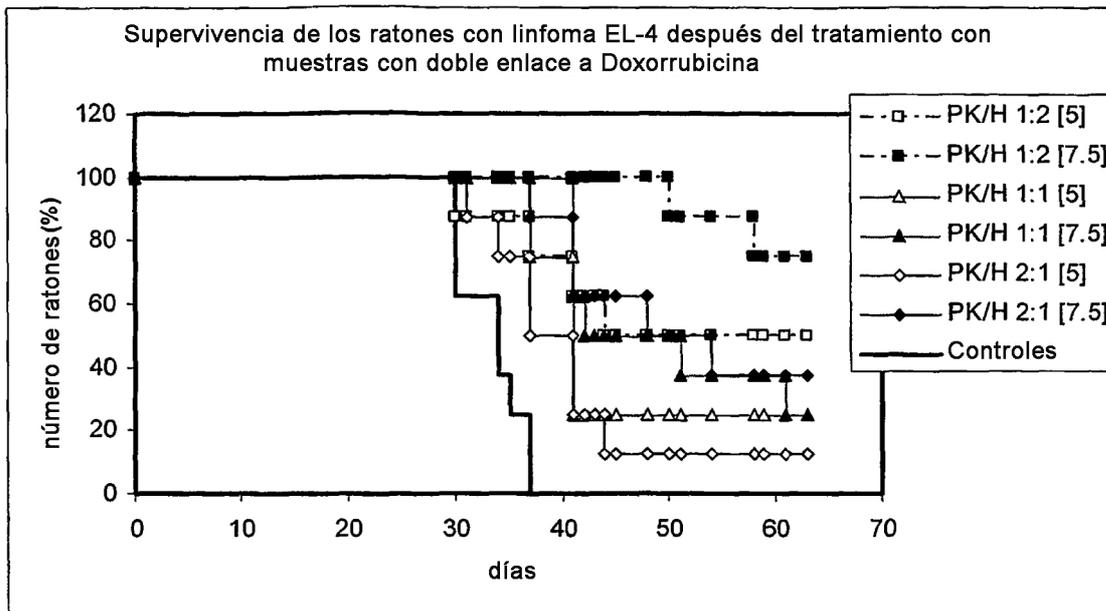


Fig. 3

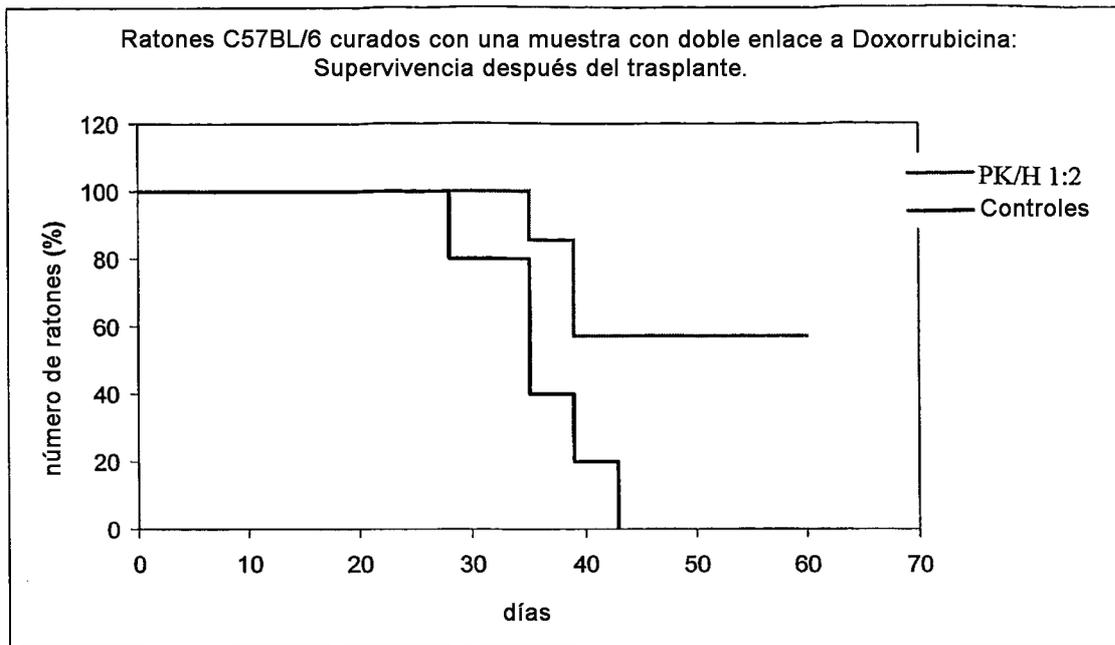


Fig. 4