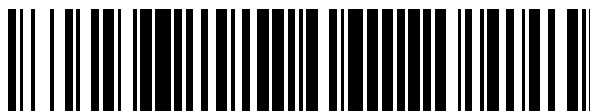


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 467**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/335** (2006.01)  
**A61M 36/00** (2006.01)  
**A01N 43/02** (2006.01)  
**C07D 305/00** (2006.01)  
**A61K 51/04** (2006.01)  
**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: **11.03.1997 E 05028731 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1683520**

54 Título: **Profármacos solubles en agua**

30 Prioridad:

**12.03.1996 US 13184**

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

**14.03.2014**

73 Titular/es:

**PG-TXL COMPANY, L.P. (100.0%)  
3324 PITTSBURG STREET  
HOUSTON, TX 77005, US**

72 Inventor/es:

**LI, CHUN;  
WALLACE, SYDNEY;  
YU, DONG-FANG y  
YANG, DAVID J.**

74 Agente/Representante:

**FÀBREGA SABATÉ, Xavier**

**ES 2 448 467 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

Profármacos solubles en agua.

## Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de las composiciones farmacéuticas para usarse en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunes y reestenosis. La presente invención también se refiere al campo de las preparaciones farmacéuticas de agentes antineoplásicos tales como paclitaxel (Taxol) y docetaxel (Taxotere), en particular a hacer paclitaxel soluble en agua conjugando el fármaco con restos solubles en agua.

## Antecedentes de la invención

10 Paclitaxel, un agente antimicrotubular extraído de las hojas acículas y de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, ha mostrado un efecto antineoplásico extraordinario en el cáncer humano en estudios de fase I y en estudios preliminares de fase II y III (Horwitz *et al.*, 1993). Esto se ha informado principalmente en cáncer ovárico y de mama avanzados. Se ha documentado una actividad significativa en cáncer de pulmón microcítico o no microcítico, cáncer de cabeza y cuello, y en melanoma metastásico. Sin embargo, una dificultad importante en el desarrollo de paclitaxel para el uso en estudios clínicos ha sido su insolubilidad en agua.

15 Docetaxel se produce de forma semisintética a partir de 10-desacetil baccatina III, un precursor no citotóxico extraído de las hojas acículas de *Taxus baccata* y esterificado con una cadena lateral sintetizada químicamente (Cortes y Pazdur, 1995). Se ha demostrado que diversas líneas celulares cancerosas, que incluyen cáncer de mama, de pulmón, ovárico y colorrectal y melanomas, responden a docetaxel. Se ha usado docetaxel en ensayos clínicos para conseguir respuestas completas o parciales en cáncer de mama, ovárico, y de cabeza y cuello, y en melanoma maligno.

20 Paclitaxel se formula típicamente como una disolución concentrada que contiene 6 mg de paclitaxel por mililitro de Cremophor EL (aceite de ricino polioxetilado) y alcohol deshidratado (50% v/v), y se debe diluir adicionalmente antes de la administración (Goldspiel, 1994). La cantidad de Cremophor EL necesaria para administrar las dosis necesarias de paclitaxel es significativamente mayor que la administrada con cualquier otro fármaco que se formula en Cremophor. Se han atribuido diversos efectos tóxicos a Cremophor, que incluyen vasodilatación, disnea e hipotensión. Se ha demostrado también que este vehículo provoca hipersensibilidad grave en animales de laboratorio y humanos (Weiss *et al.*, 1990). En realidad, la dosis máxima de paclitaxel que se puede administrar a ratones mediante inyección rápida i.v. está impuesta por la toxicidad aguda letal del vehículo de Cremophor (Eiseman *et al.*, 1994). Además, se sabe que Cremophor EL, un tensoactivo, lixivia plastificantes de ftalato tales como di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) de las bolsas y los tubos de administración intravenosa de poli(cloruro de vinilo). Se sabe que DEHP provoca hepatotoxicidad en animales y es carcinógeno en roedores. También se demuestra que esta preparación de paclitaxel forma materia particulada con el tiempo, y así es necesaria la filtración durante la administración (Goldspiel, 1994). Por lo tanto, son necesarias condiciones especiales para la preparación y administración de disoluciones de paclitaxel para asegurar la administración segura del fármaco a los pacientes, y estas condiciones conducen de forma inevitable a costes superiores.

40 Los intentos anteriores para obtener paclitaxel hidrosoluble han incluido la preparación de profármacos de paclitaxel colocando restos solubilizantes, tales como succinato y aminoácidos, en el grupo 2'-hidroxilo o en la posición 7'-hidroxilo (Deutsch *et al.*, 1989; Mathew *et al.*, 1992). Sin embargo, no se ha probado que estos profármacos sean lo suficientemente estables químicamente para su desarrollo. Por ejemplo, Deutsch *et al.* (1989) informan de un derivado 2'-succinato de paclitaxel, pero la solubilidad en agua de la sal sódica es solamente alrededor del 0,1%, y las sales de trietanolamina y N-metilglucamina fueron solubles solamente al 1%. Además, se informó que los ésteres de aminoácidos eran inestables. Mathew *et al.* (1992) informaron de resultados similares. Greenwald *et al.* informaron la síntesis de ésteres de 2' y 7'-polietilenglicol de taxol sumamente hidrosolubles (Greenwald *et al.*, 1994), sin embargo, no se informó de los datos concernientes a la actividad antitumoral *in vivo* de estos compuestos (Greenwald *et al.* 1995).

50 Otros intentos para resolver estos problemas han implicado la microencapsulación de paclitaxel tanto en liposomas como en nanoesferas (Bartoni y Boitard, 1990). Se informó que la formulación de liposomas era tan efectiva como paclitaxel libre, sin embargo solamente las formulaciones de liposomas que contenían menos del 2% de paclitaxel fueron estables físicamente (Sharma y Straubinger, 1994). Desgraciadamente, se demostró que la formulación de nanoesferas era tóxica. Por lo tanto, existe todavía la necesidad de una formulación de paclitaxel hidrosoluble que pueda administrar cantidades eficaces de paclitaxel y docetaxel sin las desventajas provocadas por la insolubilidad del fármaco.

55 La solicitud US 4.356.166 así como los siguientes artículos

Zumino F et al. "Poly(carboxylic acid) polymers as carriers for anthracyclines", Journal of Controlled Release, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 10, n.º. 1, 1 de octubre de 1989 (1989-10-01), páginas 65 a 73, XP023744779 ISSN: 0168-3659 [recuperado el 1989-10-01]

5 WO 88/00837 A (Battelle Memorial Institute [CH] Battelle Memorial Institute [US]) 11 de febrero de 1988 (1988-02-11)

Morimoto Y. et al: "Antitumor Agent Poly(Amino Acid) Conjugates as a Drug Carrier in Cancer Chemotherapy" Journal of Pharmacobio-Dynamics, Tokio, JP, vol 7, n.º. 9, 1 de septiembre de 1984 (1984-09-01), páginas 688 a 698, XP002048432 ISSN: 0386-846X

10 Hurwitz E. et al: "Soluble Macromolecules as Carriers for Daunirubicin" Journal of Applied Biochemistry, Academic Press, Londres, GB, vol. 2, 01 de enero de 1980 (1980-01-01), páginas 25 a 35, XP000983827 ISSN: 0161-7354

describen el uso de diferentes fármacos antitumorales en uso terapéutico.

15 Otro obstáculo del uso generalizado de paclitaxel son los recursos limitados a partir de los que se produce paclitaxel, lo que provoca que la terapia con paclitaxel sea cara. Un tratamiento puede costar varios miles de dólares, por ejemplo. Existe la desventaja añadida de que no todos los tumores responden a la terapia con paclitaxel, y esto puede ser debido a que paclitaxel no esté llegando al tumor. Existe una necesidad inmediata, por lo tanto, de formulaciones eficaces de paclitaxel y fármacos relacionados que sean hidrosolubles con semividas séricas largas para el tratamiento de tumores, enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, así como para la  
20 prevención de la reestenosis de los vasos sanguíneos sometidos a traumatismos, tales como angioplastia y colocación de mallas/stents??.

### Resumen de la invención

25 La presente invención persigue superar estas y otras desventajas inherentes a la técnica anterior proporcionando composiciones que comprenden un fármaco quimioterápico y antiangiogénico, tal como paclitaxel o docetaxel, conjugado con un polímero hidrosoluble, tal como un ácido poliglutámico y en el que dicho polímero tiene un peso molecular a partir de 30.000 hasta 60.000, y una disolución excipiente farmacéuticamente aceptable. Se demuestra aquí que estas composiciones son sorprendentemente eficaces como agentes antitumorales contra modelos de tumores a título de ejemplo, y se espera que sean al menos tan eficaces como paclitaxel o docetaxel contra  
30 cualquiera de las enfermedades o trastornos para los que se sabe que los taxanos o taxoides son eficaces. Las composiciones de la invención proporcionan taxoides hidrosolubles para superar las desventajas asociadas a la insolubilidad de los fármacos solos, y también proporcionan la ventaja de liberación controlada, de forma que se demuestra aquí que los tumores se erradican en los modelos animales después de una única administración intravenosa.

35 Los procedimientos descritos aquí se podrían usar también para hacer conjugados con polímeros hidrosolubles de otros agentes terapéuticos y fármacos, que incluyen etopósido, tenipósido, camptotecina, epotilonas. En particular, los agentes con un grupo hidroxilo libre se conjugan con los polímeros mediante reacciones químicas similares a las descritas aquí para paclitaxel. Tal conjugación estaría dentro de la experiencia de un practicante rutinario de la técnica química, y como tal se encontraría dentro del alcance de la invención reivindicada. Aquellos agentes  
40 incluirían etopósido, tenipósido, camptotecina y las epotilonas. Como se usa aquí, conjugado con un polímero hidrosoluble significa la unión mediante enlace covalente del fármaco con el polímero. También se entiende que los conjugados hidrosolubles de la presente invención se pueden administrar junto con otros fármacos, que incluyen otros fármacos antitumorales o antineoplásicos. Tales combinaciones se conocen en la técnica. El paclitaxel o docetaxel hidrosoluble de la presente invención se puede combinar, en ciertos tipos de  
45 tratamiento, con un fármaco de platino, un antibiótico, tal como doxorubicina o daunorubicina, por ejemplo, u otros fármacos que se usan en combinación con Taxol.

50 La conjugación de fármacos quimioterápicos con polímeros es un enfoque atractivo para reducir la toxicidad sistémica y mejorar el índice terapéutico. Los polímeros con masa molecular superior de 30 kDa no difunden fácilmente a través del endotelio normal de los capilares y del glomérulo, evitando así al tejido normal la toxicidad irrelevante mediada por el fármaco (Maeda y Matsumura, 1989; Reynolds, 1995). Por otra parte, está bien establecido que los tumores malignos tienen a menudo un endotelio capilar alterado y una permeabilidad superior que la vasculatura tisular normal (Maeda y Matsumura, 1989; Fidler *et al.*, 1987). Así, un conjugado de polímero-  
55 fármaco que permanecería normalmente en la vasculatura se puede escapar de forma selectiva de los vasos sanguíneos hacia los tumores, lo que da como resultado la acumulación en el tumor del fármaco terapéutico activo. Además, los conjugados de polímero-fármaco pueden actuar como fármacos de liberación lenta para liberación sostenida, lo que produce una exposición prolongada al fármaco de las células tumorales. Finalmente, los polímeros hidrosolubles se pueden usar para estabilizar fármacos, así como para solubilizar compuestos de otra forma

insolubles. Actualmente, se ha examinado la capacidad de potenciar la administración de fármacos específicos de tumores en una diversidad de polímeros sintéticos y naturales (Kopecek, 1990, Maeda y Matsumura, 1989). Sin embargo, actualmente se está sometiendo a evaluación clínica solamente a unos pocos, que incluyen SMANCS en Japón y HPMA-Dox en el Reino Unido (Maeda, 1991; Kopecek y Kopeckova, 1993).

En la presente descripción, se entiende que un taxoide significa aquellos compuestos que incluyen paclitaxel y docetaxel, y otros productos químicos que tienen el esqueleto de taxano (Cortes y Pazdur, 1995), y se pueden aislar de fuentes naturales tales como el tejo, o de cultivo celular, o de moléculas sintetizadas químicamente, y se prefiere un producto químico de la fórmula química general  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , que incluye éster 6,12b,bis(acetiloxi)-12-(benzoiloxi)-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodecahidro-4,11-dihidroxi-4a,8,13,13-tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1H-ciclodeca[3,4]benz-[1,2-b]oxet-9-ílico del ácido [2aR-[2a $\alpha$ ,4 $\beta$ ,4a $\beta$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ ( $\alpha$ R\*, $\beta$ S\*)],11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,12a $\alpha$ ,12b $\alpha$ ,]]- $\beta$ -(benzoilamino)- $\alpha$ -hidroxibencenpropanoico. Se entiende que paclitaxel y docetaxel son cada uno más efectivos que el otro contra ciertos tipos de tumores, y que en la práctica de la presente invención los tumores que son más susceptibles a un taxoide particular se tratarían con ese conjugado de taxoide hidrosoluble.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se puede conjugar paclitaxel o docetaxel con un polímero hidrosoluble, y preferiblemente el polímero se conjuga con el 2' ó el 7-hidroxilo, o ambos, de paclitaxel o docetaxel. Así, cuando se usan grupos funcionales para la conjugación del fármaco, como anteriormente con el C2'-hidroxilo de paclitaxel, se usa una unión degradable, en este caso un éster, para asegurar que el fármaco activo se libera del vehículo polimérico. Los polímeros preferibles incluyen poli(ácido 1-glutámico), poli(ácido d-glutámico), poli(ácido dl-glutámico). Los ácidos poliglutámicos o ácidos poliaspárticos de la presente invención tienen preferiblemente un peso molecular de alrededor de 30.000 a alrededor de 60.000.

Se entiende que las composiciones de la presente invención se pueden dispersar en una disolución excipiente farmacéuticamente aceptable como se describe más adelante. Tal disolución sería estéril o aséptica, y puede incluir agua, tampones, agentes isotónicos u otros ingredientes conocidos para los expertos en la técnica que no provocarían reacción alérgica u otra reacción dañina cuando se administran a un sujeto animal o humano. Por lo tanto, la presente invención se puede describir también como una composición farmacéutica que comprende un fármaco quimioterápico o antineoplásico tal como paclitaxel o docetaxel conjugado con un polímero hidrosoluble de peso molecular alto. La composición farmacéutica puede incluir ácidos poliglutámicos.

La presente invención se puede describir también en ciertas realizaciones como un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto. Este procedimiento incluye obtener una composición que comprende un fármaco quimioterápico tal como paclitaxel o docetaxel conjugado con un polímero hidrosoluble y dispersado en una disolución farmacéuticamente aceptable, y administrar la disolución al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el tumor. Las composiciones preferidas comprenden paclitaxel o docetaxel conjugado con un ácido poliglutámico, y más preferiblemente con poli(ácido 1-glutámico). Se entiende que las composiciones de la invención son eficaces contra cualquier tipo de cáncer para el que se demuestre que el taxoide sin conjugar es eficaz, e incluiría, pero no se limitaría a, cáncer de mama, cáncer ovárico, melanoma maligno, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello o leucemia.

El procedimiento de tratamiento de un tumor puede incluir alguna predicción de la absorción de paclitaxel o docetaxel en el tumor antes de la administración de una cantidad terapéutica del fármaco o profármaco. Este procedimiento puede incluir cualquiera de las técnicas de formación de imágenes descritos anteriormente en el que se administra un metal quelado-agente quelante -paclitaxel a un sujeto y se detecta en un tumor. Este paso proporciona una forma rentable de determinar que no se esperaría que un tumor particular respondería a la terapia con DTPA-paclitaxel en aquellos casos en que el medicamento no entre en el tumor. Se contempla que si una técnica de imagen se puede utilizar para predecir la respuesta a paclitaxel y para identificar a los pacientes que no tienen probabilidades de responder, un gran gasto y tiempo crucial puede ser ahorrado al paciente. La suposición es que si no existe una cantidad razonable de agente quimioterápico depositado en el tumor, la probabilidad de respuesta tumoral a este agente es relativamente pequeña.

La presente invención se puede describir también en ciertos aspectos amplios como un procedimiento para disminuir al menos un síntoma de una enfermedad autoinmune sistémica, que comprende administrar a un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune sistémica una cantidad eficaz de una composición que comprende paclitaxel o docetaxel conjugado con poli(ácido 1-glutámico). Es de particular interés en el contexto de la presente descripción el tratamiento de artritis reumatoide, que se sabe que responde en algunos casos a taxol cuando se administra en la formulación de Cremophor estándar (patente de EE.UU. nº 5.583.153). Como en el tratamiento de tumores, se contempla que la eficacia de los taxoides hidrosolubles de la presente invención no disminuirá por la conjugación con un resto hidrosoluble, y que el profármaco hidrosoluble puede actuar como una formulación de liberación controlada que libera el fármaco activo a lo largo de un periodo de tiempo. Por lo tanto, se espera que las composiciones de la presente invención sean tan eficaces como Taxol contra artritis reumatoide, por ejemplo, pero tendrán la ventaja de una liberación controlada. También se entiende que las composiciones de taxoide de la presente invención se pueden usar en combinación con otros fármacos, tales como un inhibidor de la angiogénesis (AGM-1470) (Oliver *et al.*, 1994) o metotrexato.

El descubrimiento de que paclitaxel también inhibe la reestenosis después de angioplastia con globo indica que los paclitaxeles y docetaxeles hidrosolubles de la presente invención tendrán una diversidad de aplicaciones aparte de la administración parenteral directa (WO 9625176). Por ejemplo, se contempla que paclitaxel hidrosoluble será útil como recubrimiento para dispositivos médicos implantados, tales como tubos, derivaciones, catéteres, implantes artificiales, alambres, implantes eléctricos tales como marcapasos, y especialmente para estents arteriales o venosos, que incluyen estents expansibles con globo. En estas realizaciones se contempla que el paclitaxel hidrosoluble puede estar unido a un dispositivo médico implantable, o alternativamente, el paclitaxel hidrosoluble puede estar adsorbido de forma pasiva en la superficie del dispositivo implantable. Por ejemplo, los estents se pueden recubrir con conjugados de polímero-fármaco introduciendo el estent en la disolución de polímero-fármaco o pulverizando el estent con tal disolución. Los materiales adecuados para el dispositivo implantable deberían ser biocompatibles y atóxicos, y se pueden elegir de metales, tales como aleaciones de níquel-titanio, acero, o polímeros biocompatibles, hidrogeles, poliuretanos, polietilenos, copolímeros de acetato de etilvinilo, etc. En una realización preferida, el paclitaxel hidrosoluble, especialmente un conjugado de PG-paclitaxel, se recubre sobre un estent para inserción en una arteria o vena después de angioplastia con globo. La invención se puede describir, por lo tanto, en ciertos aspectos amplios como un procedimiento para inhibir la reestenosis arterial o la oclusión arterial después de traumatismo vascular, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende paclitaxel o docetaxel conjugado con poli(ácido 1-glutámico). En la práctica del procedimiento, el sujeto puede ser un paciente de revascularización coronaria, cirugía vascular, trasplante de órgano o angioplastia coronaria o arterial, por ejemplo, y la composición se puede administrar directamente, de forma intravenosa, o incluso recubierta sobre un estent, y el estent se implanta en el lugar de traumatismo vascular.

Una realización de la invención es, por lo tanto, un dispositivo médico implantable, en el que el dispositivo está recubierto con una composición que comprende paclitaxel o docetaxel conjugado con ácidos poliglutámicos en una cantidad efectiva para inhibir la proliferación de células musculares lisas. Un dispositivo preferido es un estent recubierto con las composiciones de la presente invención descritas aquí, y en ciertas realizaciones preferidas el estent se adapta para ser usado después de angioplastia con globo, y el recubrimiento es eficaz para inhibir la reestenosis.

En ciertas realizaciones preferidas, la invención se puede describir como una composición que comprende ácidos poliglutámicos conjugados con el 2' ó 7-hidroxilo o ambos de paclitaxel, o incluso una composición que comprende ácido poliaspártico conjugado con el 2' ó 7-hidroxilo o ambos de paclitaxel. Como se usa aquí, la expresión un ácido poliglutámico o ácidos poliglutámicos incluye poli(ácido 1-glutámico), poli(ácido d-glutámico) y poli(ácido dl-glutámico).

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el entendido normalmente por alguien de experiencia ordinaria en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque se puede usar cualesquier procedimientos y materiales que son similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación los procedimientos y materiales preferidos.

#### 40 **Breve descripción de los dibujos**

La fig. 1A. Estructura química de paclitaxel, PEG-paclitaxel y DTPA-paclitaxel.

La fig. 1B. Estructura química y esquema de reacción para la producción de PG-paclitaxel.

La fig. 2. Efecto de paclitaxel, PEG-paclitaxel y DTPA-paclitaxel sobre la proliferación de células de melanoma B 16.

45 La fig. 3. El efecto antitumoral de DTPA-paclitaxel en tumores mamarios MCA-4.

La fig. 4. El tiempo mediano (días) para alcanzar el diámetro del tumor de 12 mm después del tratamiento con paclitaxel, DTPA-paclitaxel y PEG-paclitaxel.

La fig. 5. Gammagrafía de ratones portadores de tumores MCA-4 después de la inyección intravenosa de <sup>111</sup>In-DTPA-paclitaxel e <sup>111</sup>In-DTPA. La flecha indica el tumor.

50 La fig. 6. Degradación hidrolítica de PG-paclitaxel tal como se determina en PBS a pH 7,4 a 37 °C. -- □ -- representa el porcentaje de paclitaxel que permanece unido a PG soluble, -- △ -- representa el porcentaje de paclitaxel liberado, -- ○ -- representa el porcentaje de metabolito-1 producido.

La fig. 7A. El efecto antitumoral de PG-paclitaxel en ratas portadoras de tumor de mama murino (13762F). - □ - representa la respuesta a una dosis intravenosa única de PG (0,3 g/kg); -Δ- representa la respuesta a paclitaxel (40 mg/kg), - ○ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (60 mg equiv. de paclitaxel/kg).

5 La fig. 7B. El efecto antitumoral de PG-paclitaxel y paclitaxel en ratones portadores de tumores OCA-1. - □ - representa la respuesta a una dosis intravenosa única de PG (0,8 g/kg); -Δ- representa la respuesta a paclitaxel (80 mg/kg), - • - representa la respuesta a PG-paclitaxel (80 mg equiv. de paclitaxel/kg), - ○ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (160 mg equiv. de paclitaxel/kg).

10 La fig. 7C. El efecto antitumoral de PG-paclitaxel en ratones portadores de tumores MCA-4 de carcinoma de mama. -○ - representa la respuesta a una sola dosis intravenosa de solución salina, - Δ - representa la respuesta a una dosis intravenosa única de PG (0,6 g/kg); - ◆ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (40 mg/kg), - ○ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (60 mg equiv. de paclitaxel/kg.), - ○ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (120 mg/kg).

15 La fig. 7D. El efecto antitumoral de PG-paclitaxel contra el tumor de sarcoma de tejido blando (FSA-II) en ratones. - □ - representa la respuesta a una sola dosis intravenosa de solución salina, - ◇ - representa la respuesta a una dosis intravenosa única de PG (0,8 g/kg); - ○ - representa la respuesta a paclitaxel (80 mg/kg), - Δ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (160 mg equiv. de paclitaxel/kg.).

20 La fig. 7E. El efecto antitumoral de PG-paclitaxel contra el tumor hepatocarcinoma singénico (HCA-I) en ratones. -D- representa la respuesta a una sola dosis intravenosa de solución salina,-Δ- representa la respuesta a una dosis intravenosa única de PG (0,8 g/kg); - ○ - representa la respuesta a PG-paclitaxel (80 mg/kg), -Δ- representa la respuesta a PG-paclitaxel (160 mg equiv. de paclitaxel/kg).

La fig. 8. El perfil de liberación de paclitaxel a partir de PEG-paclitaxel en tampón de fosfato (pH 7,4). El paclitaxel,-X-; PEG-paclitaxel,-O-.

25 La fig. 9. El efecto antitumoral de PEG-paclitaxel en tumores MCA-4 mamarios. - □ - representa la respuesta de una única inyección intravenosa con una solución salina de PEG (60 mg/ml), - ■ - representa la respuesta al vehículo Cremophor/alcohol, -O- representa una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal de paclitaxel, - • - representa PEG-paclitaxel a 40 mg equiv. De paclitaxel/kg de peso corporal.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención surge del descubrimiento de formulaciones nuevas, hidrosolubles de paclitaxel y docetaxel, y la eficacia sorprendente de estas formulaciones contra células tumorales *in vivo*. Paclitaxel conjugado con poli(ácido 1-glutámico) (PG-paclitaxel) administrado a ratones que albergan carcinoma ovárico (OCA-I) provocó un retraso significativo en el crecimiento del tumor comparado con la misma dosis de paclitaxel sin PG. Los ratones tratados con paclitaxel solamente o con una combinación de paclitaxel libre y PG mostraron un crecimiento tumoral retrasado inicialmente, pero los tumores volvieron a crecer a niveles comparables a los de un grupo de control sin tratar después de diez días. Además, a la dosis máxima tolerable (DMT) del conjugado de PG-paclitaxel (160 mg equiv. de paclitaxel/kg), el crecimiento de los tumores se suprimió completamente, los tumores encogieron y los ratones observados durante dos meses después del tratamiento permanecieron sin tumores (DMT: definida como la dosis máxima que produjo un 15% o menos de pérdida de peso corporal en dos semanas después de una inyección i.v. única). En un estudio paralelo, se examinó la actividad antitumoral de PG-paclitaxel en ratas con adenocarcinoma mamario de ratas (13762F). Una vez más, se observó la erradicación tumoral completa a 40 a 60 mg equiv. de paclitaxel/kg de PG-paclitaxel. Estos resultados sorprendentes demuestran que el conjugado de polímero-fármaco, PG-paclitaxel, erradica con éxito tumores sólidos bien establecidos tanto en ratones como en ratas después de una inyección intravenosa única. Además, con una semivida de 40 días a pH 7,4, PG-paclitaxel es uno de los derivados de paclitaxel hidrosolubles más estables conocidos (Deutsch, *et al.*, 1989; Mathew *et al.*, 1992; Zhao y Kingston, 1991).

45 Los compuestos y procedimientos nuevos de la presente invención proporcionan avances significativos sobre los procedimientos y composiciones anteriores, ya que se prevé que los paclitaxeles hidrosolubles mejoren la eficacia de la terapia antineoplásica basada en paclitaxel, proporcionando composiciones derivadas de paclitaxel hidrosolubles y de liberación controlada. Tales composiciones eliminan la necesidad de disolventes que están asociados con los efectos secundarios observados con las composiciones de paclitaxel anteriores.

50 El paclitaxel se puede hacer hidrosoluble de la manera: conjugando paclitaxel con polímeros hidrosolubles que sirven como vehículos de fármaco.

5 En ciertas realizaciones de la invención, se puede usar un estent recubierto con los conjugados de polímero-paclitaxel para prevenir la reestenosis, el cierre de arterias después de angioplastia con globo. Los resultados recientes en ensayos clínicos usando estents expansibles con globo en angioplastia coronaria han demostrado un beneficio significativo en la permeabilidad y en la reducción de la reestenosis comparado con la angioplastia con globo estándar (Serruys *et al.*, 1994). Según la hipótesis de respuesta a lesión, la formación de neoíntima está asociada a una proliferación celular incrementada. Actualmente, la opinión general mantiene que el proceso crítico que conduce a lesiones vasculares tanto en aterosclerosis espontánea como acelerada es la proliferación de células musculares lisas (CML) (Phillips-Hughes y Kandarpa, 1996). Ya que la proliferación fenotípica de CML después de lesión arterial imita la de las células neoplásicas, es posible que los fármacos antineoplásicos puedan ser útiles para prevenir la acumulación de CML neoíntimas. Los estents recubiertos con agentes antiproliferativos unidos a polímero que son capaces de liberar estos agentes a lo largo de un periodo de tiempo prolongado con concentración suficiente prevendrán así el crecimiento de la íntima y la media hiperplásicas hacia la luz, reduciendo por ello la reestenosis.

15 Debido a que se ha demostrado que paclitaxel suprime la artritis inducida por colágeno en un modelo de ratón (Oliver *et al.*, 1994), se contempla también que las formulaciones de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias, tales como artritis reumatoide. La unión de paclitaxel a tubulina desplaza el equilibrio hacia polímeros microtubulares estables, y hace de este fármaco un inhibidor potente de la replicación de células eucarióticas bloqueando las células en la etapa mitótica G2 tardía. Diversos mecanismos pueden estar implicados en la supresión de la artritis por paclitaxel. Por ejemplo, los efectos citotóxicos específicos de fase de paclitaxel pueden afectar a las células inflamatorias en proliferación rápida, y además paclitaxel inhibe la mitosis celular, la migración, la quimiotaxia, el transporte intracelular y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los neutrófilos. Además, paclitaxel puede tener actividad antiangiogénica bloqueando la migración coordinada de células endoteliales (Oliver *et al.*, 1994). Por lo tanto, se contempla que los profármacos conjugados con polímero de la presente invención son tan útiles como paclitaxel libre en el tratamiento de artritis reumatoide. La formulación conjugada con polímero descrita aquí ofrecería también las ventajas de liberación retrasada o sostenida del fármaco y solubilidad superior. También es un aspecto del tratamiento de artritis que las formulaciones se pueden inyectar o implantar directamente en las zonas de las articulaciones afectadas.

30 Las preparaciones farmacéuticas de paclitaxel o docetaxel adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser líquida para inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y de almacenamiento, y se debe preservar de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo debe ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico.

40 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos ingredientes de los enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución suya previamente filtrada en condiciones estériles.

50 Como se usa aquí, vehículo farmacéuticamente aceptable incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y agentes isotónicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Se pueden incorporar también ingredientes activos complementarios en las composiciones.

La frase farmacéuticamente aceptable también se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administra a un animal o a un humano.

60 Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debería tamponar de forma adecuada si es necesario, y el disolvente líquido se debería hacer primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción.

65

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y así se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y todavía obtienen un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

### Ejemplo de Referencia 1

#### DTPA-Paclitaxel

Síntesis de DTPA-paclitaxel:

A una solución de paclitaxel (100 mg, 0,117 mmol) en DMF seca (2,2 ml) se añadió anhídrido de ácido dietilentiainopentaacético (DTPA A) (210 mg, 0,585 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 4 °C durante la noche. La suspensión se filtró (filtro de Millipore de 0,2 micras) para eliminar anhídrido de DTPA sin reaccionar. El filtrado se vertió en agua destilada, se agitó a 4 °C durante 20 min, y se recogió el precipitado. El producto bruto se purificó por TLC preparativa sobre placas de gel de sílice de C<sub>18</sub> y desarrollado en acetonitrilo/agua (1:1). El paclitaxel tenía un valor R<sub>F</sub> de 0,34. La banda por encima del paclitaxel con un valor R<sub>F</sub> de 0,65 a 0,75 se separó por raspado y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo/agua (1:1), y el disolvente se eliminó para dar 15 mg de DTPA-paclitaxel como producto (rendimiento 10,4%): p.f.: > 226 °C decomposición. El espectro UV (sal de sodio en agua) mostró absorción máxima a 228 nm, que es también característica para paclitaxel. Espectro de masas: (FAB) m/e 1229 (M + H)<sup>+</sup>, 1251 (M + Na), 1267 (M + K). En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) la resonancia de NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N y CH<sub>2</sub>COOH de DTPA apareció como una serie compleja de las señales a δ 2,71 a 2,96 ppm, y como un multiplete a 8 3,42 ppm, respectivamente. La resonancia de C7-H a 4,10 ppm en paclitaxel se desplazó a 5,51 ppm, lo que sugiere la esterificación en la posición 7. El resto del espectro fue consistente con la estructura de paclitaxel.

La sal de sodio de DTPA-paclitaxel también se obtuvo mediante la adición de una solución de DTPA-paclitaxel en etanol en una cantidad equivalente de 0,05 M de NaHCO<sub>3</sub>, seguido de liofilización para producir un polvo sólido soluble en agua (solubilidad > 20 mg equivalentes de paclitaxel/ml).

#### La estabilidad hidrolítica de DTPA-paclitaxel:

La estabilidad hidrolítica de DTPA-paclitaxel fue estudiada en condiciones aceleradas. Brevemente, 1 mg de DTPA-paclitaxel se disolvió en 1 ml de 0,5 M de NaHCO<sub>3</sub> solución acuosa (pH 9,3) y se analizaron por HPLC. El sistema HPLC consistió en una columna Nova-Pak 150 x 3,9 (i.d.) mm de Waters lleno de C18 gel de sílice de 4 micras, una bomba LC isocrático de Perkin-Elmer, una interfaz de PE Nelson de serie 900, un detector de Spectra-Physics UV/Vis y una estación de datos. El eluyente (acetonitrilo/methanol/0,02M acetato de amonio = 4:1:5) se operó a 1,0 ml/min con detección UV a 228 nm. Los tiempos de retención de DTPA-paclitaxel y paclitaxel fueron 1,38 y 8,83 min, respectivamente. Los áreas de los picos se cuantificaron y compararon con las curvas de calibración para determinar las concentraciones de DTPA-paclitaxel y paclitaxel. La vida media estimada de DTPA-paclitaxel en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M es de aproximadamente 16 días a temperatura ambiente.

#### Efectos de DTPA-paclitaxel sobre el crecimiento de células de melanoma de ratón B16 *in vitro*:

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 2,5 x 10<sup>4</sup> de células/ml y se cultivan en 50:50 de un medio esencial mínimo de Dulbecco modificado (DEM) y medio F12 que contiene el 10% de suero de ternera bovino a 37 °C durante 24 horas en una atmósfera humidificada al 97% de de CO<sub>2</sub> al 5,5%. A continuación, se reemplazó el medio con medio que contiene paclitaxel fresco o DTPA-paclitaxel en concentración comprendida entre 5 x 10<sup>-9</sup> M a 75 x 10<sup>-9</sup> M. Después de 40 horas, las células se liberaron por tratamiento con tripsina y se contaron en un contador Coulter. Las concentraciones finales de DMSO (utilizado para disolver el paclitaxel) y de solución de bicarbonato de sodio 0,05 M (utilizado para disolver el paclitaxel-DTPA) en el medio de células eran menos del 0,01%. Esta cantidad de disolvente no tiene ningún efecto sobre el crecimiento celular como se determina por estudios de control.

Los efectos de DTPA-paclitaxel sobre el crecimiento de células de melanoma B16 se presentan en la fig. 2. Después de una incubación de 40 h con diversas concentraciones, DTPA-paclitaxel y paclitaxel se compararon en cuanto a citotoxicidad. El IC<sub>50</sub> para paclitaxel y DTPA-paclitaxel son 15 nM y 7,5 nM, respectivamente.

#### El efecto antitumoral en modelo de tumor de carcinoma de mama (MCA-4):



Los ratones hembra C3Hf/Kam fueron inoculados con carcinoma de mama (MCA-4) en los músculos del muslo derecho ( $5 \times 10^5$  de células/ratón). Cuando los tumores habían crecido hasta 8 mm (aprox. 2 semanas), una dosis única de paclitaxel o DTPA-paclitaxel fue dada en 10, 20 y 40 mg equivalentes de paclitaxel/kg de peso corporal. En estudios de control, se utilizaron solución salina y alcohol absoluto/Cremophor 50/50 diluido con solución salina (1:4). El crecimiento tumoral se determinó diariamente, midiendo tres diámetros tumorales ortogonales. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 12 mm de diámetro, se calculó el retraso del crecimiento tumoral. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores eran de aproximadamente 15 mm.

La curva de crecimiento del tumor se muestra en la fig. 3. En comparación con los controles, tanto de paclitaxel y DTPA-paclitaxel mostraron un efecto antitumoral en una dosis de 40 mg/kg. También se analizaron los datos para determinar el número medio de días para que el tumor alcance 12 mm de diámetro. El análisis estadístico mostró que el DTPA-paclitaxel retrasó significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control tratado con solución salina a una dosis de 40 mg/kg ( $p > 0,01$ ). El tiempo medio para que el tumor alcance 12 mm de diámetro fue de 12,1 días para el DTPA-paclitaxel en comparación con 9,4 días para paclitaxel (fig. 4).

### 15 **El radiomarcaje de DTPA-paclitaxel con $^{111}\text{In}$**

En un vial V de 2 ml se añadieron sucesivamente 40  $\mu\text{l}$  de 0,6 M de tampón de acetato de sodio (pH 5,3), 40  $\mu\text{l}$  de tampón de citrato de sodio 0,06 M (pH 5,5), 20  $\mu\text{l}$  de solución de DTPA-paclitaxel en etanol (2% w/v) y 20  $\mu\text{l}$  de solución de  $^{111}\text{InCl}_3$  (1,0 mCi) en tampón de acetato de sodio (pH 5,5). Después de un período de incubación de 30 min a temperatura ambiente, el  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel marcado se purificó haciendo pasar la mezcla a través de un cartucho Sep-Pac de C18 utilizando solución salina y, posteriormente, etanol como la fase móvil. Libre  $^{111}\text{In}$ -DTPA (< 3%) se eliminó por solución salina, mientras  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel se recogió en el lavado de etanol. El etanol se evaporó bajo gas de nitrógeno y el producto marcado se reconstituyó en solución salina. Rendimiento radioquímico: 84%.

#### **Análisis de $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel:**

HPLC se utilizó para analizar la mezcla de reacción y la pureza de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel. El sistema consistía en una bomba binaria LDC, una columna de Waters de 100 x 8,0 mm (i.d.) llena de gel de sílice de 5  $\mu\text{m}$  de ODS. La columna se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un gradiente de mezcla de agua y metanol (gradiente del 0% al 85% de metanol durante 15 min). El sistema de gradiente se monitorizó con un detector de cristal de NaI y un Spectra-Physics UV/V es detector. Como lo demuestra el análisis por HPLC, la purificación por cartucho Sep-Pak retiró la mayor parte del  $^{111}\text{In}$ -DTPA, que tenía un tiempo de retención de 2,7 min. La  $^{111}\text{In}$ -DTPA probablemente se derivó de los rastros de DTPA contaminante en el DTPA-paclitaxel. Una radio-cromatograma de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel correlacionada con su cromatograma UV, lo que indica que el pico a 12,3 min era de hecho el compuesto objetivo. En las mismas condiciones cromatográficas, el paclitaxel tenía un tiempo de retención de 17,1 min. La pureza radioquímica de la preparación final era 90% según se determinó por análisis de HPLC.

### 35 **Gammagrafía de cuerpo entero:**

Los ratones hembra C3Hf/Kam fueron inoculados con carcinoma de mama (MCA-4) en los músculos del muslo derecho ( $5 \times 10^5$  células). Cuando los tumores habían crecido hasta un 12 mm de diámetro, los ratones se dividieron en dos grupos. En el grupo I, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio, seguido por  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel (100-200 mCi) *vía* vena de la cola. Una  $\gamma$ -cámara equipada con un colimador de energía media se coloca sobre los ratones (3 por grupo). Una serie de adquisiciones de 5 min se recogieron a los 5, 30, 60, 120, 240 min y 24 horas después de la inyección. En el grupo II, los mismos procedimientos se siguieron excepto que los ratones fueron inyectados con  $^{111}\text{In}$ -DTPA como control. La fig. 5 muestra gammagrafías de los animales inyectados con  $^{111}\text{In}$ -DTPA e  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel.  $^{111}\text{In}$ -DTPA se caracterizó por una rápida liquidación del plasma, la excreción rápida y alta en la orina con una retención mínima en el riñón y la retención insignificante en el tumor, el hígado, el intestino y otros órganos o partes del cuerpo. En contraste,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel exhibió un perfil farmacológico parecido al de paclitaxel (Eiseman *et al.*, 1994). La radioactividad en el cerebro era insignificante. Hígado y riñón tuvieron el mayor ratio tejido: plasma. Excreción hepatobiliar de DTPA-paclitaxel radiomarcado o sus metabolitos fue una de las principales rutas para la liquidación del fármaco de la sangre. A diferencia de paclitaxel, una cantidad significativa de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel también se excretó a través del riñón, que sólo desempeñó un papel secundario en la liquidación de paclitaxel. El tumor tenía una absorción importante de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel. Estos resultados demuestran que  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel es capaz de detectar ciertos tumores y para cuantificar la absorción de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-paclitaxel en los tumores, que a su vez, puedan ayudar en la selección de pacientes para el tratamiento con paclitaxel.

### **Ejemplo 2**

#### 55 **Ácido poliglutámico-paclitaxel**

El presente ejemplo demuestra la conjugación de paclitaxel con un polímero hidrosoluble, poli(ácido 1-glutámico) (PG). El potencial de los polímeros hidrosolubles usados como vehículos de fármacos está bien establecido (Kopeček, 1990; Maeda y Matsumura, 1989). Además de su capacidad para solubilizar fármacos de otra manera insolubles, el conjugado de fármaco-polímero también actúa como una preparación de liberación lenta para la liberación controlada del fármaco.

### Síntesis de PG-paclitaxel

Se seleccionó PG como vehículo para paclitaxel porque puede ser degradado fácilmente por las enzimas lisosómicas, es estable en el plasma y contiene suficientes grupos funcionales para la unión del fármaco. Se han conjugado a PG diversos fármacos antineoplásicos, que incluyen adriamicina (Van Heeswijk *et al.*, 1985; Hoes *et al.*, 1985), ciclofosfamida (Hirano *et al.*, 1979), y Ara-C (Kato *et al.*, 1984).

Se disolvió sal sódica de PG (MW 34 K, Sigma, 0,35 g) en agua. El pH de la disolución acuosa se ajustó a 2 usando HCl 0,2 M. El precipitado se recogió, se dializó con agua destilada y se liofilizó para producir 0,29 g de PG.

A una disolución de PG (75 mg, unidad repetitiva FW 170, 0,44 mmoles) en DMF seco (1,5 ml) se le añadieron 20 mg de paclitaxel (0,023 mmoles, proporción molar PG/paclitaxel = 19), 15 mg de dicitohexilcarbodiimida (DCC) (0,073 mmoles) y una cantidad traza de dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 4 h. La cromatografía en capa fina (CCF, sílice) mostró la conversión completa de paclitaxel ( $R_f = 0,55$ ) a conjugado de polímero ( $R_f = 0$ , fase móvil,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$ ). La mezcla de reacción se vertió en cloroformo. El precipitado resultante se recogió y se secó al vacío para producir 65 mg de conjugado de polímero-fármaco. Cambiando la proporción en peso de paclitaxel respecto de PG de los materiales de partida se pueden sintetizar conjugados poliméricos de diversas concentraciones de paclitaxel.

Se obtuvo la sal sódica del conjugado de PG-paclitaxel disolviendo el producto en  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M. La disolución acuosa de PG-paclitaxel se dializó con agua destilada (MWCO 1.000) para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo y la sal de  $\text{NaHCO}_3$  en exceso. La liofilización del dializado produjo 88,6 mg de polvo blanco. El contenido de paclitaxel en este conjugado polimérico se determinó mediante UV (descrito más adelante) como el 21% (p/p). Rendimiento (conversión a paclitaxel unido a polímero, UV): 93%. Se puede sintetizar PG-paclitaxel con contenido de paclitaxel superior (hasta el 35%) mediante este procedimiento, incrementando simplemente la proporción de paclitaxel respecto de PG utilizada.

$^1\text{H-RMN}$  (espectrómetro de GE modelo GN 500, 500 MHz, en  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7,75$  a  $7,36$  ppm (componentes aromáticos de paclitaxel);  $\delta = 6,38$  ppm ( $\text{C}_{10}\text{-H}$ ),  $5,97$  ppm ( $\text{C}_{13}\text{-H}$ ),  $5,63$  y  $4,78$  ppm ( $\text{C}_2\text{'-H}$ ),  $5,55\text{-}5,36$  ppm ( $\text{C}_3\text{'-H}$  y  $\text{C}_2\text{-H}$ , m),  $5,10$  ppm ( $\text{C}_5\text{-H}$ ),  $4,39$  ppm ( $\text{C}_7\text{-H}$ ),  $4,10$  ( $\text{C}_{20}\text{-H}$ ),  $1,97$  ppm ( $\text{OCOCH}_3$ ), y  $1,18\text{-}1,20$  ppm ( $\text{C-CH}_3$ ) se asignan a los componentes alifáticos de paclitaxel. Otras resonancias de paclitaxel fueron ocultadas por las resonancias de PG. Las resonancias de PG a  $4,27$  ppm ( $\text{H-}\alpha$ ),  $2,21$  ppm ( $\text{H-}\gamma$ ), y  $2,04$  ppm ( $\text{H-}\beta$ ) están de acuerdo con el espectro de PG puro. Los acoplamientos de paclitaxel conjugado con polímero se resuelven demasiado pobremente para medirse con suficiente exactitud. La solubilidad en agua fue  $>20$  mg de paclitaxel/ml.

### Caracterización de PG-paclitaxel

Se obtuvieron los espectros ultravioletas (UV) en un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Fullerton, CA). El contenido de paclitaxel conjugado con PG se estimó mediante UV basándose en una curva patrón generada con concentraciones conocidas de paclitaxel en metanol ( $\lambda = 228$  nm), suponiendo que el conjugado de polímero en agua y el fármaco libre en metanol tienen los mismos coeficientes de extinción molar y que ambos siguen la ley de Lambert Beer. Como se demuestra mediante su espectro UV, PG-paclitaxel tiene la absorción característica de paclitaxel con desplazamientos de  $\lambda$  de 228 a 230 nm. La concentración de paclitaxel en PG-paclitaxel se estimó basándose en la curva patrón generada con concentraciones conocidas de paclitaxel en metanol a partir de la absorción a 228 nm, suponiendo que el conjugado de polímero en agua a 230 nm y el fármaco libre en metanol a 228 nm tienen la misma extinción molar y ambos siguen la ley de Lambert Beer.

### Estudios de cromatografía de permeación en gel de PG-paclitaxel

Se caracterizó el peso molecular relativo de PG-paclitaxel mediante cromatografía de permeación en gel (CPG). El sistema de CPG consistió en dos bombas LDC modelo III acopladas a un controlador de gradiente LDC, una columna de CPG con gel PL, y un detector de red de fotodiodos Waters 990. El eluyente (DMF) se hizo pasar a 1,0 ml/min con la detección UV fijada a 270 nm. La conjugación de paclitaxel a PG dio como resultado un incremento en el peso molecular de PG-paclitaxel, como indica el desplazamiento del tiempo de retención de 6,4 min de PG a 5,0 min del conjugado de PG-paclitaxel analizado mediante CPG. El peso molecular calculado de PG-paclitaxel que contiene un 15-25% de paclitaxel (p/p) está en el intervalo de 45-55 kDa. El producto en bruto contenía un contaminante de peso molecular bajo (tiempo de retención 8,0 a 10,0 min, y 11,3 min), que se puede eliminar de forma efectiva convirtiendo PG-paclitaxel en su sal de sodio, seguido de diálisis.

### Degradación hidrolítica de conjugado de PG-paclitaxel

Se disolvió PG-paclitaxel en disoluciones tamponadas con fosfato (PBS, 0,01 M) a pH 6,0, pH 7,4 y pH 9,6 a una concentración de paclitaxel equivalente de 0,4 mM. Las disoluciones se incubaron a 37°C con agitación suave. A los intervalos de tiempo seleccionados, se extrajeron alícuotas (100 µl), se mezclaron con un volumen igual de metanol y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema de HPLC consistió en una columna de sílice de fase inversa (Nova-Pac, Waters, CA), una fase móvil de metanol-agua (2:1, v/v) administrada a un caudal de 1,0 ml/min, y un detector de fotodiodos. La concentración de paclitaxel unido a PG, paclitaxel libre y otros productos de degradación en cada muestra se calculó comparando las áreas de los picos con una curva patrón obtenida separadamente preparada a partir de paclitaxel, suponiendo que el coeficiente de extinción molar de cada pico a 228 nm es el mismo que el de paclitaxel. La semivida del conjugado, que se estimó que era 132, 40 y 4 días a pH 6,0, 7,4 y 9,6, respectivamente, se determinó mediante un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados. El análisis de HPLC reveló que la incubación de PG-paclitaxel en disoluciones de PBS produjo paclitaxel y diversas especies, que incluyen una que es más hidrófoba que paclitaxel (metabolito-1). En realidad, la cantidad de metabolito-1, que fue lo más probablemente 7-epipaclitaxel, recuperada en PBS a pH 7,4 superó la de paclitaxel después de 100 horas de incubación (Fig. 6).

### Estudios in vitro

Las alícuotas obtenidas de la disolución en PBS a pH 7,4 se sometieron a análisis mediante un ensayo de polimerización de tubulina. La reacción de ensamblaje de tubulina se llevó a cabo a 32°C en tampón PEM (pH 6,9) a una concentración de tubulina (cerebro bovino, Cytoskeleton Inc., Boulder, CO) de 1 mg/ml (10 µM) en presencia de las muestras de ensayo (1,0 µM equiv. de paclitaxel) y 1,0 mM de GTP. La polimerización de tubulina se siguió midiendo la absorbancia de la disolución a 340 nm a lo largo del tiempo. Después de 15 min, se añadió cloruro cálcico (125 mM) para medir la despolimerización de microtúbulos inducida por CaCl<sub>2</sub>. Mientras PG-paclitaxel recién disuelto en PBS fue inactivo para producir microtúbulos, las alícuotas de PG-paclitaxel incubadas durante tres días dieron como resultado la polimerización de tubulina. Los microtúbulos formados fueron estables contra la despolimerización inducida por CaCl<sub>2</sub>.

El efecto de PG-paclitaxel sobre el crecimiento celular también se examinó mediante ensayo de sal de tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Se sembraron células MCF-7 ó células 13762F a  $2 \times 10^4$  células/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillos tratada 24 h después con diversas concentraciones de PG-paclitaxel, paclitaxel o PG, y se incubaron durante 72 h adicionales. Después se añadió disolución MTT (20 µl, 5 mg/ml) a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se aspiró el sobrenadante, y el formazán de MTT formado por las células metabólicamente viables se midió mediante un lector de fluorescencia de microplacas a una longitud de onda de 590 nm. A lo largo del periodo de tres días, PG-paclitaxel inhibió la proliferación de células tumorales en una medida similar a la de paclitaxel libre. Para la línea de células de tumor de mama humano MCF-7, los valores de CI<sub>50</sub> resultantes fueron 0,59 µM para paclitaxel y 0,82 µM para PG-paclitaxel (medidos en unidades equivalentes de paclitaxel). Contra la línea celular 13762F, la sensibilidad a PG-paclitaxel (CI<sub>50</sub> = 1,86 µM) fue comparable a la de paclitaxel (CI<sub>50</sub> = 6,79 µM). Para ambas líneas celulares la CI<sub>50</sub> de PG solo fue mayor de 100 µM.

### Actividad antitumoral in vivo

Todo el trabajo con animales se llevó a cabo en la instalación de animales en el M.D. Anderson Cancer Center según las directrices institucionales. Se criaron y se mantuvieron ratones C3H/Kam en una instalación sin patógenos en el Departamento de Oncología Radioterápica Experimental. Se produjeron tumores únicos en el músculo del muslo derecho de ratones C3H/Kam hembra (25-30 g) inyectando  $5 \times 10^5$  células de carcinoma ovárico murino (OCa-I), carcinoma mamario (MCA-4), hepatocarcinoma (HCA-I) o fibrosarcoma (FSA-II). En un estudio paralelo, se inyectó a ratas Fischer 344 hembra (125-150 g)  $1,0 \times 10^5$  células viables de tumor 13762F en 0,1 ml de PBS. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores en ratones crecieron hasta 500 mm<sup>3</sup> (10 mm de diámetro), o cuando los tumores en ratas crecieron hasta 2400 mm<sup>3</sup> (diámetro medio 17 mm). Se dio una dosis única de PG-paclitaxel en solución salina o paclitaxel en vehículo de Cremophor EL en dosis que variaban de 40 a 160 mg equiv. de paclitaxel/kg de peso corporal. En los experimentos de control, se usó suero salino, vehículo de Cremophor (50/50 de Cremophor/etanol diluido con solución salina (1: 4)), disolución de PG (MW 38K) en solución salina, y una mezcla de paclitaxel/PG. El crecimiento tumoral se determinó diariamente (Fig. 7A, 7B, 7C, 7D y 7E) midiendo tres diámetros tumorales ortogonales. El volumen del tumor se calculó según la fórmula  $(A \times B \times C)/2$ . El retraso del crecimiento absoluto (RCA) en ratones se define como el tiempo en días para que los tumores tratados con diversos fármacos crezcan de 500 a 2.000 mm<sup>3</sup> en ratones menos el tiempo en días para los tumores tratados con control de solución salina para que crezcan de 500 a 2.000 mm<sup>3</sup>. La Tabla 1 resume la toxicidad aguda de PG-paclitaxel en ratas en comparación con paclitaxel/Cremophor. La Tabla 2 resume los datos que se refieren al efecto de PG-paclitaxel contra tumores MCA-4, FSA-II I y HCA-I en ratones. Los datos también se resumen en las Fig. 7A-Fig. 7E.

Tabla 1 Toxicidad aguda de PG-paclitaxel en ratas Fischer\*

Grupo	Dosis (mg/kg)	Nº de muertes por toxicidad	Pérdida de peso corporal en %	Tiempo nadir (días)	Tiempo de recuperación total (día)
PG-paclitaxel <sup>a</sup>	60	1/4	15,7	7	14
PG-paclitaxel <sup>a</sup>	40	0/4	11,1	6	11
Paclitaxel <sup>b</sup>	60	1/4	16,7	6	15
Paclitaxel <sup>b</sup>	40	0/3	17,9	6	16
salina	1,0 ml	0/2	5,2	1	7
PG <sup>c</sup>	0,3 g/kg	0/2	4,3	2	8
Vehículo de Cremophor <sup>d</sup>	2,0 ml	0/2	6,9	1	9

\* Los fármacos se administraron de forma intravenosa a ratas Fischer que albergaban tumor 13762F (hembras, 130 g) en una única inyección.

<sup>a</sup> La disolución de PG-paclitaxel se preparó disolviendo el conjugado en solución salina (8 mg equiv. de paclitaxel/ml). El volumen inyectado a 60 mg/kg fue 0,975 ml por rata.

<sup>b</sup> La disolución de paclitaxel/Cremophor se preparó disolviendo paclitaxel en una mezcla 1:1 de alcohol etílico y Cremophor (30 mg/ml). Esta disolución madre se diluyó adicionalmente con solución salina (1:4) antes de la inyección. La concentración final de paclitaxel en la disolución fue 6 mg/ml. El volumen inyectado a 60 mg/kg fue 1,3 ml por rata.

<sup>c</sup> La disolución de PG se preparó disolviendo el polímero en solución salina (22 mg/ml). La dosis inyectada fue 0,3 g/kg (1,8 ml por rata), que fue equivalente a una dosis de paclitaxel de 60 mg/kg.

<sup>d</sup> El vehículo de Cremophor se preparó diluyendo una mezcla de alcohol etílico y Cremophor (1:1) con solución salina (1:4).

Tabla 2: Efecto antitumoral de PG-paclitaxel contra diferentes tipos de tumores murinos in vivo

Tumor	Fármaco <sup>a</sup>	Tiempo de crecimiento <sup>db</sup> 500 - 2000 mm <sup>3</sup>	RCA <sup>c</sup>	t-test <sup>d</sup>
MCA-4	Salina	4,8 ± 0,8 (5)	-	-
	PG (0,6 g/kg)	9,3 ± 1,1 (4)	4,5	0,0114
	Vehículo de Cremophor	6,1 ± 0,7 (5)	1,3	0,265
	PG-pacl (40 mg/kg)	8,6 ± 1,2 (4)	3,8	0,026
	PG-pacl (60 mg/kg)	14,2 ± 1,1 (5)	9,4	0,0001
	PG-pacl (120 mg/kg)	44,4 ± 2,9 (5)	39,6	<0,0001
	Paclitaxel (40 mg/kg)	9,0 ± 0,6 (4)	4,2	0,0044
	Paclitaxel (60 mg/kg)	9,3 ± 0,3 (5)	4,5	0,0006
FSa-II	Salina	1,9 ± 0,1 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	2,8 ± 0,2 (6)	0,9	0,0043
	Vehículo de Cremophor	2,2 ± 0,2 (6)	0,3	0,122
	PG-pacl (80 mg/kg)	3,8 ± 0,4 (6)	1,9	0,0016
	PG-pacl (160 mg/kg)	5,1 ± 0,3 (13)	3,2	<0,0001
	Paclitaxel (80 mg/kg)	4,2 ± 0,3 (6)	2,3	0,0002
	PG + paclitaxel	3,0 ± 0,2 (6)	1,1	0,0008
HCa-I	Salina	7,3 ± 0,3 (5)	-	-
	PG (0,8 g/kg)	7,7 ± 0,4 (4)	0,4	0,417
	Vehículo de Cremophor	6,8 ± 0,8 (5)	-0,5	0,539
	PG-pacl (40 mg/kg)	8,2 ± 0,7 (5)	0,9	0,218
	PG-pacl (80 mg/kg)	8,6 ± 0,2 (5)	1,3	0,0053
	PG-pacl (160 mg/kg)	11,0 ± 0,8 (4)	3,7	0,0023
	Paclitaxel (80 mg/kg)	6,4 ± 0,5 (5)	-0,9	0,138
	PG + paclitaxel	6,7 ± 0,4 (5)	-0,6	0,294

Tumor	Fármaco <sup>a</sup>	Tiempo de crecimiento <sup>bb</sup> 500 - 2000 mm <sup>3</sup>	RCA <sup>c</sup>	t-test <sup>d</sup>
<p><sup>a</sup> Los ratones que albergan tumores de 500 mm<sup>3</sup> en la pata derecha se trataron con diversas dosis de PG-paclitaxel (40-120 mg equiv. de paclitaxel/kg) en solución salina o paclitaxel en vehículo de Cremophor i.v. en una inyección única. Los animales de control se trataron con solución salina (0,6 ml), vehículo de Cremophor (0,5 ml), disolución de PG en solución salina, o PG g/kg) más paclitaxel (80 mg/kg).</p> <p><sup>b</sup> El crecimiento tumoral se determinó mediante la medida diaria de tres diámetros ortogonales con calibres, y el volumen se calculó como (a x b x c)/2. Entre paréntesis se muestra el número de ratones usados en cada grupo. Se presenta el tiempo en días de crecimiento desde 500 mm<sup>3</sup> hasta 2000 mm<sup>3</sup> como media ± desviación estándar.</p> <p><sup>c</sup> Retraso del crecimiento absoluto (RCA) definido como el tiempo en días para que los tumores tratados con diversos fármacos crezcan de 500 a 2000 mm<sup>3</sup> menos el tiempo en días para que los tumores tratados con control de solución salina crezcan de 500 a 2000 mm<sup>3</sup>.</p> <p><sup>d</sup> El tiempo en días para crecer de 500 a 2000 mm<sup>3</sup> se comparó para grupos de tratamiento y el grupo de solución salina usando la prueba de la t de student. Los valores de P son bilaterales y se tomaron como significativos cuando fueron menores o iguales a 0,05.</p>				

## Ejemplo de Referencia 2

### Polietilenglicol-Paclitaxel

#### Síntesis de polietilenglicol-paclitaxel (PEG-paclitaxel)

- 5 La síntesis se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar 2'-succinil-paclitaxel se preparó de acuerdo con un procedimiento publicado (Deutsch *et al.*, 1989). El paclitaxel (200 mg, 0,23 mmol) y anhídrido succínico (288 mg, 2,22 mmol) se dejaron reaccionar en piridina anhidra (6 ml) a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la piridina se evaporó, y el residuo se trató con agua, se agitó durante 20 min, y se filtró. El precipitado se disolvió en acetona, se añadió lentamente agua, y se recogieron los cristales finos para producir 180 mg de 2'-succinil-paclitaxel. PEG-paclitaxel fue sintetizado por una reacción de acoplamiento mediada por N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). A una solución de 2'-succinil-paclitaxel (160 mg, 0,18 mmol) y amina de metoxipolioxietileno (PEG-NH<sub>2</sub>, peso molecular 5000, 900 mg, 0,18 mmol) en cloruro de metileno se añadió EEDQ (180 mg, 0,72 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El producto bruto se sometió a cromatografía sobre gel de sílice con acetato de etilo seguido de cloroformo-metanol (10:1). Esto dio 10 350 mg de producto. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 2,76 (m, ácido succínico, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), δ 3,63 (PEG, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), δ 4,42 (C7-H) y δ 5,51 (C2'-H). La máxima absorción UV fue a 288 nm, que es también característica para paclitaxel. Acoplamiento al PEG mejoró en gran medida la solubilidad acuosa de paclitaxel (> 20 mg equivalentes de paclitaxel/ml de agua).

#### Estabilidad hidrolítica de PEG-Paclitaxel

- 20 PEG-Paclitaxel se disolvió en tampón de fosfato (0,01 M) a diferentes valores de pH en una concentración de 0,4 mM y las soluciones se dejaron incubar a 37 °C con agitación suave. A intervalos de tiempo seleccionados, se retiraron y se liofilizaron alícuotas (200 µl). Los polvos secos resultantes se volvieron a disolver en cloruro de metileno para la cromatografía de permeación en gel (análisis GPC). El sistema GPC consistió en una columna Perkin-Elmer de gel PL de lecho mixto, una bomba LC isocrático Perkin-Elmer, una interfaz PE Nelson de la serie 25 900, un detector Spectra-Physics UV/Vis y una estación de datos. El eluyente (cloruro de metileno) se operó a 1,0 ml/min con el detector UV ajustado a 228 nm. Los tiempos de retención de PEG-paclitaxel y paclitaxel fueron 6,1 y 8,2 min, respectivamente. Áreas de picos se cuantificaron y se calculó el porcentaje de PEG-paclitaxel restante y el porcentaje de paclitaxel liberado. La media vida de PEG-paclitaxel determinado por mínimos cuadrados lineales a pH 7,4 fue 54 min. La vida media a pH 9,0 fue 7,6 min. Los perfiles de liberación de paclitaxel a partir de PEG-paclitaxel a pH 7,4 se muestran en la fig. 8.

#### Estudios de citotoxicidad de PEG-paclitaxel utilizando células de melanoma B16 de ratón *in vitro*

- 35 Siguiendo el procedimiento descrito en los estudios de citotoxicidad con DTPA-paclitaxel, las células de melanoma se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 2,5 x 10<sup>4</sup> células/ml y se cultivaron en una mezcla 50:50 de medio mínimo esencial modificado de Dulbecco (DME) y medio F12 que contiene 10% de suero de ternera bovino a 37 °C durante 24 horas en una atmósfera humidificada al 97% de CO<sub>2</sub> al 5,5%. A continuación, se reemplazó el medio con medio que contiene paclitaxel fresco o sus derivados en concentraciones que van de 5 x 10<sup>-9</sup> M a 75 x 10<sup>-9</sup> M. Después de 40 horas, las células se liberaron por tratamiento con tripsina y se contaron en un contador Coulter. Las concentraciones finales de DMSO (utilizado para disolver el paclitaxel) y de solución de bicarbonato de sodio 0,05 M (utilizado para disolver el paclitaxel-PEG) en el medio de células eran menos del

0,01%. Esta cantidad de disolvente no tiene ningún efecto sobre el crecimiento celular como se determinó por estudios de control. Además, el PEG en el intervalo de concentración utilizado para generar una concentración de paclitaxel equivalente de  $5 \times 10^{-9}$  M a  $75 \times 10^{-9}$  M también no afectó la proliferación celular.

#### Efecto antitumoral de PEG-paclitaxel contra MCA-4 del tumor en ratones

5 Para evaluar la eficacia antitumoral de PEG-paclitaxel contra los tumores de mama sólidos, células MCA-4 ( $5 \times 10^5$  de células) se inyectaron en el músculo del muslo derecho de ratones hembra C3Hf/Kam. Como se ha descrito en el Ejemplo 1 con el DTPA-paclitaxel, cuando los tumores se hicieron crecer hasta 8 mm (aprox. 2 semanas), una dosis única de paclitaxel o PEG-paclitaxel se administró a unos 10, 20 y 40 mg de equivalentes de paclitaxel/kg de peso corporal peso. El paclitaxel se disolvió inicialmente en etanol absoluto con un volumen igual de Cremophor. Esta  
10 solución madre se diluyó adicionalmente (1:4 en volumen) con una solución fisiológica estéril dentro de los 15 minutos de la inyección. PEG-paclitaxel se disolvió en solución salina (6 mg equiv. de paclitaxel/ml) y se filtró a través de un filtro estéril (Millipore, 4,5  $\mu$ m). Se utilizaron solución salina, vehículo de paclitaxel, alcohol absoluto:Cremophor (1:1) diluido con solución salina (1:4) y solución de PEG en solución salina (600 mg/kg de peso corporal) en los experimentos de control. El crecimiento tumoral se determinó diariamente, midiendo tres diámetros  
15 tumorales ortogonales. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 12 mm de diámetro, se calculó el retraso del crecimiento tumoral.

La curva de crecimiento del tumor se muestra en la fig. 9. A una dosis de 40 mg/kg, tanto el PEG-paclitaxel como el paclitaxel retrasaron eficazmente el crecimiento del tumor. El paclitaxel fue más eficaz que el paclitaxel-PEG, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Tumores tratados con paclitaxel requirieron 9,4 días para llegar a 12 mm de diámetro mientras que los tumores tratados con PEG-paclitaxel requirieron 8,5 días. Estadísticamente, estos valores fueron significativas ( $p > 0,05$ ) en comparación con sus correspondientes controles, que fueron 6,7 días para el vehículo de paclitaxel y 6,5 días para la solución salina de PEG (fig. 4).  
20

Mientras que las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones, procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas de la procedimientos descritos en este documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en el presente documento mientras que se lograrían los mismos o similares resultados. Todos tales sustitutos y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica similares se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.  
25  
30

#### Referencias

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan detalles a título de ejemplo de procedimientos u otros, suplementarios a los establecidos en este documento, se incorporan específicamente en este documento por referencia.  
35

Bartoni y Boitard, "In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol", J. Microencapsulation, 7:191-197, 1990.

Cortes, J.E. y Pazdur, R., "Docetaxel", Journal of Clinical Oncology 13:2643-2655, 1995.

40 Deutsch et al., "Synthesis of congeners and prodrugs. 3. water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity", J. Med. Chem., 32:788-792, 1989.

Eiseman et al., "Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice", Cancer Chemother. Pharmacol., 34:465-471, 1994.

Fidler, et al., "The biology of cancer invasion and metastasis", Adv. Cancer Res., 28:149-250, 1987.

45 Goldspiel, "Taxol pharmaceutical issues: preparation, administration, stability, and compatibility with other medications", Ann. Pharmacotherapy, 28:S23-26, 1994.

Greenwald et al., "Highly water soluble Taxol derivatives, 7-polyethylene glycol esters as potential products", J. Org. Chem., 60:331-336, 1995.

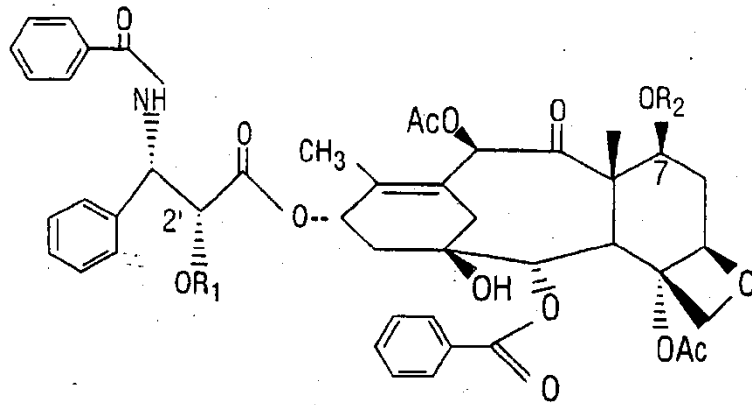
50 Greenwald et al., "Highly water soluble taxol derivative: 2'-polyethylene glycol esters as potential products", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4:2465-2470, 1994.

- Hirano et al., "Polymeric derivatives of activated cyclophosphamide as drug delivery systems in antitumor therapy", *Makromol. Chem.*, 180:1125-1130, 1979.
- Hoes et al., "Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin", *J. Controlled Release*, 2:205-213, 1985.
- 5 Hofle et al., documento DE38942.
- Horwitz et al., "Taxol, mechanisms of action and resistance", *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* N°. 15, págs. 55-61, 1993.
- Kato et al., "Antitumor activity of 1-b-arabinofuranosylcytosine conjugated with polyglutamic acid and its derivative", *Cancer Res.*, 44:25, 1984.
- 10 Kopecek, "The potential of water-soluble polymeric carriers in targeted and site-specific drug delivery", *J. Controlled Release*, 11:279-290, 1990.
- Kopecek y Kopeckova, "Targetable water-soluble polymeric anticancer drugs: achievements and unsolved problems", *Proceed. Intern Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 20:190-191, 1993.
- 15 Maeda y Matsumura, "Tumortropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs, Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems", 6:193-210, 1989.
- Magri y Kingston, "Modified taxols. 2. Oxidation products of taxol", *J. Org. Chem.*, 51:797-802, 1986.
- Mathew et al., "Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity", *J. Med. Chem.*, 35:145-151, 1992.
- 20 Mosmann, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay", *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
- Oliver, S.J. et al., "Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer", *Taxol, Cellular Immunology* 157:291-299, 1994.
- Phillips-Hughes y Kandarpa, "Restenosis: pathophysiology and preventive strategies", *JVIR* 7:321-333, 1996.
- 25 Reynolds, T., "Polymers help guide cancer drugs to tumor targets- and keep them there", *J. Natl. Cancer Institute*, 87:1582-1584, 1995.
- Scudiero et al. "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Foimazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines", *Cancer Research*, 48:4827-4833, 1988.
- Serruys et al., "A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease", *N. Engl. J. Med.*, 331:489-495, 1994.
- 30 Sharma y Straubinger, "Novel taxol formulations: Preparation and Characterization of taxol-containing liposomes", *Pharm. Res.* 11:889-896, 1994.
- Patente de EE.UU. N° 5.583.153.
- Van Heeswijk et al., "The synthesis and characterization of polypeptide-adriamycin conjugate and its complexes with adriamycin. Part 1", *J. Controlled Release*, 1:301-315, 1985.
- 35 Weiss et al., "Hypersensitivity reactions from Taxol", *J. Clin. Oncol.*, 8:1263-1268, 1990.
- WO 96/25176.
- Zhao, Z. y Kingston, D. G. I., "Modified taxols. 6. Preparation of water-soluble taxol phosphates", *J. Nat. Prod.*, 54:1607-1611, 1991.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición, que comprende (1) un fármaco anti-tumoral conjugado con un polímero soluble en agua, en el que el fármaco antitumoral es paclitaxel, docetaxel etopósido, tenipósido, camptotecina o epotilona, y en el que el polímero soluble en agua es poli(ácido 1-glutámico), poli(ácido d-glutámico), o poli(ácido dl-glutámico), y en el que dicho polímero tiene un peso molecular de 30.000 a 60.000; y (2) una solución vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en el que dicho polímero soluble en agua se conjuga al 2'- ó 7-hidroxilo o ambos de paclitaxel o docetaxel.
- 15 3. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para el tratamiento de cáncer, una enfermedad autoinmune sistémica, o reestenosis arterial u oclusión arterial después de traumatismo vascular.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma maligno, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, leucemia.
5. Un dispositivo médico implantable, en particular, un estent, que se recubre con una composición que comprende paclitaxel conjugado con un polímero soluble en agua tal como se define en la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células del músculo liso.





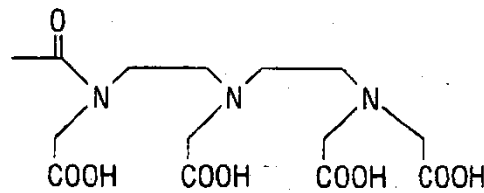
Paclitaxel: R1 = R2 = H

PEG-Paclitaxel:

R1 = COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>  
 R2 = H

7-DTPA-paclitaxel:

R1 = H  
 R2 =



2'-DTPA-paclitaxel:

R1 = R2 = H

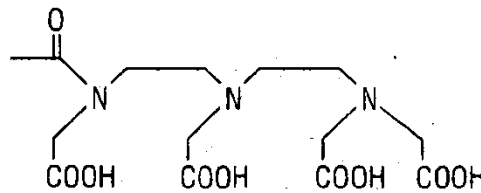


FIG. 1A

HOJA DE SUSTITUCIÓN (REGLA 26)

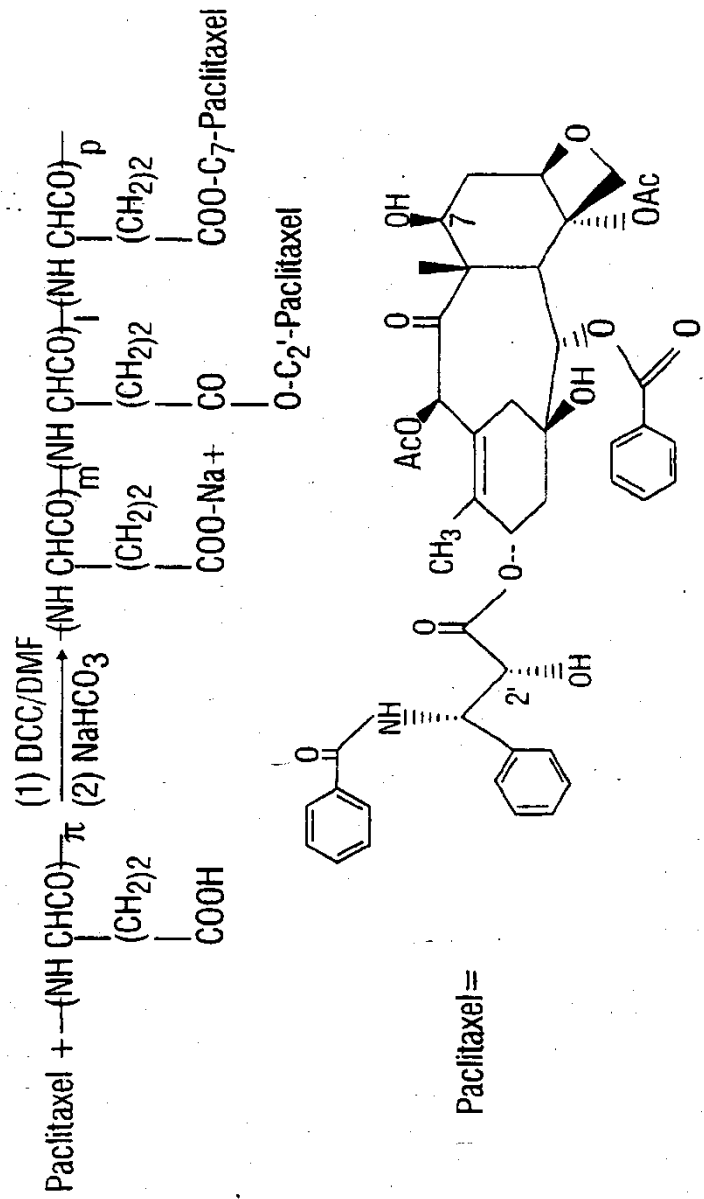


FIG. 1B

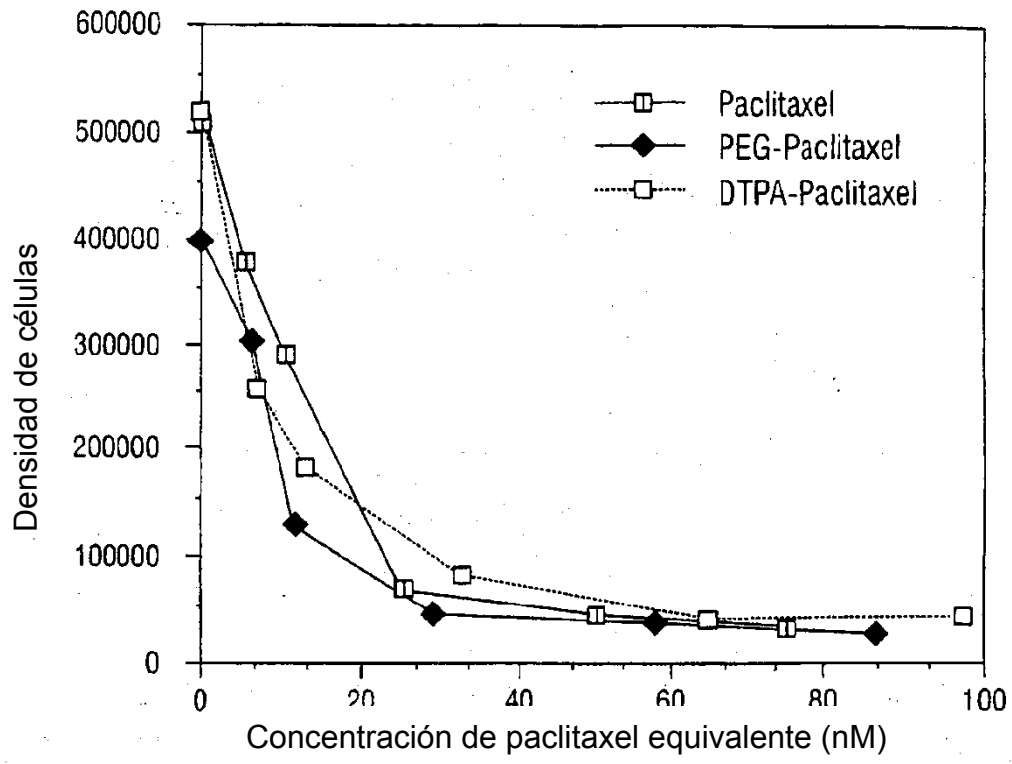


FIG. 2

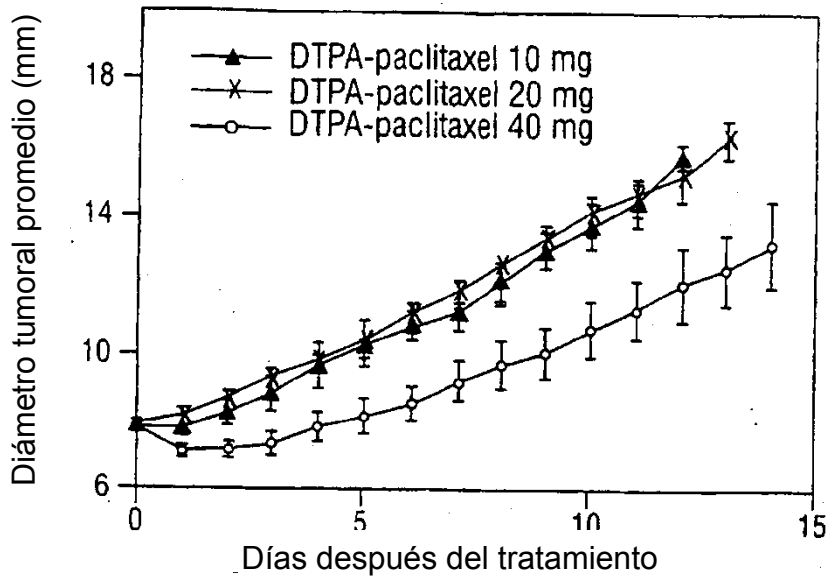


FIG. 3

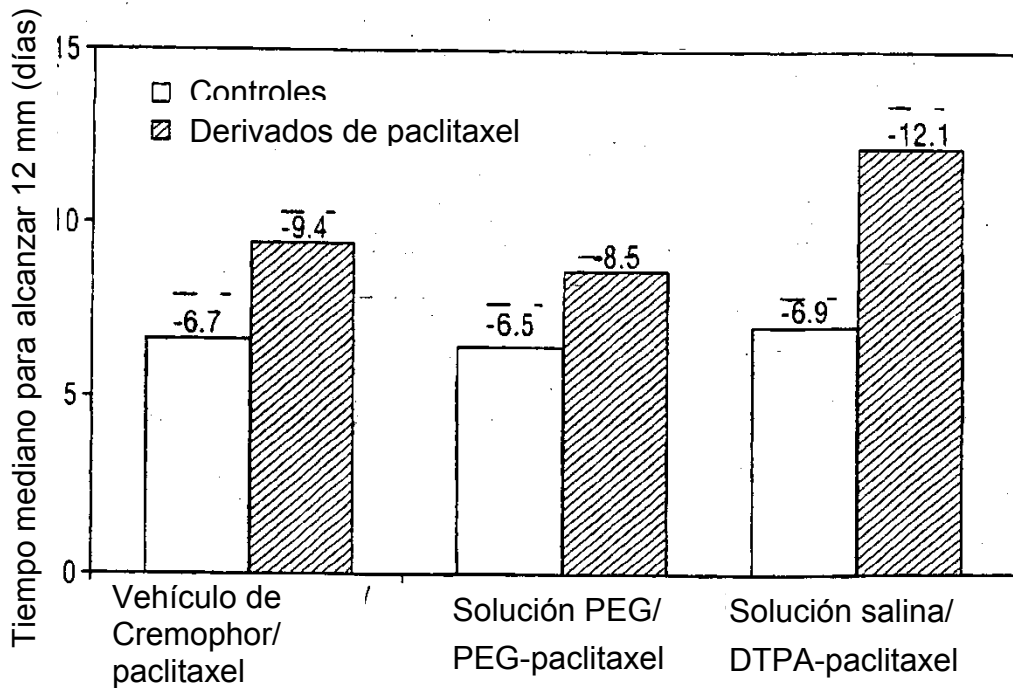


FIG. 4

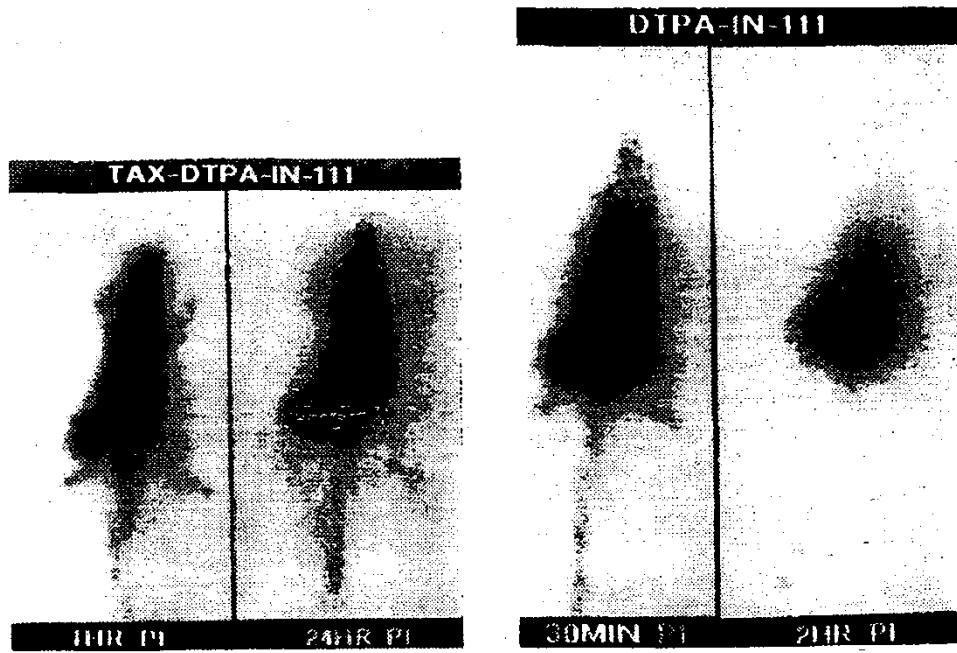


FIG.5

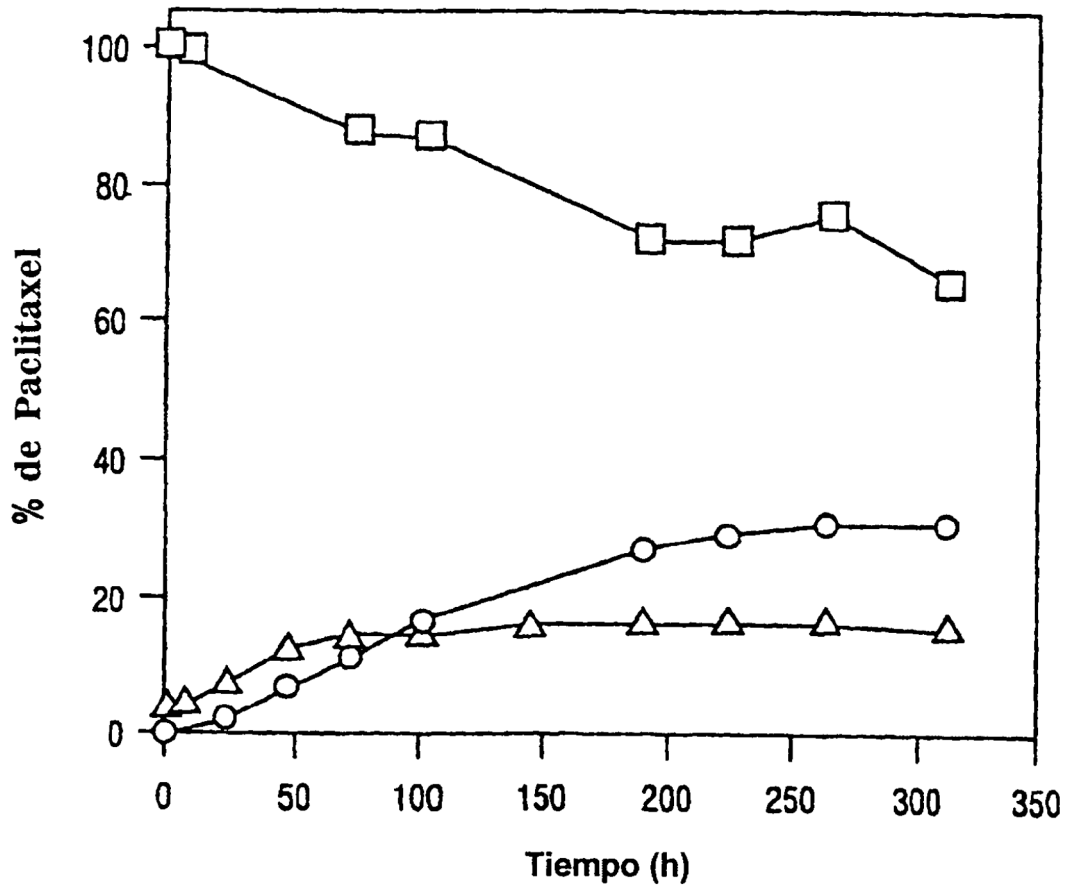


FIG. 6

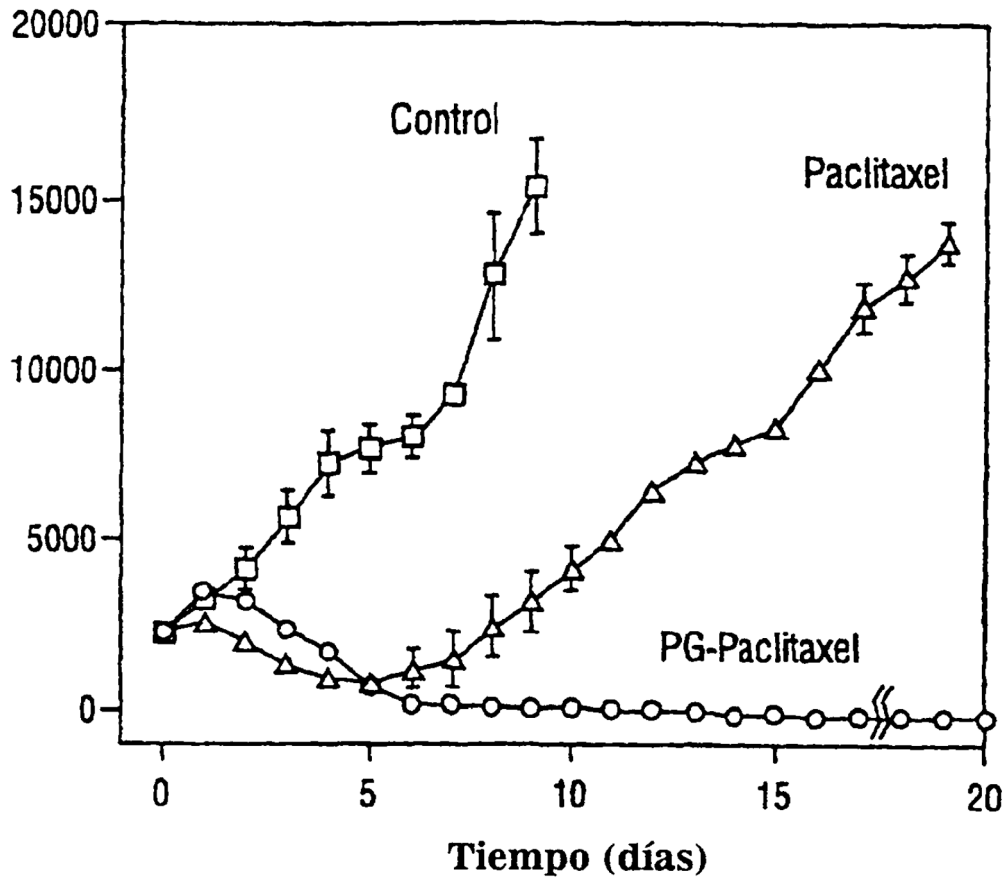


FIG. 7A

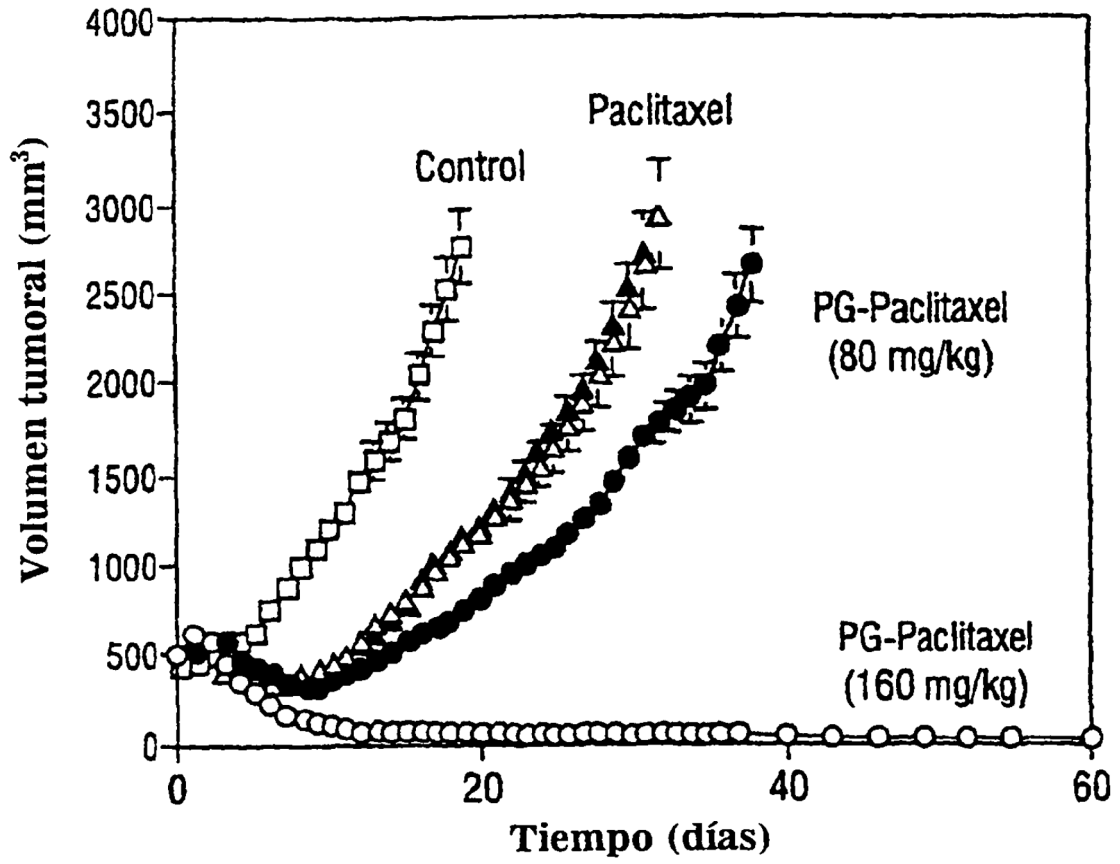


FIG. 7B



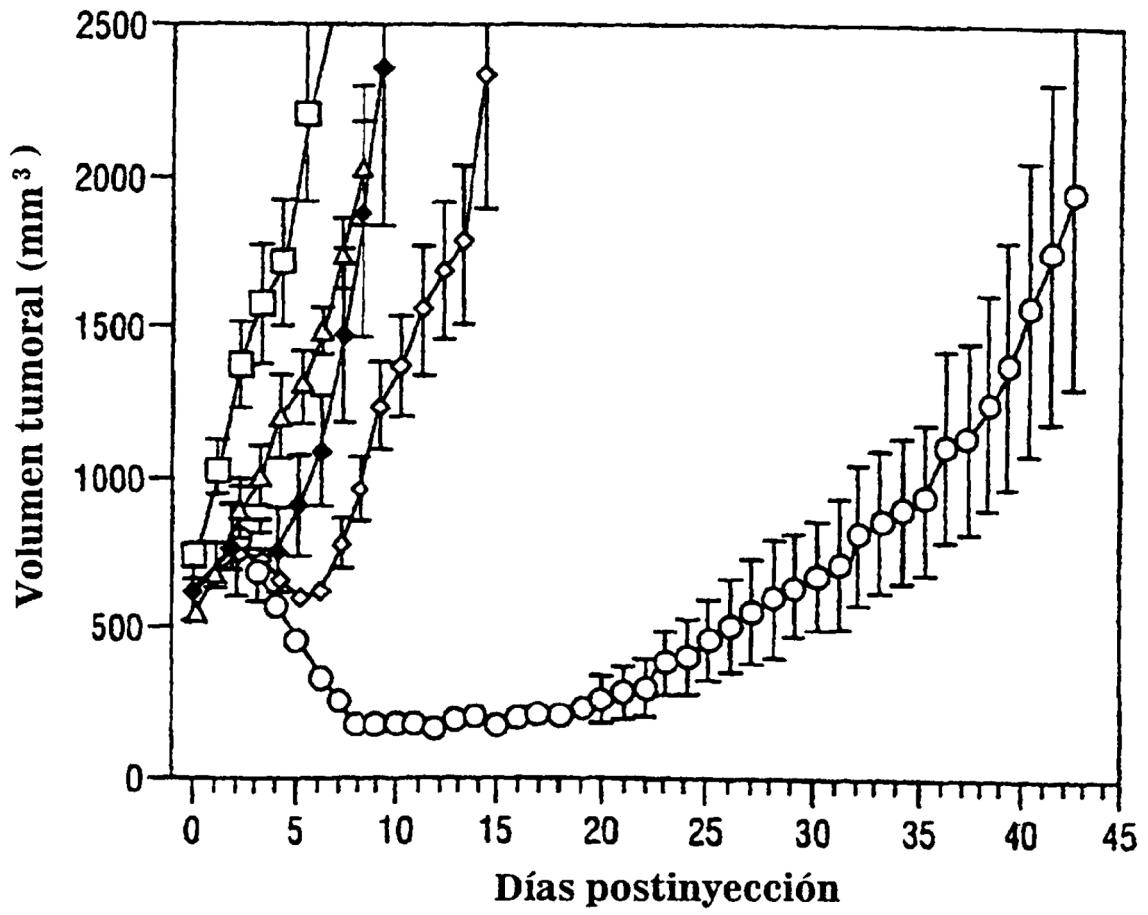


FIG. 7C

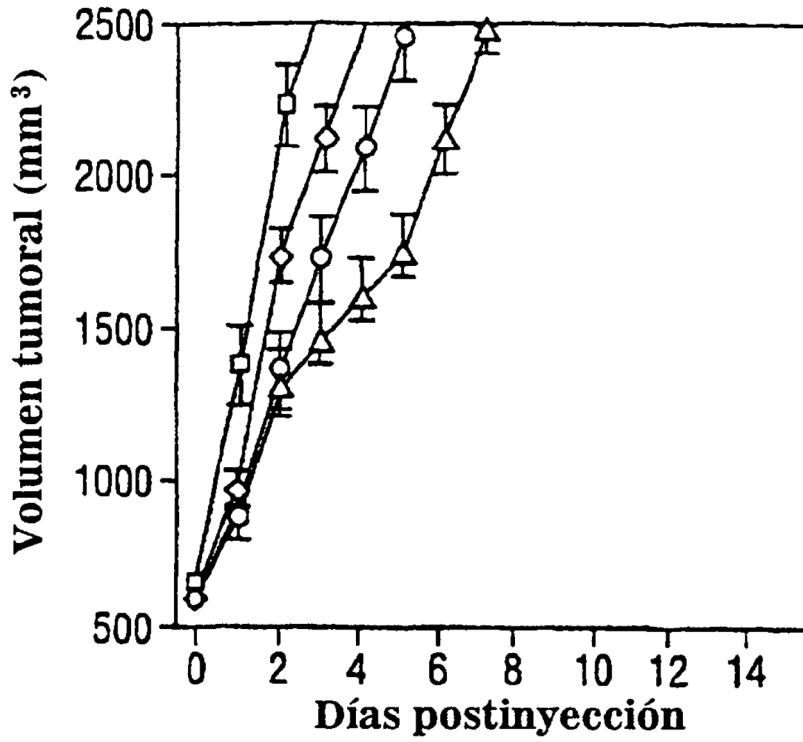


FIG. 7D

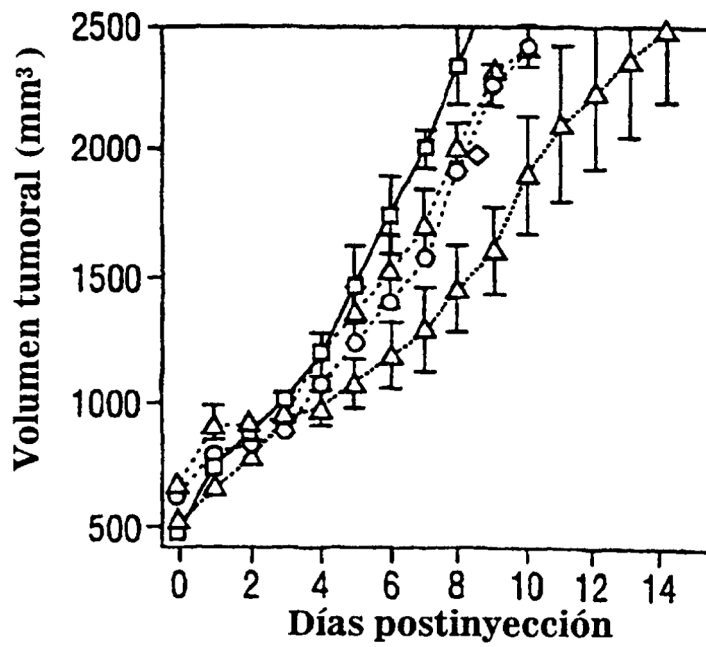


FIG. 7E

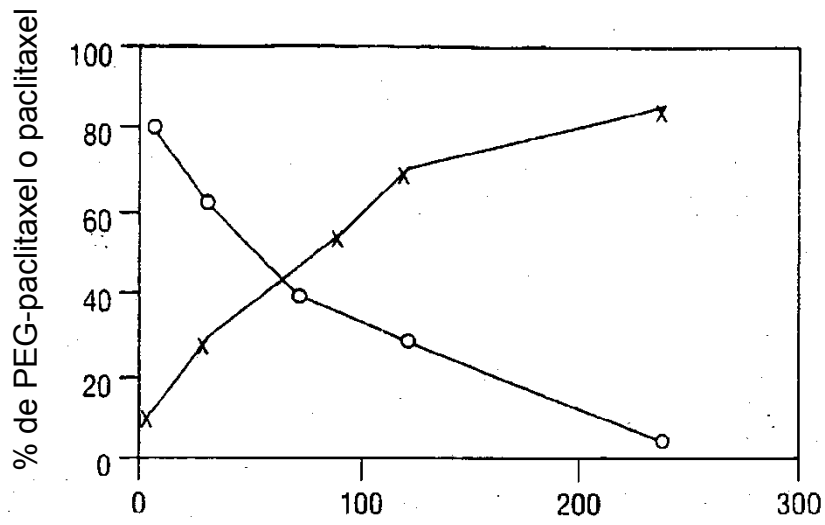


FIG. 8

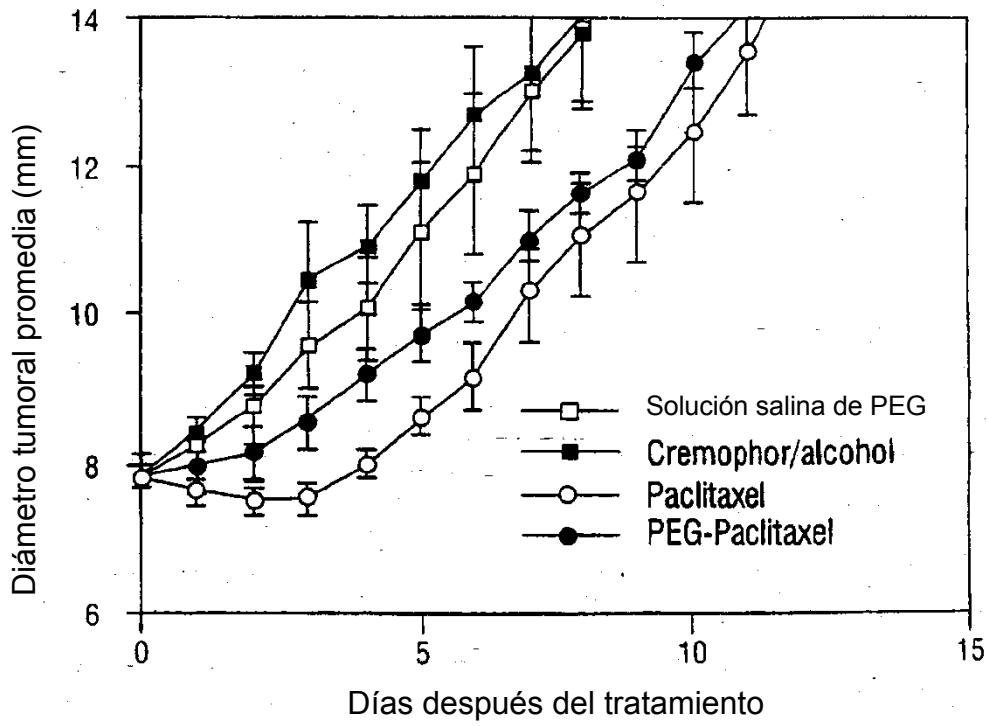


FIG. 9