

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 458 841**

(51) Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)  
**C08G 83/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2010 E 10812977 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2512521**

(54) Título: **Portadores de fármacos de polímero de alto peso molecular dendrítico y sus conjugados con fármacos especialmente para el tratamiento de tumores sólidos**

(30) Prioridad:

**15.12.2009 CZ 20090844**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.05.2014**

(73) Titular/es:

**USTAV MAKROMOLEKULARNI CHEMIE AV CR,  
V.V.I. (50.0%)  
Heyrovského nam. 1888/2  
162 06 Praha 6, CZ y  
MIKROBIOLOGICKÝ USTAV AV CR V.V.I. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**ETRYCH, TOMAS;  
CHYTIL, PETR;  
STROHALM, JIRI;  
ULBRICH, KAREL y  
RIHOVA, BLANKA**

(74) Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 458 841 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**

Portadores de fármacos de polímero de alto peso molecular dendrítico y sus conjugados con fármacos especialmente para el tratamiento de tumores sólidos.

## Campo técnico

La invención se refiere a portadores de fármacos de polímero dendrítico de alto peso molecular (HMW) solubles en agua y a sus conjugados con fármacos que permiten el transporte dirigido de fármacos antitumoriales al interior de tumores sólidos, la biodegradación, la liberación controlada asociada del fármaco y la posterior eliminación del portador de polímero del organismo. La acción del portador de polímero conjugado con un agente cancerostático tiene como objetivo la terapia dirigida de tumores humanos.

## **Antecedentes de la técnica**

Recientemente, el desarrollo de fármacos ha tenido como objetivo cada vez más la búsqueda de formas de fármacos que permitan una acción dirigida del principio activo principalmente en el sitio del efecto terapéutico requerido. Las formas activas dirigidas de fármaco encuentran aplicación con las sustancias cuyos efectos secundarios pueden conducir a daño de partes sanas del organismo. El problema más de actualidad es el peligro de dañar tejidos y órganos sanos, poniendo en peligro pacientes tratados con agentes citostáticos. La utilización de materiales de polímero, en particular polímeros solubles en agua como portadores para el transporte dirigido de fármacos es una de las posibilidades significativas de solución al problema mencionado. La unión de un agente citostático a polímero soluble en agua con un enlace covalente hace posible potenciar significativamente la solubilidad de fármacos escasamente solubles en agua y reducir proniadamente su toxicidad. Los pesos moleculares de conjugados de polímero-fármaco impiden la eliminación rápida del fármaco del organismo mediante filtración glomerular, prolongando por tanto significativamente su tiempo de circulación en sangre y también su tiempo de permanencia total en el organismo conduciendo así a un aprovechamiento biológico potenciado del fármaco. Además, el alto peso molecular del conjugado de polímero conduce a su superior acumulación en tumores sólidos debido al efecto de potenciación de la permeabilidad y retención (*"enhanced permeability and retention"*, EPR) [Maeda 2000].

Si se une un agente cancerostático a un portador de polímero, este efecto puede utilizarse para su acumulación dirigida en el tumor. En las últimas dos décadas, se han desarrollado varios sistemas que se basan en la utilización del efecto de EPR para dirigir fármacos tales como micelas poliméricas, liposomas o conjugados de polímero soluble en agua. Las micelas poliméricas, en contraposición a sistemas de polímero soluble, se preparan habitualmente ensamblando copolímeros de dibloque anfífilos en estructuras de HMW formando disoluciones coloidales. El fármaco se une a las micelas principalmente en sus núcleos hidrófobos mediante interacciones físicas (hidrófobas) o enlaces covalentes [Kataoka 2001, Bae 2003, Bronich 1999]. En contraposición a micelas de sistemas solubles que se acumulan en tumores sólidos, los polímeros se dispersan molecularmente en medios acuosos, adoptando habitualmente una conformación de hélice al azar, en la que el fármaco está en contacto con el polímero hidrófilo. Se estudiaron muchos tipos de conjugados de agentes cancerostáticos con polímeros solubles, en los que el fármaco se unía mediante enlaces covalentes o enlaces iónicos hidrolíticamente lábiles propensos a hidrólisis química común o enzimática. Los sistemas mencionados pueden liberar el agente cancerostático en su forma activa en el tejido tumoral o también de un modo específico directamente en la célula tumoral. Entre los sistemas solubles en agua, conjugados de polímero preparados basándose en copolímeros de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) pertenecen a los más importantes. Varios de ellos se dirigen de manera activa a tumores mediante una estructura de direccionamiento unida (anticuerpos, hormonas y oligopéptidos). [Duncan 1985, Řihová 2000, Kopeček 2001, Mrkvan 2005, patente de Ulbrich WO03/053473]. Se proporciona una visión general de aspectos químicos y estructurales de copolímeros de HPMA como portadores de fármacos por Ulbrich y Šubr [Ulbrich 2009].

Uno de los principales inconvenientes que impiden el uso de copolímeros de HPMA como portadores de fármacos en medicina humana es su cadena de carbono no escindible y los límites asociados de pesos moleculares utilizables para la preparación de portadores de polímero de pesos moleculares a aquellos inferiores a 40000-50000 (por debajo del umbral renal del organismo). Los polímeros de pesos moleculares altos no se eliminan del organismo eficaz y suficientemente y por tanto su uso como fármacos conduciría a su acumulación en el organismo. Si se desea un efecto de EPR pronunciado, es decir, acumulación significativa en tumores sólidos, es necesario trabajar con polímeros, incluyendo copolímeros de HPMA, con pesos moleculares muy por encima de los límites de exclusión [Seymour 1995, Noguchi 1998]. Por tanto, es importante que el peso molecular del portador de polímero sea suficientemente alto, pero que el polímero pueda degradarse, tras la liberación del componente activo, en fragmentos, que pueden eliminarse del organismo, por ejemplo, mediante filtración glomerular. Recientemente, se han patentado estructuras y actividades biológicas de fármacos que usan polímeros de HPMA y sus asociados con pesos moleculares por encima del límite de filtración renal. Se injertaron éstos con portadores de polímero [patente de Etrych CZ 298 945 B6, Etrych 2008, Etrych 2001] y micelas poliméricas [patente de Chytíl CZ PV 2006-207] a base de copolímeros de HPMA, en los que se unió un agente cancerostático a los polímeros con enlaces covalentes, que son enzimáticamente o tan sólo hidrolíticamente lábiles y, posiblemente, se unieron cadenas de polímero a estructuras de injerto a través de espaciadores biodegradables, escindibles de manera enzimática y/o

reductora, concretamente oligopéptido GlyPheLeuGly o un puente disulfuro. Una ventaja de los sistemas que contienen el agente cancerostático doxorubicina (Dox) como componente activo era una actividad antitumoral potenciada verificada en modelos de ratón en comparación con sistemas de polímero originales que contienen el mismo fármaco. Una desventaja de los sistemas mencionados es una distribución relativamente amplia de pesos moleculares (índice de polidispersidad  $I_n$  que oscila entre 3 y 4), por tanto un sistema no bien definido con una posibilidad limitada de obtener altos pesos moleculares que superan 200000 g/mol.

El objeto de la invención es la estructura y síntesis de un nuevo fármaco con polímero de HMW con una distribución estrecha de pesos moleculares ( $I_n \sim 1,5 - 2,5$ ) y con un esqueleto biodegradable definido caracterizado por acumulación potenciada del agente citostático en el tumor y, también, tras la degradación intracelular, por eliminación del portador de polímero del organismo. Su estructura emana de una parte central dendrítica, que lleva en ramas dendríticas injertos de polímero que contienen un fármaco unido covalentemente. Mediante la elección del número de injertos y su tamaño, es posible obtener altos pesos moleculares del polímero (hasta 1400000 g/mol). Se describieron anteriormente sistemas similares [Wang 2000], una diferencia principal entre el sistema descrito y el del objeto de la invención y los sistemas publicados anteriormente consiste en que los sistemas descritos anteriormente no tienen un esqueleto de polímero degradable de manera sencilla y el fármaco está unido sólo a través de la secuencia de oligopéptido GlyPheLeuGly degradable enzimáticamente. Para la modificación de los extremos de las ramas de dendrímeros, se usó a menudo poli(etilenglicol) (PEG) [Gajbhiye 2009, Bai 2009]. La tarea principal de PEG en estos sistemas era impedir grupos amino potencialmente tóxicos de dendrímeros; PEG no sirve en este caso como portador de moléculas biológicamente activas. De manera similar al caso anterior, los sistemas no son biodegradables. Si no se acumulan en el organismo, su utilización se limita a pesos moleculares bajos de hasta 50000 g/mol.

El uso de dendrímeros con otros polímeros, a menudo biodegradables, se ha mencionado en la bibliografía de patentes. Se unieron cadenas de poli(etilenglicol) a extremos de dendrímeros [Kojima 2003]. Se usaron poli(aminoácido)s para la preparación de conjugados de dendrímero-poli(aminoácido) [patente de Li WO03055935], en los que el conjugado se preparó mediante la polimerización de N-carboxianhídridos de  $\alpha$ -aminoácidos con iniciadores de dendrímeros. En este caso, el injerto de poli(aminoácido) lleva una carga negativa significativa (poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico)), una carga positiva (poliarginina, polihistidina, polilisina) o son hidrófobos y por tanto insolubles en fluidos corporales. Se une un fármaco, por ejemplo paclitaxel, al polímero a través de un enlace éster covalente. Debido a una alta densidad de carga en la superficie del sistema o su considerable hidrofobicidad e insolubilidad, pueden producirse interacciones no deseadas con diversos tejidos y acumulación en el organismo (por ejemplo riñones) tal como es típico, por ejemplo, de poli(aminoácido)s cargados negativamente [Rypáček 1982]. Tampoco la unión de un fármaco al polímero con un enlace éster covalente sin un espaciador biodegradable garantiza la liberación del fármaco en su forma activa original. En sistemas que utilizan injertos de poli(aminoácido), sólo se demuestra la degradación parcial de poli(ácido glutámico), en que sucede la escisión de un amplio espectro de fragmentos de bajo peso molecular y derivados de aminoácido del fármaco, que no son necesariamente activos biológicamente. La degradación de tales sistemas se documenta en la bibliografía sólo en un sistema modelo que contiene catepsina B y los datos sobre su degradación *in vivo* son incompletos.

Una ventaja del sistema según la presente invención son los injertos de polímero formados por un polímero soluble en agua inerte, no cargado, que no interacciona con el organismo, a base de copolímero de HPMA, al que se une el fármaco a través de espaciadores degradables intracelularmente que permiten la liberación controlada de fármaco activo en células y tejidos diana. Otra ventaja del sistema según la invención es la degradación enzimática o reductora intracelular demostrada inequívocamente del esqueleto del portador en productos de polímero de copolímero de HPMA soluble en agua inerte que pueden eliminarse del organismo mediante filtración glomerular. Por tanto, se garantiza la eliminación del portador de polímero de HMW del organismo, tras el transporte de un agente cancerostático al sitio del tumor.

En la bibliografía, se describen otros sistemas, en los que se unieron cadenas hidrófilas de poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida], poli(N-vinilpirrolidona), poli(metacrilato de etilenglicol), poli(N-isopropilacrilamida), poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), poli(metacrilato de 2-aminoetilo), poli[N-(3-aminopropil)metacrilamida] y poli[metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo] a poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(L-lactida), poli(D-lactida), poli(DL-lactida) y poli(ácido glicólico) lineal o en estrella [patente de Lele US7018655]. Los autores muestran que los sistemas así preparados forman sistemas de HMW que pueden utilizarse en el transporte de fármacos. Los sistemas forman micelas o nanopartículas en disolución gracias a la naturaleza anfífila de su estructura, que contiene, por ejemplo, poli( $\epsilon$ -caprolactona) hidrófoba y un polímero a base de HPMA. El fármaco en estos sistemas se adsorbe entonces mediante interacción hidrófoba, sobre el núcleo hidrófobo del sistema, lo que no permite la liberación controlada del fármaco dependiendo de las condiciones externas y no puede impedir la liberación del fármaco en el transcurso del transporte. Además, este sistema en la mayoría de los casos tiene problemas similares a los del sistema descrito en una patente [patente de Li WO03055935], es decir, una carga superficial e interacciones no deseadas en el organismo.

En contraposición al sistema mencionado anteriormente, que es, según la invención, soluble en agua y fluidos corporales, sin posibilidad de agregación, que lleva un fármaco unido a través de un espaciador biodegradable, lo que permite la liberación controlada del fármaco en tejido tumoral o células diana.

En la bibliografía, también se describen los sistemas que utilizan dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) como portadores, por ejemplo para fármacos antiinflamatorios [Kurtoglu 2009], en los que el fármaco (N-acetilcisteína) está unido a un dendrímero a través de un puente disulfuro escindible de manera reductora. En este sistema, el dendrímero de PAMAM sirve como portador. Por tanto, debido al PAMAM, es difícil obtener un alto peso molecular, lo que es importante para el direccionamiento pasivo al tejido tumoral.

#### Descripción de la invención

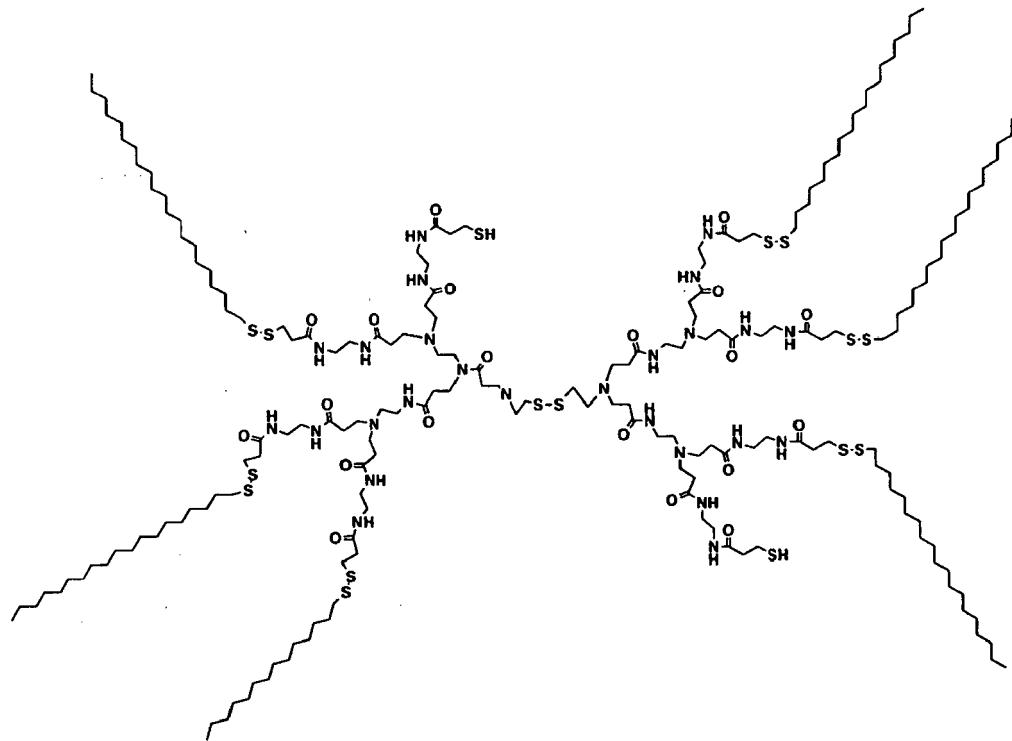
10 El objeto de la presente invención es la estructura y síntesis de nuevos portadores de fármacos de polímero de HMW con estructuras dendríticas y sus conjugados de fármaco, que difieren de los sistemas descritos anteriormente por distribuciones de pesos moleculares estrechas, estructura bien definida de los sistemas, esqueleto biodegradable y síntesis simplificada. Los fármacos con polímero descritos se caracterizan por acumulación potenciada de un agente cistostático en un tumor y por degradación intracelular y la capacidad asociada del portador de polímero para eliminarse del organismo tras la liberación del fármaco y cumplir su tarea de portador.

15 El objeto de los portadores de polímero biodegradables de HMW según la invención radica en que consisten en una generación G<sub>0</sub> hasta una generación G<sub>6</sub> central de estructura dendrítica de poli(amidoamina) y ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico, a cuyos grupos amino o hidroxilo se une N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA) semitelequérica a través de los extremos de cadenas de polímero usando espaciadores biodegradables.

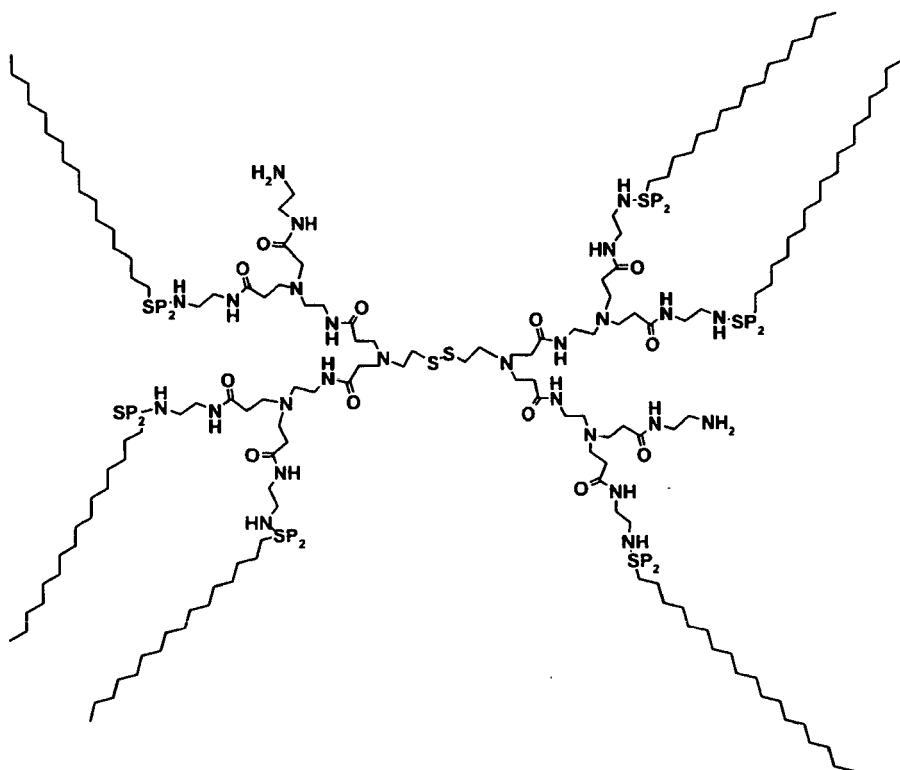
20 Como espaciadores biodegradables, que pueden degradarse en organismo vivos principalmente en tejidos o células diana, se usan enlaces disulfuro escindibles de manera reductora o secuencias de oligopéptido escindibles enzimáticamente. El peso molecular de la estructura dendrítica central así como los injertos semitelequéticos se selecciona por debajo del límite de eliminación del organismo (aprox. 50000 g/mol para copolímeros de HMPA) de modo que, tras la degradación, todos los componentes del portador podrían eliminarse del organismo mediante filtración glomerular. Las secuencias de oligopéptido degradables enzimáticamente que unen el dendrímero a un copolímero de HPMA contienen, preferiblemente, secuencias de GlyLeuGly, GlyPheGly, GlyPheLeuGly y GlyLeuPheGly.

25 30 35 40 Pueden introducirse espaciadores biodegradables en la estructura del portador de tres modos, mediante la reacción de grupos amino o hidroxilo en los extremos de las ramas del dendrímero usando polímeros semitelequéticos que contienen espaciadores degradables, mediante la reacción de un polímero semitelequético con un dendrímero cuyos grupos de extremo se modificaron con una estructura que contiene un espaciador biodegradable o introduciendo un enlace disulfuro escindible de manera reductora en la estructura del conjugado mediante la reacción de un grupo tiol del dendrímero activado con un grupo de extremo tiol de un polímero semitelequético.

45 Un aspecto de la invención es adicionalmente un portador de polímero con una estructura dendrítica de poli(amidoamina) en su parte central, que se inserta sobre los grupos amino con un copolímero de HPMA semitelequético, estando los injertos de polímero unidos al dendrímero a través del extremo de la cadena de polímero por medio de un enlace amida y un espaciador biodegradable. El portador de polímero tiene las estructuras esquemáticas I y II.



I.

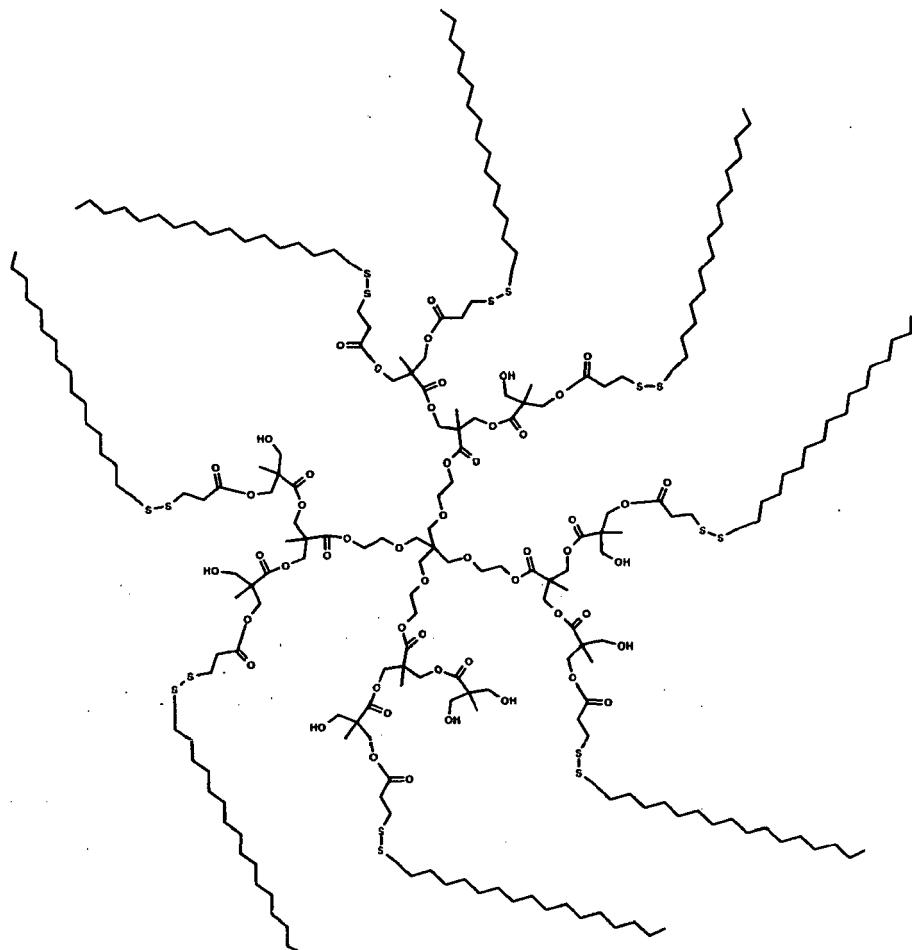


II.

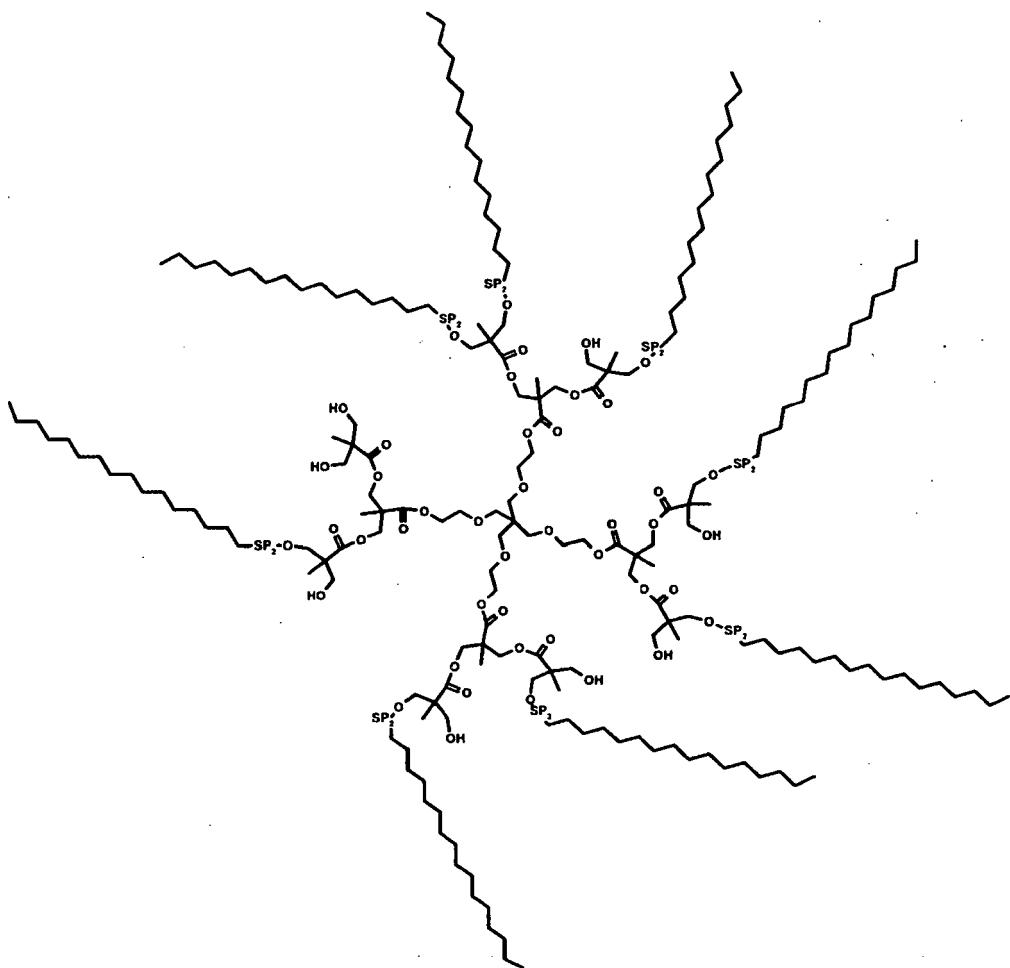
- 5 Un objeto de la invención es adicionalmente un portador de polímero, cuya parte central está formada por una estructura dendrítica de generación G<sub>0</sub> hasta generación G<sub>6</sub> a base de poli(amidoamina), que contiene 4-256 grupos amino, piridildisulfanilo o carboxilo, con una unidad de núcleo preferiblemente por cisteamina, etilendiamina, butano-1,4-diamina, hexano-1,6-diamina o dodecano-1,12-diamina.

El objeto de la presente invención es adicionalmente un portador de polímero, cuya parte central está formada por una estructura dendrítica a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico, a la que se une a través de los grupos hidroxilo un copolímero de HPMA semitelequético, estando los injertos de polímero unidos al dendrímero a través de un enlace éster y un espaciador biodegradable. El portador de polímero tiene las estructuras esquemáticas III y IV.

5



III.



## IV.

Un aspecto adicional de la presente invención es un portador de polímero dendrítico, cuya parte central está formada por una estructura dendrítica a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico de generación uno hasta generación seis, que contiene 8-256 grupos de extremo hidroxilo, piridildisulfanilo o carboxilo.

Un aspecto del portador de polímero dendrítico según la presente invención es que contiene 2-28 injertos formados por un copolímero de HPMA que contiene el 0,5 - 8% en moles de unidades de monómero de hidrazida de aminoácido metacriloilada de SP<sub>1</sub>, en la que el aminoacilo se selecciona preferiblemente del grupo β-alanilo, 6-aminohexanoilo (AH), 4-aminobenzóilo y/o el acilo complejo SP<sub>2</sub> derivado de hidrazidas de oligopéptidos GlyGly, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly y GlyPheLeuGly.

La invención incluye además un portador de polímero de HMW, en el que se unen injertos de polímero a la parte dendrítica de poli(amidoamina) central a través de un enlace biodegradable que contiene un disulfuro o un oligopéptido biodegradable. El oligopéptido según la invención se selecciona preferiblemente del grupo de oligopéptidos degradables enzimáticamente GlyLeuGly, GlyPheGly, GlyLeuPheGly y GlyLeuPheGly.

Un objeto adicional de la invención es un conjugado de polímero de HMW con un fármaco, que consiste en un portador de polímero dendrítico según la presente invención y un fármaco unido al portador a través de un enlace escindible hidrolíticamente.

Un aspecto de la invención es también un conjugado de polímero de HMW, en el que el fármaco es preferiblemente un agente cancerostático. Un aspecto adicional de la invención es un conjugado de polímero dendrítico, en el que el agente cancerostático es preferiblemente doxorubicina, unida al portador a través de un enlace hidrazone escindible hidrolíticamente.

Un aspecto adicional de la invención es el conjugado de polímero de HMW según la invención, que consiste en un portador de polímero según la invención y un fármaco unido mediante amida, en el que 2-28 injertos de copolímero

- de HPMA que contienen el 0,5 - 8% en moles de unidades de monómero de hidrazidas de oligopéptidos metacriloiladas SP<sub>2</sub> con fármaco unido, preferiblemente doxorubicina, unida a través de un enlace amida en el extremo de la secuencia de oligopéptido, seleccionándose el oligopéptido del grupo que consiste en GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly y GlyPheLeuGly.
- 5 Un objeto adicional de la invención es un conjugado del portador de HMW derivado de una estructura dendrítica y con doxorubicina, en el que el contenido en doxorubicina es del 1-25% en peso. La presente invención también incluye una composición farmacéutica que contiene, como componente activo, un conjugado de polímero de HMW derivado de la estructura dendrítica según la invención. La composición está destinada para el uso en el tratamiento de tumores, concretamente de tumores sólidos, algunos tipos de linfoma y leucemia.
- 10 En conjugados de polímero, el portador lleva un fármaco unido a través de un enlace biodegradable, preferiblemente un enlace hidrazone escindible hidrolíticamente dependiente de pH o espaciador de oligopéptido escindible con enzimas lisosómicas. El conjugado de polímero se construye para obtener un peso molecular suficientemente alto, que podría superar significativamente el límite de exclusión del organismo para proporcionar un tiempo de circulación en sangre prolongado, un efecto de EPR suficientemente alto y captura en tejido tumoral sólido. El peso molecular del conjugado puede controlarse mediante el de los polímeros semitelequéticos usados en la síntesis, mediante el número de generaciones del dendrímero usado y la sustitución de grupos de extremo dendríticos. El peso molecular de tal sistema dendrítico oscila preferiblemente entre 40000 y 1400000 g/mol, el contenido en Dox, tanto en cadenas de polímero y como en el conjugado dendrítico resultante oscila entre el 1 y el 25% en peso (el 0,3 – 8% en moles en el polímero).
- 15 Los conjugados de polímero dendrítico según la invención están destinados predominantemente para aplicación intravenosa (inyección o infusión), pero también pueden aplicarse a tumores o por vía intraperitoneal. El polímero con un agente citostático unido químicamente es estable en la circulación sanguínea, los espaciadores de oligopéptido o enlaces hidrazone son relativamente estables en condiciones fisiológicas del torrente sanguíneo (pH 7,4). Tras su extravasación y captura en tumores sólidos, el conjugado disuelto penetra en las células tumorales por pinocitosis gracias al efecto de EPR. Debido a una disminución del pH desde un pH externo de 7,4 a uno intracelular de 5-6, el enlace hidrazone se hidroliza, el agente citostático se libera en células diana y se activa. De 20 manera similar, tras entrar en células tumorales, los enlaces disulfuro o espaciadores de oligopéptido se escinden en el citoplasma y los lisosomas celulares. El fármaco se unió a través de un espaciador de oligopéptido y, al mismo tiempo, el esqueleto de polímero se degrada en fragmentos, que pueden eliminarse del organismo. Si, además, si se incorpora una estructura dendrítica de PAMAM con núcleo de cisteamina en el conjugado, el núcleo ya contiene 25 enlaces disulfuro biodegradables que permiten la descomposición del sistema en células tumorales en productos de degradación de pesos moleculares inferiores.
- 30 En contraposición a los sistemas descritos en la bibliografía, el portador según la presente invención, tras cumplir su función de un portador de HMW dirigido de manera pasiva, puede degradarse en el organismo en fragmentos de polímero cortos biocompatibles y muy solubles. En un medio reductor ligeramente ácido de la célula, los enlaces disulfuro se reducen (según la bibliografía, la concentración de glutatión en el citoplasma de células animales oscila entre 1 y 5 mmol/l) y el sistema de HMW se descompone en fragmentos del polímero original, que pueden 35 eliminarse del organismo. Debe producirse una degradación del portador similar con los portadores que contienen cadenas de polímero unidas a la estructura dendrítica a través de secuencias de oligopéptido escindibles enzimáticamente. En este caso el esqueleto del polímero debe degradarse mediante la acción de enzimas lisosómicas. La realidad del mecanismo de acción propuesto de conjugados de polímero según la invención se documenta por la liberación modelo de doxorubicina del portador de polímero y por la degradación de polímeros dendríticos estudiados en medio que imita las relaciones en la célula animal. Los resultados de estas pruebas, incluyendo pruebas para la actividad antitumoral, se facilitan en los ejemplos de la presente solicitud de patente.
- 40 El objeto de la invención son por tanto portadores de HMW biodegradables de agentes cancerostáticos y conjugados de los portadores con agentes cancerostáticos seleccionados, preferiblemente doxorubicina, con efectos citotóxicos y citostáticos pronunciados sobre tumores sólidos.
- 45 Los portadores de polímero y sus conjugados con fármacos pueden dividirse en los siguientes grupos:
- 50 Los portadores de polímero de tipo 1 se caracteriza porque el núcleo del sistema está formado por un núcleo de dendrímero a base de poli(amidoamina) con la parte central formada por cisteamina, etilendiamina, butano-1,4-diamina, hexano-1,6-diamina o dodecano-1,12-diamina, con 4 - 256 grupos amino de extremo (véanse las estructuras en los esquemas 11, 13 y 14) sobre los que se unen 2 - 28 injertos de copolímero de HPMA con pesos 55 moleculares de 10000- 50000 g/mol a través de espaciadores que contienen enlaces disulfuro escindibles de manera reductora caracterizados porque los injertos de copolímero se seleccionan de un grupo de copolímeros de HPMA semitelequéticos con estructuras y composición facilitadas en los esquemas 7-10.
- 60 El portador de polímero de tipo 2 se caracteriza porque el núcleo del sistema está formado por una estructura dendrítica a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico, con 8 - 256 grupos de extremo hidroxilo (véanse las estructuras en los esquemas 12 - 14) sobre los que se unen 2 - 28 injertos de copolímero de HPMA con pesos 65

moleculares de 10000 - 50000 g/mol a través de espaciadores que contienen enlaces disulfuro escindibles de manera reductora caracterizados porque los injertos de polímero se seleccionan del grupo de copolímeros de HPMA semitelequélidos con estructuras y composiciones facilitadas en los esquemas 7-10.

5 El portador de polímero de tipo 3 se caracteriza porque el núcleo del sistema está formado por la misma estructura dendrítica que en el caso del portador de polímero de tipo 1, estando el polímero semitelequélico unido a través de secuencias de oligopéptido biodegradables, GlyPheLeuGly, caracterizado porque el injerto de polímero se selecciona de un grupo de copolímeros de HPMA semitelequélidos con estructuras y composiciones facilitadas en los esquemas 1-6.

10 10 El portador de polímero de tipo 4 se caracteriza porque el núcleo del sistema está formado por el mismo dendrímero que en el caso del portador de polímero de tipo 2, estando el polímero semitelequélico unido a través de secuencias de oligopéptido biodegradables, preferiblemente GlyPheLeuGly, caracterizado porque el injerto de polímero se selecciona de un grupo de copolímeros de HPMA semitelequélidos con estructuras y composiciones facilitadas en los esquemas 1-6.

15 20 Las estructuras de los conjugados de polímero de tipo 1 - 4 son idénticas a las estructuras de portadores de polímero; sin embargo, se une un agente cancerostático a injertos de polímero mediante simplemente enlaces hidrazone escindibles hidrolíticamente o enlaces amida escindibles enzimáticamente en el extremo de la secuencia de oligopéptido (espaciador). El peso molecular de los conjugados de polímero oscila entre 40000 y 1400000 g/mol dependiendo del tamaño del resto dendrítico, la longitud del polímero semitelequélico y el grado de sustitución.

#### Estructuras de portadores de polímero dendrítico y sus conjugados con doxorubicina

25 30 35 La síntesis de portadores de polímero y conjugados de polímero con Dox unida según la invención se lleva a cabo en varias etapas. Consiste en la síntesis de monómeros (HPMA, oligopéptidos metacriloilados con Dox unida como amida, derivados metacriloilados de aminoácidos y oligopéptidos terminados con grupo hidrazida o hidrazida protegido con Boc), síntesis posteriores de precursores de polímeros (polímeros semitelequélidos con grupos de extremo reactivos para unirse a la estructura dendrítica central y que llevan a lo largo de las cadenas grupos hidrazida protegidos o no protegidos o restos de fármaco unidos a través de un espaciador de oligopéptido) preparados mediante polimerización por radicales. Se describió en detalle anteriormente la síntesis de monómeros y precursores de polímeros semitelequélidos [patente de Etrych CZ 298 945 B6, Etrych 2008]. Se realizó la síntesis de polímeros semitelequélidos mediante polimerización por radicales en presencia de un agente de transferencia de cadena (ácido 3-sulfanilpropanoico) (SPA) o mediante copolimerización iniciada con un iniciador azo bifuncional (ácido 3,3'-azobis(cianoisovalérico)) (ABIA), o 3,3'-[4,4'-azobis(4-ciano-4-metil-1-oxobutano-4,1-diil)]bis(tiazolidin-2-tiona), ABIA-TT) o mediante una polimerización por radicales controlada (RAFT, transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible) iniciada con azobisisobutironitrilo y ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanoico seguido por reducción con borohidruro de sodio.

40 45 Los copolímeros semitelequélidos se caracterizan porque contienen un 85 – 99% en moles de unidades de HPMA, un 1 - 15% en moles de unidades de hidrazidas de aminoácido protegidas con Boc metacriloiladas u oligopéptidos u oligopéptidos metacriloilados con un fármaco unido y un grupo reactivo en el extremo de la cadena reactiva. En la síntesis de portadores y conjugados, se usaron copolímeros semitelequélidos, que contenían los siguientes grupos reactivos: carboxilo, carboxitiazolidintiona (TT), grupo amino primario, tiol y piridildisulfanilo (PDS). Las estructuras de los polímeros se facilitan a continuación en los esquemas que muestran las estructuras de polímeros, portadores y conjugados. Se usan los siguientes símbolos:

- 50 (i) SP<sub>1</sub> para acilo de aminoácido en hidrazidas de aminoácido metacriloiladas, por ejemplo glicilo, β-alanilo, 6-aminohexanoilo (AH), 4-aminobenzoilo y/o un acilo complejo derivado de los oligopéptidos GlyGly, GlyPheGly, GlyLeuGly, GlyLeuPheGly y GlyPheLeuGly;
- 55 (ii) SP<sub>2</sub> para acilo complejo en amidas de aminoácido metacriloiladas derivadas de secuencia de oligopéptido degradable enzimáticamente que contiene, preferiblemente, las secuencias de oligopéptido biodegradables GlyLeuGly, GlyPheGly, GlyPheLeuGly y GlyLeuPheGly;
- (iii) MA para metacrililo
- (iv) AE para 2-aminoetilo
- 60 (v) SP para sulfanilpropanoilo.

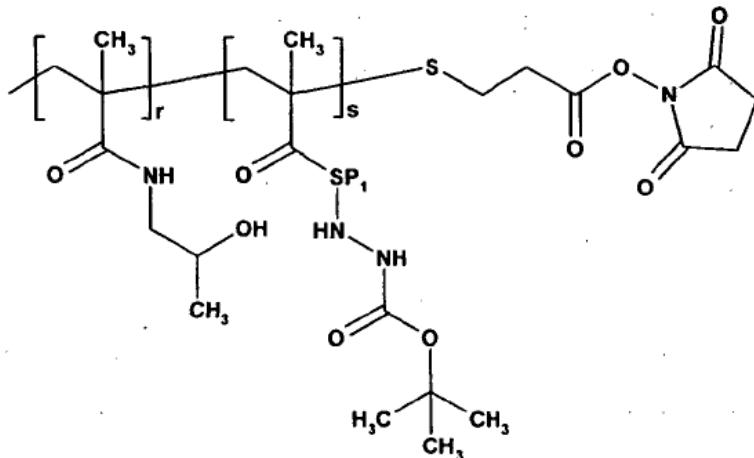
#### Lista de copolímeros

#### Polímero 1

65 Copolímero de HMPA e hidrazidas de oligopéptido o hidrazidas de aminoácido metacriloiladas, estando los grupos

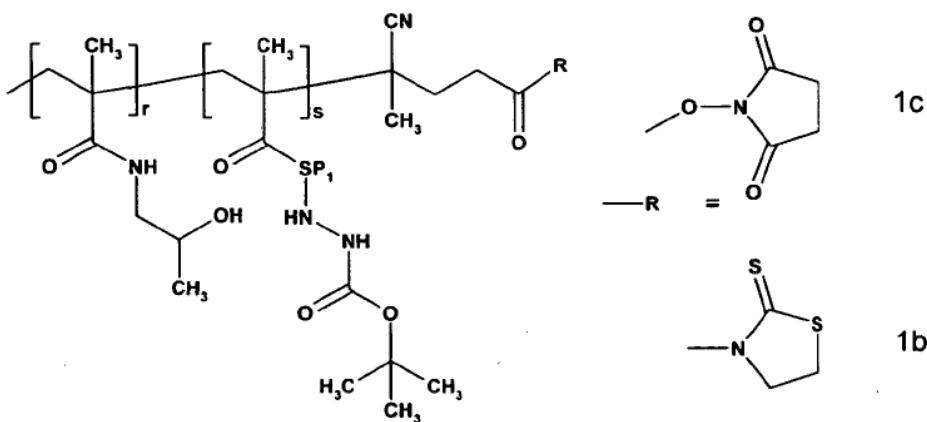
hidrazida protegidos con Boc (-CONHNH-Boc), el copolímero contiene grupo de cadena de extremo carboxilo o éster N-succinimidílico reactivo (polímero 1a). Se preparó el copolímero mediante copolimerización en presencia de agente de transferencia de cadena (ácido sulfanilpropanoico, SPA). En la segunda etapa, se transformó el grupo de extremo de cadena de SPA(-COOH) en éster N-succinimidílico mediante la reacción de N-hidroxisuccinimida/DCC.

5



Esquema 1: Estructura de polí(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-SPA-OSu (polímero 1a)

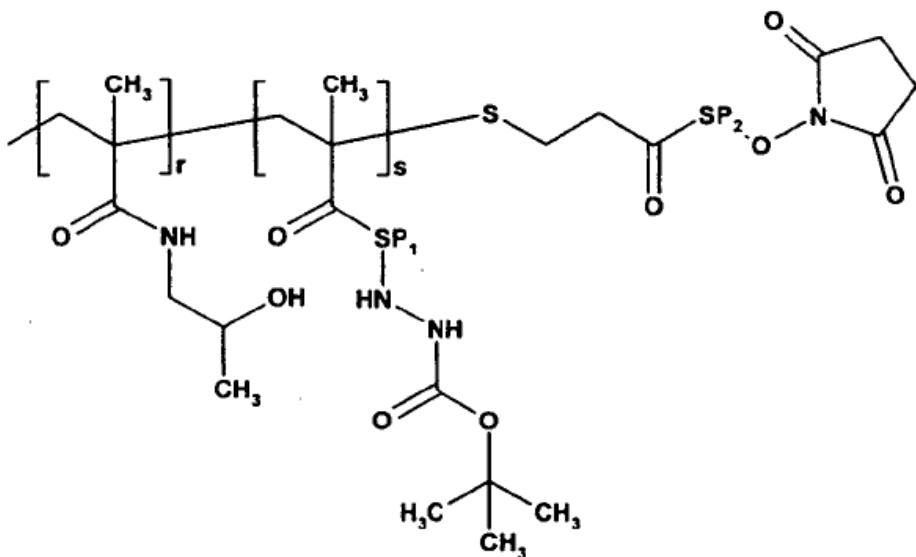
- 10 Copolímero de HPMA con aminoácidos metacriloilados u oligopéptidos terminados con grupo hidrazida protegido con Boc, el copolímero contiene grupo de extremo de cadena de carboniltiazolidin-2-tiona (polímero 1b) o grupo de extremo de cadena de éster N-succinimidílico (polímero 1c) reactivo.



15

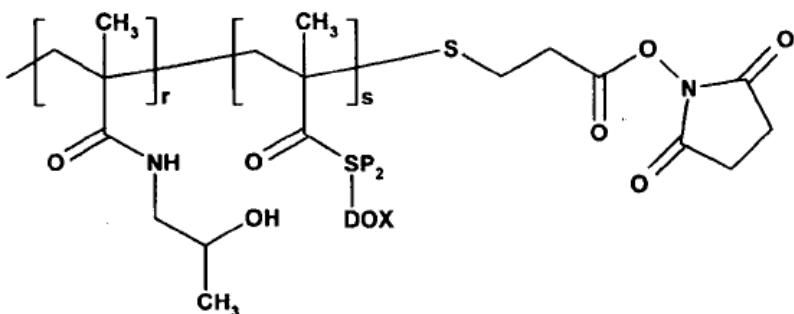
- Esquema 2: Estructura de polí(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-TT (polímero 1b) o polí(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-OSu (polímero 1c)

- 20 Se preparó copolímero de HPMA con aminoácidos metacriloilados u oligopéptidos terminados con grupo hidrazida protegido con Boc y grupo éster N-succinimidílico de extremo de cadena de un oligopéptido biodegradable, por ejemplo GlyPheLeuGly, generalmente SP2 (polímero 1d), mediante síntesis de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar éster N-succinimidílico de copolímero de polí(HPMA-co-MA-AHNHNH-Boc)-SPA-OSu con el grupo amino de oligopéptido GFLG. En la segunda etapa, se transformó el grupo de extremo de cadena carboxilo del copolímero preparado polí(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLG-COOH en el éster N-succinimidílico mediante la reacción de N-hidroxisuccinimida/DCC.
- 25



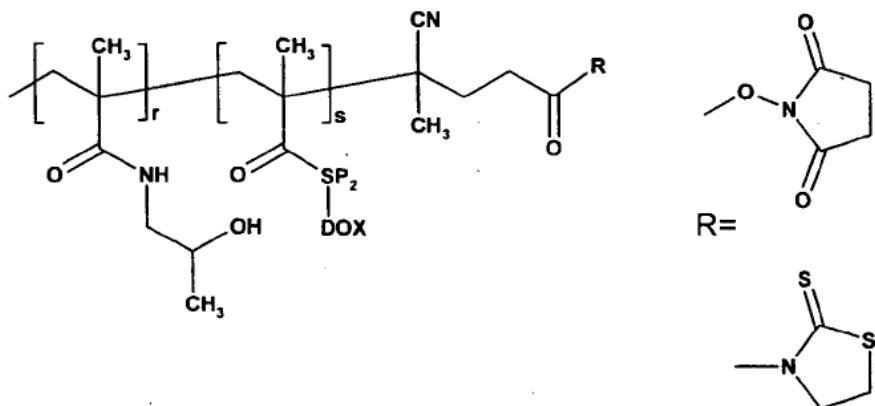
Esquema 3: Estructuras de poli(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-SPA-SP2-OSu (polímero 1d)

- 5 Se prepararon copolímeros de HPMA y oligopéptido metacriloilados con fármaco unido mediante grupo amida mediante polimerización por radicales de HPMA llevada a cabo en presencia de SPA como agente de transferencia de cadena. Los copolímeros están terminados con grupos carboxilo o éster N-succinimidílico (polímero 1e). Se prepararon los copolímeros mediante copolimerización en presencia de agente de transferencia de cadena SPA. En la segunda etapa, se transformó el grupo de extremo carboxilo en el éster N-succinimidílico mediante la reacción de N-hidroxisuccinimida/DCC.
- 10



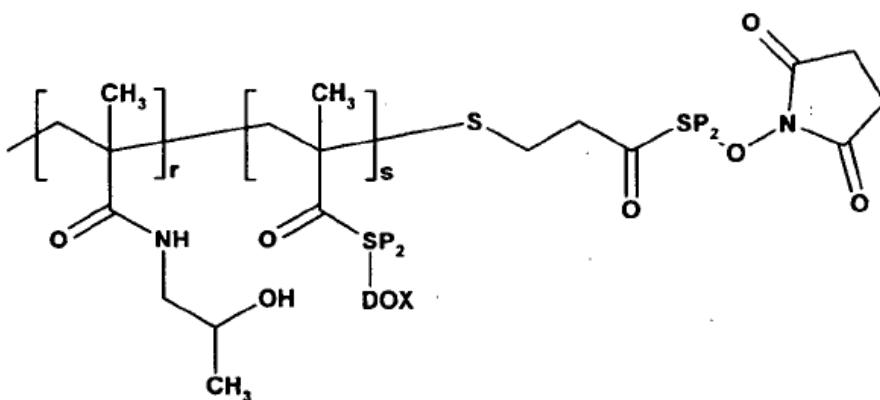
Esquema 4: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-SPA-OSu (polímero 1e)

- 15 Se preparó un copolímero de HPMA y oligopéptidos metacriloilados con un fármaco unido mediante enlace amida que termina con grupo de extremo carboniltiazolidin-2-tiona (polímero 1f) mediante polimerización por radicales de los monómeros correspondientes iniciada con ABIA-TT. Se preparó el copolímero terminado con grupo éster N-succinimidílico de un modo similar con iniciación con ABIA-TT y posterior activación del grupo de extremo de cadena carboxilo con N-hidroxisuccinimida (polímero 1g).
- 20



Esquema 5: Estructuras de poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-TT (polímero 1f y polímero 1g)

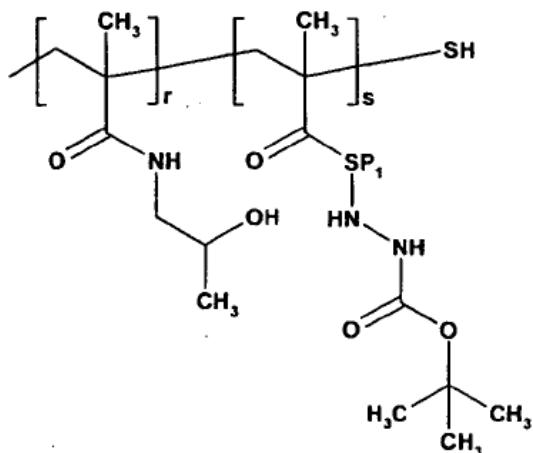
- 5 Se prepararon copolímeros de HPMA y oligopéptidos metacriloilados con un fármaco unido mediante amida, con  
 éster N-succinimidílico de extremo de cadena de oligopéptido biodegradable (por ejemplo GlyPheLeuGly),  
 generalmente SP2 (polímero 1h), mediante síntesis de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar éster  
 succinimidílico de copolímero poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-SPA-OSu con el grupo amino del oligopéptido. En la  
 10 segunda etapa, se transformó el grupo de extremo de cadena carboxilo del copolímero preparado poli(HPMA-co-  
 MA-SP2-Dox)-SPA-GFLG-COOH en el éster N-succinimidílico mediante la reacción de N-hidroxisuccinimida/DCC.



Esquema 6: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-SPA-SP2-OSu (polímero 1h)

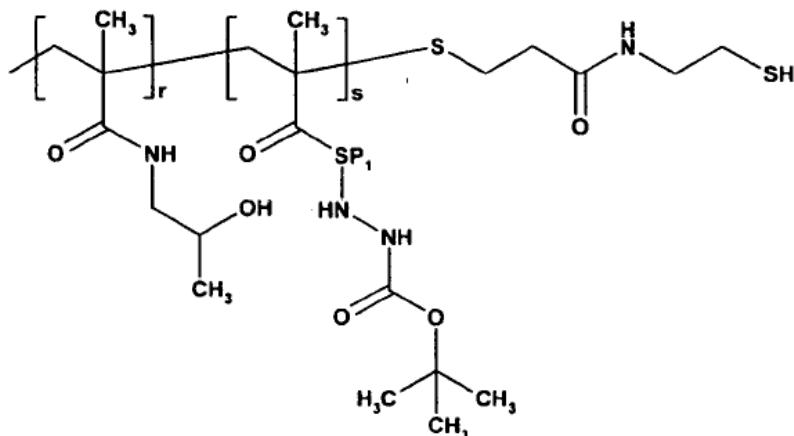
15

Se preparó el copolímero básico de HPMA e hidrazida de oligopeptido o aminoácido metacriloilada, estando los grupos hidrazida protegidos con Boc, con la cadena principal terminada con tiol mediante copolimerización RAFT de HPMA y comonomero relevante y posterior reducción con borohidruro de sodio (polímero 2 $\gamma$ ).



Esquema 7: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-SH (polímero 2z)

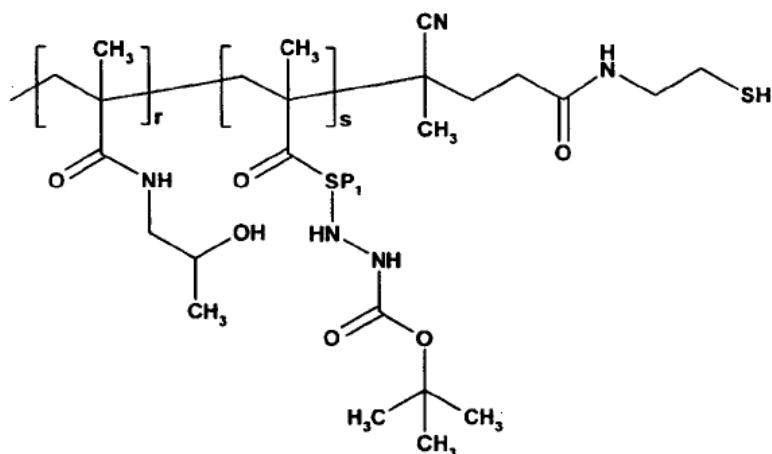
- 5 Se prepararon copolímeros de HPMA de HPMA e hidrazidas de oligopéptido o aminoácido metacriloiladas, estando las hidrazidas protegidas con N-Boc, con la cadena principal terminada con grupo tiol mediante la reacción de éster succinimidílico de polímero 1a con 2-(2-piridildisulfanil)etilamina (PDEA) y posterior reducción con ditiotreitol (DTT) (polímero 2a).



10

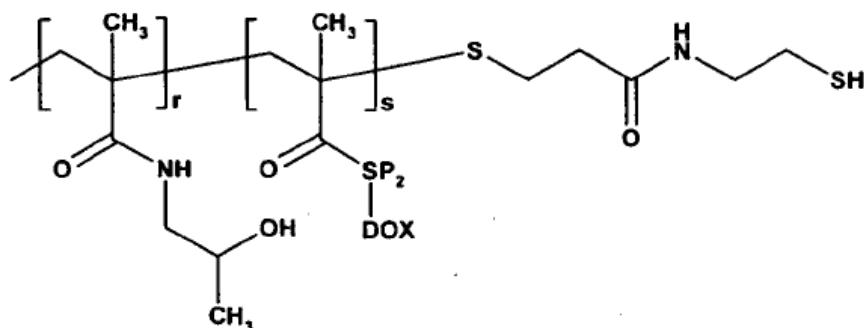
Esquema 7b: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-SPA-AE-SH (polímero 2a)

- 15 Se prepararon el copolímero de HPMA e hidrazida de oligopéptido o aminoácido metacriloilada, estando los grupos hidrazida protegidos con Boc, con la cadena principal terminada con grupo tiol mediante la reacción de grupos carboxilo de extremo de cadena activados de los polímeros 1b y 1c con PDEA y posterior reducción con DTT (polímero 2b).

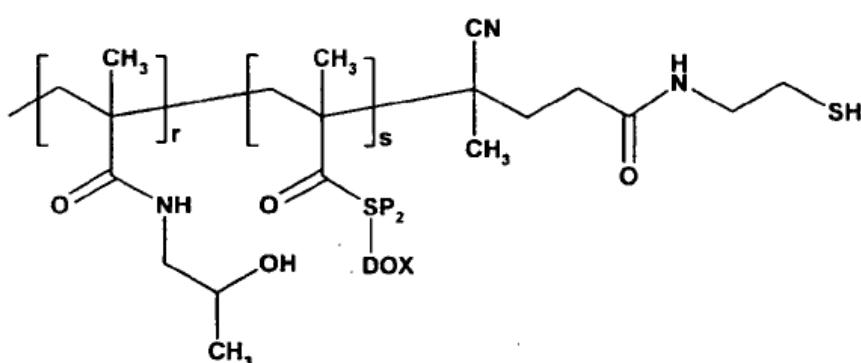


Esquema 8: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP1-NHNH-Boc)-AE-SH (polímero 2b)

- 5 Se prepararon copolímero de HPMA y oligopéptidos metacriloiados con fármaco unido mediante amida, con la cadena principal terminada con grupo tiol mediante la reacción de grupos de extremo de cadena de éster succinimidílico de polímero 1e con PDEA y posterior reducción con DTT (polímero 2c).



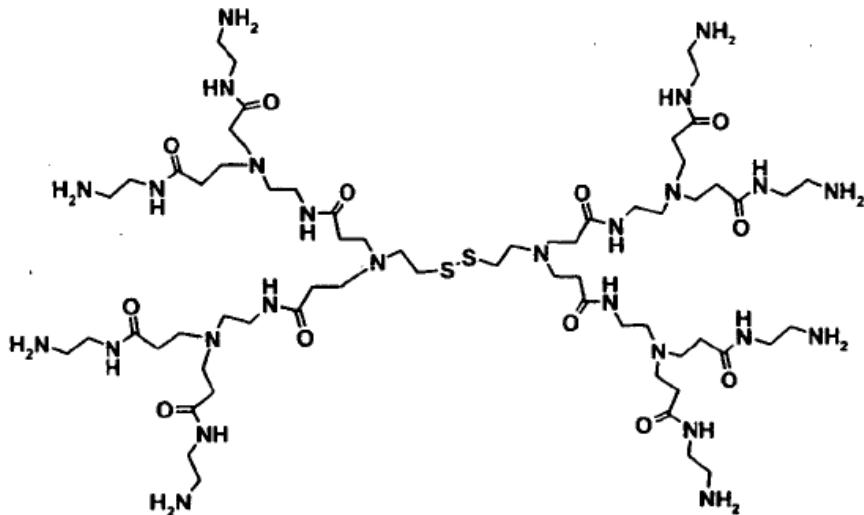
- 10 Esquema 9: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-SPA-AE-SH (polímero 2c)
- 15 Se prepararon copolímero de HPMA y oligopéptidos metacriloiados con fármaco unido mediante amida, con la cadena principal terminada con grupo tiol mediante la reacción de grupos de extremo de cadena carboxilo activados de polímero 1f y polímero 1g con PDEA y posterior reducción con DTT (polímero 2d).



- 20 Esquema 10: Estructura de poli(HPMA-co-MA-SP2-Dox)-AE-SH (polímero 2d)
- Dendrímero

Se usó generación de cero a seis de estructuras dendríticas como partes centrales en conjugados de polímero. Preferiblemente, se usaron dendrimeros de PAMAM con unidades de núcleo de cisteamina, etilendiamina, butano-1,4-diamina, hexano-1,6-diamina o dodecano-1,12-diamina y con grupos amino primarios como grupos de extremo

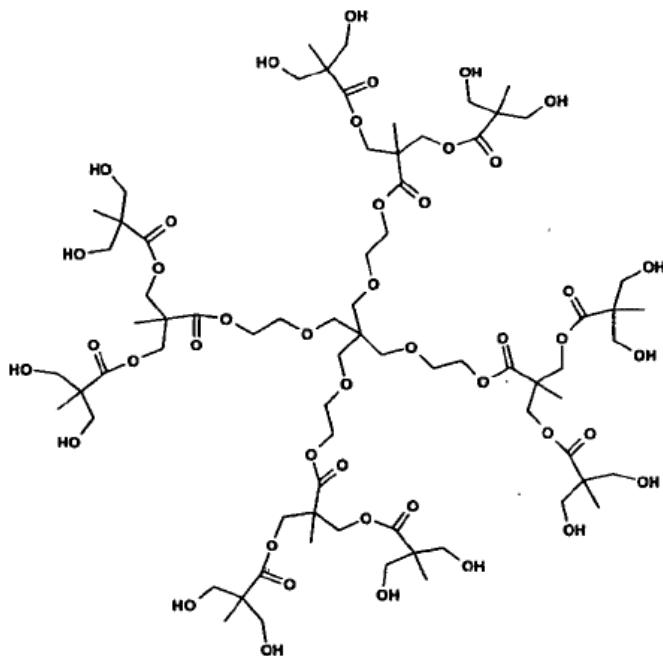
(esquema 11)



5 Esquema 11: Primera generación de dendrímero de PAMAM con la unidad de núcleo de cisteamina

O

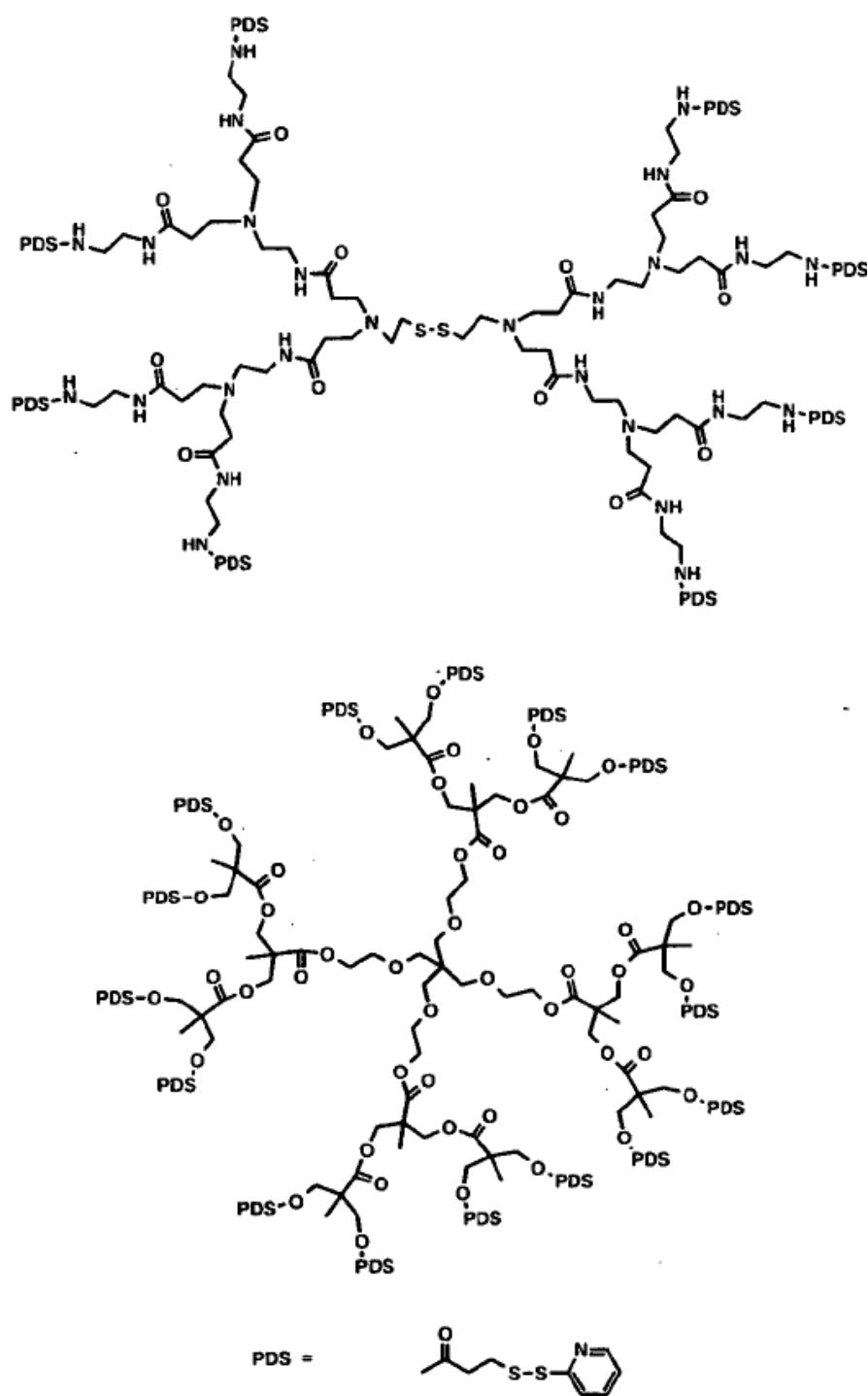
10 un dendrímero a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico (BPA) con grupos de extremo hidroxilo (esquema 12)



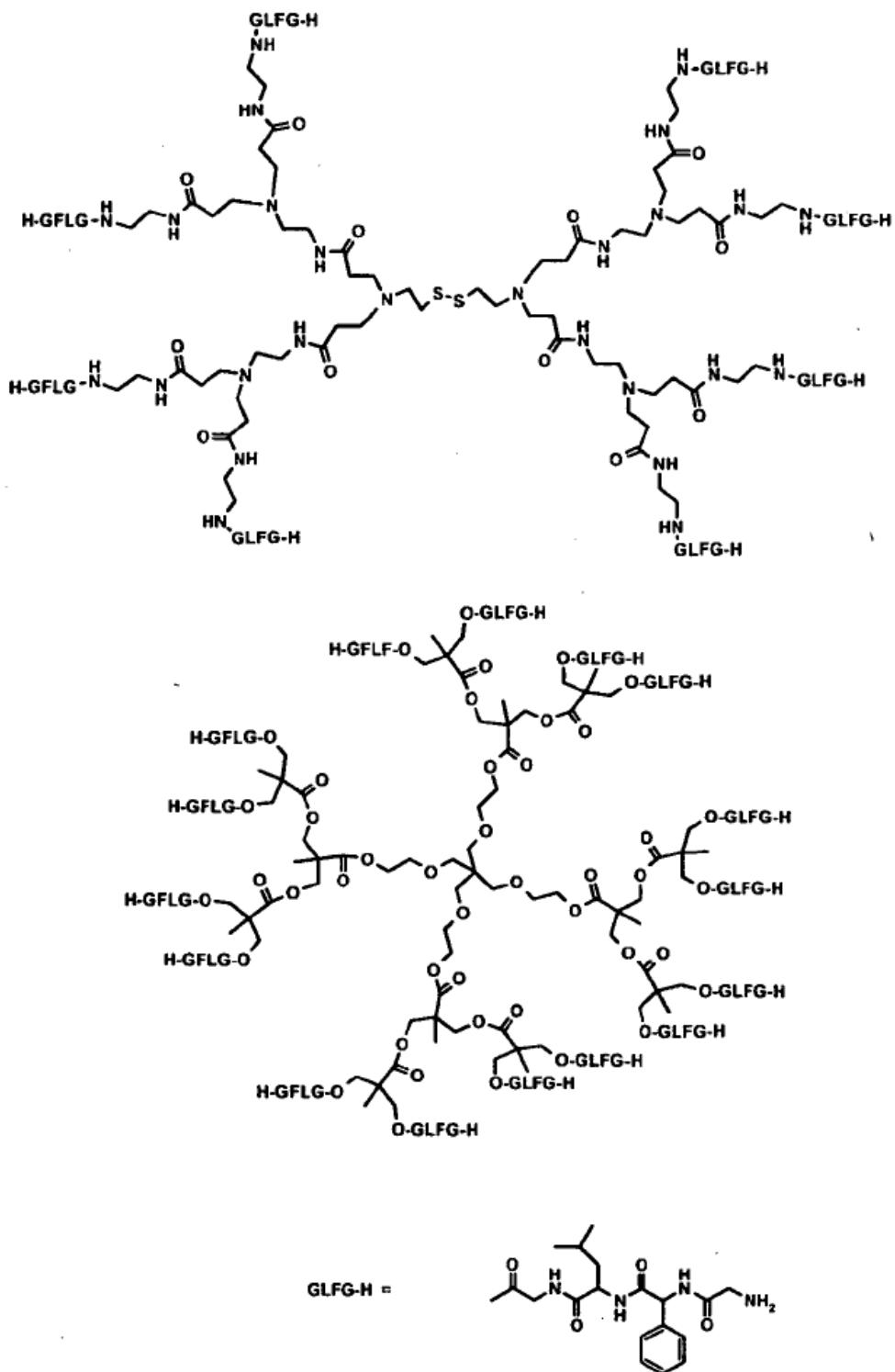
Esquema 12: Primera generación de dendrímero a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico

15 En la síntesis de algunos conjugados y portadores de polímero biodegradables, se transformaron los grupos amino o hidroxilo de dendrímeros de PAMAM o BPA en grupos piridildisulfanilo (PDS) de extremo (esquema 13), antes de la reacción con un polímero semitelequético. En el dendrímero que contiene grupos amino, se modificaron los grupos amino mediante un oligopéptido SP2 escindible con enzimas lisosómicas (esquema 14). Se introdujeron los grupos piridildisulfanilo mediante la reacción de grupos amino con grupos succinimidilo de [3-(2-piridildisulfanil)]propanoato de N-succinimidilo (SPDP) o mediante la reacción de grupos hidroxilo con ácido 3-(2-piridildisulfanil)propiónico usando el método de DCC. Se introdujo el oligopéptido mediante la reacción de grupos amino o hidroxilo del dendrímero con oligopéptido protegido con Fmoc usando el método de DCC.

20



Esquema 13: Dendrímero de PAMAM con grupos de extremo PDS y dendrímero de BPA con grupos de extremo PDS



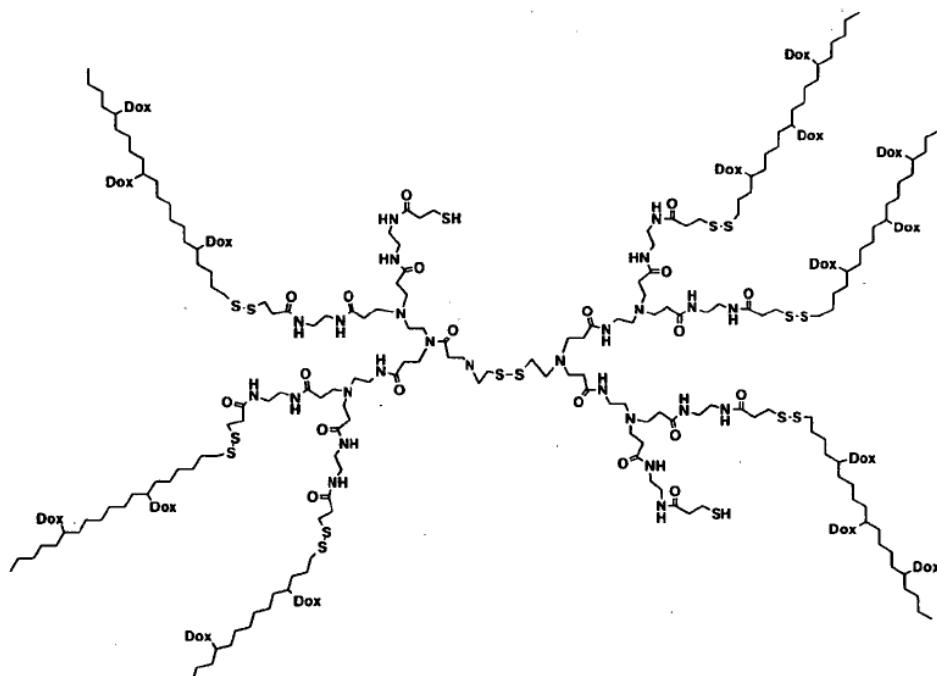
Esquema 14: Dendrímeros de PAMAM y BPA con oligopéptido GFLG unido

- 5 A continuación en el presente documento, el portador de polímero es un polímero de HMW sin fármaco unido, que contiene una estructura dendrítica. El conjugado de polímero es entonces un portador de polímero con fármaco unido. El fármaco, preferiblemente doxorubicina, se une al portador a través de un enlace hidrazona, tras eliminar el grupo protector Boc. La unión de Dox al portador se realiza en metanol en presencia de ácido acético. En el caso doxorubicina unida mediante amida, el conjugado de polímero se prepara mediante la reacción de copolímeros semitelequéticos que llevan Dox con el dendrímero correspondiente.
- 10

Debido a la estructura del conjugado y el mecanismo de degradación de la estructura de polímero, los conjugados de polímero según la invención se dividen en cuatro grupos básicos:

#### Conjugado 1

El conjugado 1 consiste en una estructura dendrítica de PAMAM central a la que se unen cadenas de polímero que llevan fármacos a través de enlaces disulfuro degradables de manera reductora. Los fármacos se unen a las cadenas de polímero con enlaces hidrazone o amida (véase el esquema 15).

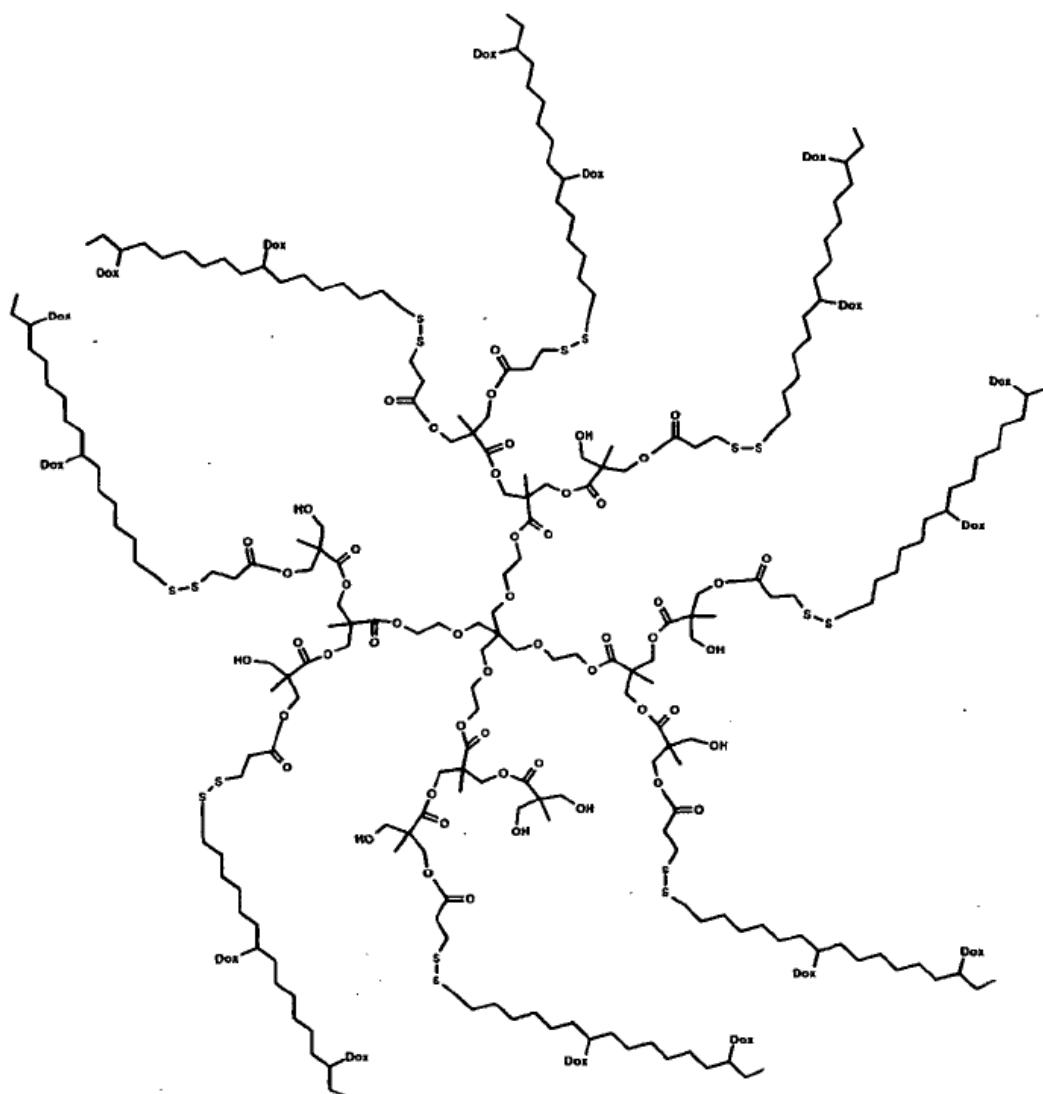


Esquema 15: Conjugado 1 con dendrímero de PAMAM que contiene núcleo de cisteamina (primera generación)

La línea en zigzag indica la cadena de PAMAM.

#### Conjugado 2

El conjugado 2 consiste en una estructura dendrítica de BPA central a la que se unen cadenas de polímero que llevan fármacos a través de enlaces disulfuro degradables de manera reductora. Los fármacos se unen a las cadenas de polímero con enlaces hidrazone o amida (véase el esquema 16).



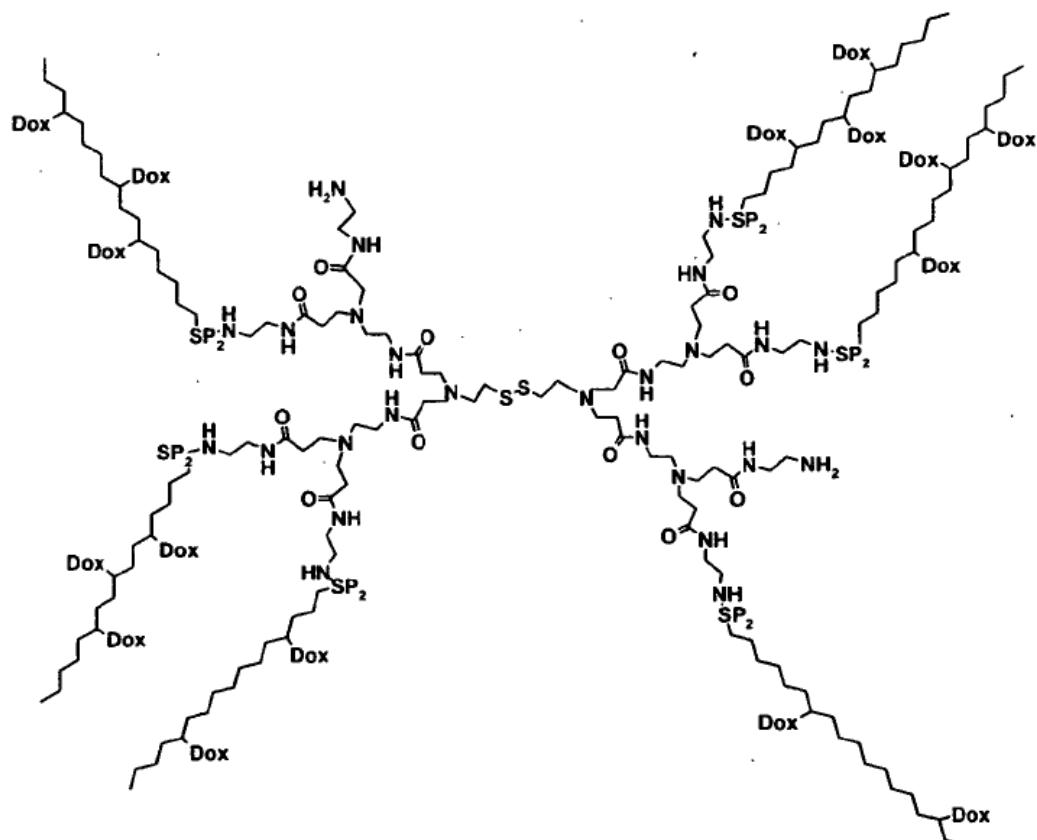
Esquema 16: Conjugado 2 con un dendrímero de BPA (primera generación) (la línea en zigzag indica la cadena de copolímero de HPMA)

5

### Conjugado 3

El conjugado 3 consiste en una estructura dendrítica de PAMAM central a la que se unen cadenas de polímero que llevan fármacos a través de oligopéptido degradable enzimáticamente. Los fármacos se unen a las cadenas de polímero con enlaces hidrazone o amida (véase el esquema 17).

10



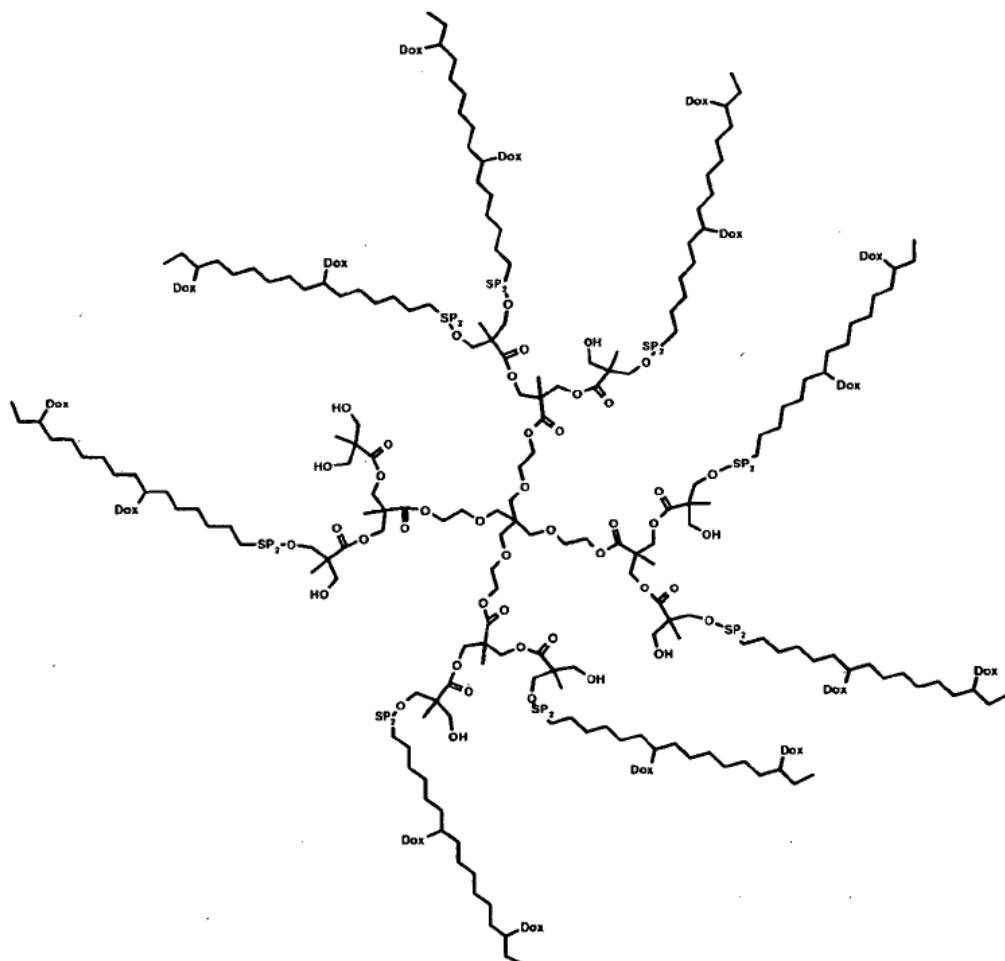
Esquema 17: Conjugado 3 con un dendrímero de PAMAM (primera generación). La línea en zigzag indica la cadena de copolímero de HPMA

5

#### Conjugado 4

El conjugado 4 consiste en una estructura dendrítica de BPA central a la que se unen cadenas de polímero que llevan fármacos a través de oligopéptido degradable enzimáticamente. Los fármacos se unen a las cadenas de polímero con enlaces hidrazona o amida (véase el esquema 18).

10



Esquema 18: Conjugado 4 con un dendrímero de BPA (primera generación). La línea en zigzag indica la cadena de copolímero de HPMA

5

#### Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 muestra la dependencia del tiempo de la Dox liberada a partir de los conjugados de polímero dendrítico 1 y 2, y el conjugado de polímero lineal 3 a pH 5 (Dox se une a través de enlaces hidrazone) incubado en un tampón de pH 5 (que imita el medio intracelular).
- La figura 2 muestra la dependencia del tiempo de la Dox liberada a partir de los conjugados de polímero dendrítico 1 y 2, y el conjugado de polímero lineal 3 a pH 7,4 (Dox se une a través de enlaces hidrazone) incubado en un tampón de pH 7,4 (que imita el torrente sanguíneo).
- La figura 3 muestra la dependencia del tiempo del peso molecular del conjugado de polímero 1 incubado en tampón fosfato que contiene glutatión( $c = 3,10^{-3}$  mol/l).
- La figura 4 muestra la dependencia del tiempo del peso molecular del conjugado de polímero 3 durante la incubación en tampón fosfato que contiene catepsina B ( $c = 5,10^{-7}$  mol/l).
- La figura 5 representa el crecimiento tumoral tras la administración de K-1 HYD con doxorubicina unida mediante hidrazone, K-1 AM con doxorubicina unida mediante enlace amida y conjugados de polímero lineales LIN HYD a LIN AM.
- La figura 6 muestra la supervivencia de ratones con tumor EL4 tras la administración de K-1 HYD con doxorubicina unida mediante enlace hidrazone, K-1 AM con doxorubicina unida mediante enlace amida y conjugados de polímero lineales LIN HYD a LIN AM.
- La figura 7 representa la supervivencia de ratones curados con conjugados de polímero (véanse las figuras 5 y 6) y

en los que volvió a trasplantarse una dosis letal de las células tumorales originales (linfoma de células T de ratón EL 4,  $1 \times 10^5$  células).

**Ejemplos para llevar a cabo la invención**

- 5 Ejemplos de síntesis y propiedades de los conjugados
- Ejemplos de síntesis de productos intermedios y conjugados de doxorubicina - polímero
- 10 Ejemplo 1
- Síntesis de precursor de polímero semitelequético (usando agente de transferencia de cadena SPA) poli(HPMA-co-MA-AH-NHNHBoc)-SPA-OSu (polímero 1a)
- 15 Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-OSu mediante copolimerización por radicales por precipitación de HPMA y MA-AH-NHNH-Boc en acetona a 50°C en presencia de iniciador 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) y agente de transferencia de cadena SPA. En algunos casos, los grupos de extremo carboxilo se transformaron en la segunda etapa en éster N-succinimidílico mediante la reacción con N-hidroxisuccinimida/DCC tal como se describió anteriormente (Etrych, patente CZ 298 945 B6).
- 20 Ejemplo 2
- Síntesis de precursor de polímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT
- 25 (Polímero 1b)
- Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT mediante copolimerización por radicales en disolución de HPMA y MA-AH-NHNH-Boc en DMSO a 60°C iniciada con ABIA-TT (Etrych, patente CZ 298 945 B6).
- 30 Ejemplo 3
- Síntesis de precursor de polímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-OSu
- 35 (Polímero 1c)
- Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-OSu mediante copolimerización por radicales en disolución de HPMA y MA-AH-NHNH-Boc en etanol a 50°C en presencia de iniciador ABIA y posterior activación de los grupos de extremo de cadena carboxilo mediante transformación en éster N-succinimidílico (Etrych, patente CZ 298 945 B6).
- 40 Ejemplo 4
- Síntesis de precursor de polímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLG-OSu
- 45 (Polímero 1d)
- Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLG-OSu mediante una síntesis de dos etapas. En la primera etapa, se hizo reaccionar éster N-succinimidílico de copolímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-OSu con grupo amino de oligopeptido GFLG. En algunos casos, los grupos de extremo carboxilo del copolímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLG-COOH preparado se transformaron, en la segunda etapa, en éster N-succinimidílico mediante la reacción con N-hidroxisuccinimida/DCC tal como se describió anteriormente (Etrych, patente CZ 298 945 B6).
- 55 Ejemplo 5
- Síntesis de precursor de polímero semitelequético (incluyendo transferencia de cadena con SPA) poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPAOSu
- 60 (Polímero 1e)
- Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-OSu mediante copolimerización por radicales por precipitación de HPMA y MA-GFLG-Dox en acetona a 50°C en presencia de iniciador AIBN y agente de transferencia de cadena SPA. En la segunda etapa, los grupos de extremo de cadena carboxilo se transformaron en grupos éster N-succinimidílico mediante la reacción con N-hidroxisuccinimida/DCC. [Ulbrich 2000].

## Ejemplo 6

## Síntesis de precursor de polímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-TT

5 (Polímero 1f)

Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-TT mediante copolimerización por radicales en disolución de HPMA y MA-GFLG-Dox en DMSO a 60°C, iniciada con ABIA-TT.

- 10 Se disolvieron 220 mg (1,54 mmol) de HPMA, 25 mg (0,025 mmol) de MA-GFLG-Dox en 1,7 ml de DMSO y se transfirió la disolución a una ampolla de polimerización, en la que había 84 mg (0,170 mmol) de ABIA-TT (el 4% en peso). Se burbujeó nitrógeno a través de la disolución en una ampolla durante 15 min; se selló la ampolla y se colocó en un termostato a 60°C. El iniciador se disolvió tras 3 min a 60°C. Tras 6 h, se precipitó la mezcla de reacción en 50 ml de acetona-dietil éter 2:1. Se disolvió el copolímero en 3 ml de metanol y se precipitó de nuevo en 50 ml del mismo disolvente mixto. Se separó por filtración el copolímero precipitado y se secó hasta peso constante.

## Ejemplo 7

## Síntesis de precursor de polímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-GFLG-OSu (polímero 1h)

- 20 Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-GFLG-OSu mediante una síntesis de dos etapas descrita en la preparación de poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLG-OSu (ejemplo 4). En la primera etapa, se hizo reaccionar éster N-succinimidílico de copolímero poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-OSu con el grupo amino de oligopéptido GFLG. El extremo carboxilo de copolímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-OSu con grupo amino de oligopéptido GFLG. En la segunda etapa, se transformaron los grupos de extremo de cadena carboxilo del copolímero poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-GFLG-COOH preparado en éster N-succinimidílico mediante la reacción con N-hidroxisuccinimida/DCC.

## Ejemplo 8

## Síntesis de precursor de polímero semitelequético - poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-AE-SH (polímero 2a)

- 30 Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-AE-SH mediante reacción de polímero análogo de copolímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-OSu con un reactivo bifuncional, 2-(2-piridildisulfanil)etilamina (PDEA), en DMSO y posterior reducción con ditiotreitol (DTT) en tampón fosfato 0,5 M (NaCl 0,1 M, pH 7,4). Se disolvieron 8 mg de PDEA.HCl (0,036 mmol) en 0,5 ml de DMSO y se añadieron 6 µl de etil(diisopropil)amina (0,036 mmol) con agitación intensa. Tras 5 min, se añadió una disolución de 300 mg de poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPAOSu (grupos TT, 0,026 mmol) en 4 ml de DMSO con agitación intensa a temperatura ambiente. Tras 2 h, se diluyó la mezcla de reacción hasta 15 ml con metanol y se purificó el copolímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna llena con Sephadex LH-20 (metanol, detección RI). Se concentró la fracción de polímero sobre un evaporador de vacío rotatorio hasta 6 ml y se aisló el copolímero mediante precipitación en 80 ml de acetona - dietil éter 3:1. En la siguiente etapa, se disolvieron 300 mg del polímero con grupos PDS (0,024 mmol) en 5 ml de tampón fosfato y se añadió una disolución de 18,5 mg de DTT en 0,4 ml de agua destilada. Tras 1 h, se purificó el polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante filtración en gel en disolución acuosa sobre una columna llena con Sephadex G-25. Se aisló el polímero mediante liofilización y se almacenó bajo argón a -18°C.

## Ejemplo 9

## 50 Síntesis de precursor de polímero semitelequético - poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-AE-SH (polímero 2b)

- 55 Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-AE-SH mediante una reacción de polímero análogo de copolímero poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-OSu o poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-TT con reactivo bifuncional PDEA en DMSO y mediante la posterior reducción con DTT en tampón fosfato 0,5 M (NaCl 0,1 M, pH 7,4) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 8.

## Ejemplo 10

## 60 Síntesis de precursor de polímero semitelequético - poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-AE-SH (polímero 2c)

- 65 Se preparó el copolímero semitelequético poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-AE-SPK-SH mediante una reacción de polímero análogo de copolímero poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-OSu con reactivo bifuncional PDEA en DMSO y mediante la posterior reducción con DTT en tampón fosfato 0,5 M (NaCl 0,1 M, pH 7,4) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 8.

## Ejemplo 11

Síntesis de precursor de polímero semitelequético - polí(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-AE-SH (polímero 2d)

Se preparó el copolímero semitelequético polí(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-AE-SH mediante una reacción de polímero análogo de copolímero polí(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-OSu o polí(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-TT con reactivo bifuncional PDEA en DMSO y mediante la posterior reducción con DTT en tampón fosfato 0,5 M (NaCl 0,1 M, pH 7,4) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 8.

## Ejemplo 12

Síntesis de dendrímero con grupos PDS

Se prepararon dendrímeros de PAMAM o BPA que contenían grupos piridildisulfanilo (dendrímero-PDS) mediante la reacción de grupos amino o hidroxilo de dendrímeros con grupos succinimidilo de [3-(2-piridildisulfanil)]propanoato de N-succinimidilo (SPDP) o grupos carboxilo de ácido 3-(2-piridildisulfanil)propanoico usando el método de DCC.

Se disolvieron 5 mg de dendrímero de PAMAM de segunda generación (grupos amino, 0,026 mmol) en 0,5 ml de metanol y, con agitación constante, se añadió una disolución de 23 mg de SPDP (0,071 mmol) en 0,5 ml de metanol. Tras 2 h, se purificó el dendrímero modificado eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna llena con Sephadex LH-20 en metanol (detección RI). Se concentraron las fracciones que contenían el dendrímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 1 ml y se aisló el dendrímero mediante liofilización a partir de una mezcla de metanol-agua 1:3.

## Ejemplo 13

Síntesis de un dendrímero con oligopéptido unido

Se prepararon dendrímeros de PAMAM o BPA con oligopéptidos unidos (dendrímero-SP<sub>2</sub>) que contenían grupos de extremo amino mediante la reacción de grupos amino o hidroxilo de dendrímeros con grupos carboxilo de oligopéptidos protegidos con N-Fmoc en presencia de reactivo de condensación DCC.

Se disolvieron 40 mg de oligopéptido protegido con N-Fmoc GFLG (0,065 mmol) en 0,9 ml de DMF y, tras enfriar hasta -18°C, se añadió una disolución de 13,5 mg de DCC (0,065 mmol) en 0,1 ml de DMF. Tras 30 min, se añadió una disolución de 10 mg de dendrímero BPA de segunda generación (grupos hidroxilo, 0,052 mmol) en 0,5 ml de DMF a la mezcla de reacción enfriada. Se agitó la mezcla durante 90 min a 4°C y a temperatura ambiente durante otras 2 h. Entonces se diluyó la mezcla de reacción hasta 5 ml con metanol y se purificó el dendrímero modificado eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna llena con Sephadex LH-20 en metanol (detección RI). Se concentraron las fracciones que contenían dendrímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 1 ml y se aisló el dendrímero mediante precipitación en dietil éter. Se obtuvieron los grupos amino libres sobre dendrímero modificado mediante desprotección de grupos amino protegidos con Fmoc en una disolución al 25% de piperidina en DMF.

## Ejemplo 14

Síntesis de conjugados de polímero 1 y 2

Se preparó el conjugado de polímero 1 ó 2 con un fármaco unido por medio de enlace amida al extremo de la secuencia de oligopéptido mediante la reacción de grupos PDS de dendrímero de PAMAM o BPA modificado con grupos tiol de polímeros 2c o 2d.

Se disolvieron 150 mg de polí(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-AE-SH (grupos SH, 0,010 mmol) en 3 ml de tampón fosfato 0,5 M con NaCl 0,1 M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M, pH 7,4) y se añadió la disolución a una disolución con agitación de 6,5 mg de dendrímero-PDS (grupos PDS, 0,013 mmol) en 1 ml de metanol añadido a una disolución con agitación de dendrímero-PDS (grupos PDS, 0,013 mmol) en 1 ml de metanol a la temperatura del laboratorio. Tras 4 h de reacción a temperatura ambiente, se diluyó la disolución hasta 10 ml de metanol y se purificó el conjugado de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre Sephadex LH-20 en metanol. Se concentraron las fracciones de polímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 2 ml y se aisló el copolímero mediante precipitación en 30 ml de acetato de etilo. Se secó el producto hasta peso constante.

Se preparó el conjugado de polímero 1 ó 2 con fármaco unido mediante hidrazona mediante la reacción de los grupos PDS del dendrímero-PDS con grupos SH del polímero 2a o 2b, la posterior desprotección de grupos hidrazida con ácido trifluoroacético (TFA) y la unión de Dox en metanol bajo catálisis con ácido acético.

Se disolvieron 200 mg de polí(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-AE-SH (grupos SH, 0,014 mmol) en 4 ml de

tampón fosfato 0,5 M (NaCl 0,1 M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M, pH 7,4) y se añadió la disolución a temperatura ambiente a una disolución con agitación de 8,5 mg de dendrímero-PDS (0,017 mmol de grupo PDS) en 1,5 ml de metanol. Tras 4 h de reacción a temperatura ambiente, se diluyó la disolución hasta 13 ml con metanol y se purificó el portador de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna de Sephadex LH-20 en metanol. Se concentraron las fracciones de polímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 2 ml y se aisló el copolímero mediante precipitación en 30 ml de acetato de etilo. Se secó el producto hasta peso constante. En la desprotección del portador de polímero protegido con Boc, se disolvieron 190 mg del portador en 5 ml de una mezcla de TFA-triisopropilsilano-agua 95:2,5:25. Tras 15 min, se evaporó repetidamente la mezcla con metanol (exceso de cinco veces) en un evaporador en vacío con bomba de agua hasta que precipitaron cristales pequeños. Se disolvió el producto en agua y se ajustó el pH de su disolución a pH 7-8. Se purificó el portador de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna de Sephadex G-25 en agua destilada (detección RI). Se aisló el polímero de fracciones de polímero mediante liofilización en un dispositivo Lyovac GT-2. Para la unión de Dox, se disolvieron 180 mg de portador de polímero en 2 ml de metanol y se transfirió la disolución a una célula termostatizada en la que había 20 mg de Dox.HCl (0,034 mmol). Se agitó la suspensión no homogénea obtenida en la oscuridad a 25°C y, tras 1 min, se añadieron 100 µl de ácido acético. Durante la reacción, se disolvió sucesivamente la suspensión y, tras 23 h de reacción, se purificó el producto de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular y fármaco libre mediante cromatografía en gel en una columna de Sephadex LH-20 en metanol. Se concentraron las fracciones de polímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 3 ml. Se aisló el conjugado de polímero mediante precipitación en 30 ml de acetato de etilo. Se secó el producto hasta peso constante.

#### Ejemplo 15

##### Síntesis de conjugados de polímero 3 y 4

Se preparó el conjugado de polímero 3 ó 4 que contiene un fármaco unido a través de un grupo amida por medio de un oligopeptido mediante la reacción de dendrímero de PAMAM o BPA modificado con amino-GFLG-NH<sub>2</sub> con grupos TT u OSu del polímero 1e, 1f o 1g, o mediante la reacción de grupos succinimidilo o carboxilo del polímero 1h, poli(HPMA-co-MA-GFLG-Dox)-SPA-GFLGOSu, con grupos amino o hidroxilo del dendrímero.

Se disolvieron 100 mg de polímero 1f (grupos OSu, 0,006 mmol) en 2 ml de DMSO y se añadió la disolución a la temperatura del laboratorio a una disolución con agitación de 1,9 mg de dendrímero (grupos GFLG-NH<sub>2</sub>, 0,009 mmol) en 1 ml de metanol. Tras 2 h de reacción a la temperatura del laboratorio, se diluyó la disolución hasta 8 ml con metanol y se purificó el conjugado de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna de Sephadex LH-20 en metanol. Se concentraron las fracciones de polímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 2 ml y se aisló el conjugado de copolímero mediante precipitación en 30 ml de acetato de etilo. Se secó el producto hasta peso constante.

Se preparó el conjugado de polímero 3 ó 4 con un fármaco unido mediante hidrazona mediante la reacción de grupos amino de dendrímero de PAMAM o BPA modificado-GFLG-NH<sub>2</sub> con grupos TT u OSu de los polímeros 1a, 1b o 1c, o mediante la reacción de grupos succinimidilo o en algunos casos de grupos carboxilo del polímero 1d poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-SPA-GFLGOSu con grupos amino o hidroxilo de un dendrímero, la posterior desprotección de grupos hidrazida con ácido trifluoroacético (TFA) y la unión de Dox en metanol bajo catálisis con ácido acético.

Se disolvieron 120 mg de poli(HPMA-co-MA-AH-NHNH-Boc)-GFLG-OSu (grupos OSu, 0,008 mmol) en 2 ml de DMSO y se añadió la disolución a la temperatura del laboratorio a una disolución con agitación de 2,2 mg de un dendrímero (grupos NH<sub>2</sub> 0,011 mmol) en 1 ml de metanol. Tras 2 h de reacción a la temperatura del laboratorio, se diluyó la disolución hasta 9 ml con metanol y se purificó el portador de polímero eliminando impurezas de bajo peso molecular mediante cromatografía en gel sobre una columna de Sephadex LH-20 en metanol. Se concentraron las fracciones de polímero en un evaporador de vacío rotatorio hasta 2 ml y se aisló el portador de copolímero mediante precipitación en 30 ml de acetato de etilo. Se secó el producto hasta peso constante.

Se llevó a cabo la eliminación de los grupos de protección Boc y la unión de un fármaco con el enlace hidrazona mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 14.

#### Ejemplo 16

##### Liberación de doxorubicina a partir de conjugados de polímero

Se midió la cantidad de doxorubicina liberada a partir de conjugados de polímero tras su incubación en tampón fosfato 0,1 M de pH 5,0 (NaCl 0,05 M) que imita el medio intracelular y en tampón fosfato de pH 7,4 que imita el medio de torrente sanguíneo. Se determinó la Dox liberada en la disolución de incubación mediante HPLC (Shimadzu). En los intervalos de tiempo predeterminados, se extrajeron muestras de 50 µl de la disolución y se analizaron en una columna TSKGel G 3000x1, con velocidad de flujo isocrático de 0,5 ml/min de la fase móvil que consistía en un tampón metanol-acetato (80:20% en vol.) de pH 6,5. Se calculó la cantidad de Dox a partir de las

áreas de los picos de Dox libre y unida (detección UV-VIS a 488 nm). Tras la incubación de disoluciones de conjugado (de concentraciones 5 mg/ml) en un medio fisiológico a 37°C (tampón fosfato, pH 7,4), sólo se libera una pequeña cantidad del fármaco (hasta el 7%/24 h, figura 2). En cambio, la tasa de Dox liberada a partir de conjugados de polímero y por tanto la tasa de activación de un fármaco citotóxico en un medio ligeramente ácido a pH 5,0 es considerable (figura 1). Las tasas de liberación a partir de conjugados de polímero de injerto a pH 7,4 y pH 5 son completamente comparables con las halladas con los conjugados de hidrazona preparados a partir de copolímeros lineales o de injerto [Etrych 2008].

#### Ejemplo 17

Degradación del conjugado de polímero 1 con fármaco unido mediante enlace amida usando glutatión en producto de degradación que pueden eliminarse del organismo

Se estudió la degradación de conjugados de polímero en tampón fosfato 0,1 M (NaCl 0,05 M, pH 6) en presencia de glutatión como agente reductor, es decir, en el medio que imita la célula (citoplasma, endosoma y lisosoma secundario). Se disolvieron conjugados de polímero en tampón fosfato a una concentración de 20 mg/ml. Inmediatamente antes de colocar las disoluciones en un termostato (37°C), se añadió una disolución madre de glutatión de modo que la concentración de glutatión resultante en el medio de incubación era de  $3.10^{-3}$  mol/l. Se extrajeron muestras de alícuotas (200 µl) de disoluciones de incubación en intervalos de tiempo predeterminados, se desalaron en columnas PD-10 y se liofilizaron. Se midieron los pesos moleculares de los productos de degradación en un cromatógrafo de líquidos Shimadzu LC-10AD equipado con un refractómetro (Optilab Rex, Wyatt Technology, EE.UU.) y un detector de dispersión de luz de múltiples ángulos (DAWN EOS, Wyatt Technology, EE.UU.). Se realizó el análisis en una columna Superose™ 6 columna (300 x 10 mm; Amersham Bioscience). Como fase móvil, se usó tampón acetato 0,3 M (pH 6,5, NaN<sub>3</sub> 0,5 g/l) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se calcularon el peso molecular y la polidispersidad del copolímero usando el software Astra (Wyatt Technology, EE.UU.).

El conjugado con puentes disulfuro (conjugado 1) en una disolución que contiene una concentración citoplasmática de glutatión ( $3.10^{-3}$  mol/l) se degrada rápidamente. Tras 24 h de incubación con glutatión, se encontraron productos de degradación del polímero con pesos moleculares por debajo del límite de filtración renal (~ 25000 g/mol) (figura 3).

#### Ejemplo 18

Degradación por catepsina B del conjugado de polímero 3 con fármaco unido mediante enlace hidrazona en productos de degradación, que pueden eliminarse del organismo

Se estudió la degradación de conjugado de polímero en tampón fosfato 0,1 M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 6,0, glutatión 5 mM, EDTA 1 mM) que contenía la enzima lisosómica catepsina B, imitando así el medio de lisosomas secundarios en células tumorales a una concentración de sustrato de 50 mg/ml. Se disolvió el conjugado de polímero en tampón fosfato a una concentración de 10 mg/ml e, inmediatamente antes de colocarse en un termostato (a 37°C), se añadió una disolución madre de catepsina B de modo que su concentración resultante era de  $5.10^{-7}$  M. Se extrajeron muestras (200 µl) de disoluciones de incubación en intervalos de tiempo predeterminados, se desalaron en una columna PD-10 y se liofilizaron. Se midieron los pesos moleculares de los productos de degradación del mismo modo que se describió anteriormente. El conjugado que contenía un espaciador de oligopeptido GFLG (conjugado 3) se degradaba lentamente en una disolución de catepsina B ( $5.10^{-7}$  mol/l). Tras 48 h de incubación con catepsina B, se encontraron productos de degradación del polímero con pesos moleculares por debajo del límite de filtración renal (~ 40000 g/mol) (figura 4).

Para ejemplos de actividad biológica, se definen los siguientes códigos para conjugados de polímero:

K-1 AM - conjugado de polímero dendrítico 1 con fármaco unido mediante enlace amida,

$PM=248000$ ,  $I_h=1,9$ ,  $R_h=15,6$  nm.

K-1 HYD - conjugado de polímero dendrítico 1 con fármaco unido mediante enlace hidrazona,

$PM=199000$ ,  $I_h=2,1$ ,  $R_h=14,2$  nm

LIN AM - conjugado de polímero lineal con fármaco unido mediante enlace amida,

$PM=45000$ ,  $I_h=1,85$ ,  $R_h=5,2$  nm.

LIN HYD - conjugado de polímero lineal con fármaco unido mediante enlace hidrazona,

$PM=36000$ ,  $I_h=1,87$ ,  $R_h=4,5$  nm.

## Ejemplo 19

Ejemplo de actividad biológica *in vitro* (citotoxicidad,  $Cl_{50}$ ) de conjugados dendríticos y de injerto de doxorubicina incubados con células de diversas líneas tumorales (se usó el método de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina)

5

Tabla I – Citotoxicidad, ( $Cl_{50}$ ) de conjugados dendríticos y de injerto de doxorubicina incubados con células de diversas líneas tumorales

Línea tumoral	K-1 HYD	K-1 AM	LIN HYD	LIN AM	Dox
EL4	0,059	11,886	0,147	24,1	0,014
38C13	0,015	2,000	0,023	1,796	0,003
B16	0,012	1,120	0,030	1,562	0,005
BCL 1	0,003	0,700	0,042	0,945	0,001
Raji	0,005	1,272	0,028	2,71	0,001
Jurkat	0,016	3,476	0,599	4,83	0,003
3T3	0,015	2,751	0,0269	2,974	0,005
FaDu	0,038	1,873	0,032	6,22	0,001
4T1	0,053	3,657	0,191	19,43	0,012

10 Para determinar la actividad de inhibición de los polímeros estudiados, se seleccionaron las siguientes líneas tumorales permanentes de origen humano y de ratón: linfoma de células T de ratón EL4, linfoma de células B de ratón 38C13, melanoma de ratón B16, leucemia de células B de ratón BCL1, linfoma de células B humano Raji, leucemia de células T humana Jurkat, fibroblastoma de ratón 3T3, carcinoma espinocelular humano FaDu y carcinoma de mama de ratón 4T1. Se midió la actividad antiproliferación mediante la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina.

15 Se deduce de la tabla 1 que la actividad de inhibición más pronunciada en todas las líneas sometidas a prueba se muestra con ambos conjugados de polímero con doxorubicina unida mediante enlace hidrazona (K-1 HYD y LIN HYD). Los conjugados con doxorubicina unida mediante enlace amida muestran una actividad considerablemente inferior. Los conjugados de polímero de alto peso molecular K-1 HYD y K-1 AM muestran una actividad antiproliferación ligeramente superior que los conjugados lineales con el fármaco unido del mismo modo. Las diferencias no son significativas y puede afirmarse que los conjugados de polímero de alto peso molecular muestran aproximadamente la misma actividad antiproliferación que sus análogos lineales con peso molecular inferior.

## Ejemplo 20

25 Ejemplo de actividad biológica *in vivo* de conjugados de polímero dendrítico - doxorubicina en ratones endogámicos C57BL/6 con linfoma de células T EL4 trasplantado por vía subcutánea

30 Para experimentos *in vivo*, se usaron ratones endogámicos C57BL/6 con linfoma de células T EL4 trasplantado por vía subcutánea. Las dosis fueron de  $1 \times 15$  mg de Dox equivalente/kg y  $10$  mg de Dox equivalente/kg, administrada por vía intravenosa (i.v.). Como control activo, se usó un grupo de ratones que llevaba tumor EL4, que se trataron con doxorubicina sólo ( $2 \times 5$  mg/kg por vía i.v. en los días 8 y 15). El control básico fueron ratones no tratados con tumor EL4. Se muestra en la figura 5 el crecimiento tumoral tras administrar K-1 HYD con doxorubicina unida mediante hidrazona, K-1 AM con doxorubicina unida mediante amida y conjugados de polímero lineal LIN HYD y LIN AM.

35 Resulta evidente a partir de las figuras 5 y 6 que ambas muestras de conjugados de polímero de HMW dendrítico (K-1 HYD y K-1 AM) en una dosis de  $15$  mg de Dox equivalente/kg son altamente eficaces. Una única dosis del fármaco administrada en el periodo de crecimiento tumoral agresivo puede curar al 100% de los ratones con el tumor experimental EL4. La eficacia de conjugados de polímero de HMW es significativamente superior que la de conjugados lineales que llevan el fármaco unido de un modo similar. Con estos conjugados lineales, se curaron el 37% (LIN HYD) o el 25% (LIN AM) de los ratones con tumores experimentales. A una dosis de  $10$  mg de Dox equivalente/kg, se encontró que K-1 HYD con doxorubicina unida mediante enlace hidrazona es siempre altamente activo, ya que una única dosis administrada en el periodo de crecimiento tumoral agresivo condujo de nuevo a curación del 100% de los ratones. El conjugado de polímero K-1 AM con doxorubicina unida mediante enlace amida es menos activo, pero todavía una única dosis baja cura a más del 60% de los ratones con tumor experimental.

40 La figura 7 muestra la supervivencia de ratones curados con conjugados de polímero (véanse las figuras 5 y 6) y aquellos en los que volvió a trasplantarse una dosis letal del tumor original ( $1 \times 10^5$  de linfoma de células T de ratón EL4). Los ratones no se trataron. Resulta evidente a partir de los resultados facilitados en la figura 7 que en ratones tratados con conjugados de polímero se desarrolló resistencia antitumoral durante el tratamiento. Esto se produjo con un 30-40% de ratones curados con K-1 HYD que contenía doxorubicina unida mediante hidrazona (dosis de  $10$  y  $15$  mg de Dox equivalente/kg) y K-1 AM que contenía doxorubicina unida mediante enlace amida ( $10$  mg de Dox equivalente/kg). Este resultado significa que los fármacos con polímero recién preparados según la invención muestran dos efectos: un efecto citostático, que destruye directamente la gran mayoría de células tumorales y un

efecto de inmunomodulación, que estimula al sistema inmunitario durante el tratamiento e induce resistencia antitumoral. Los resultados obtenidos tras volver a trasplantar una dosis letal de células tumorales en los animales tratados anteriormente son pruebas experimentales del hecho de que la terapia con conjugados de polímero según la invención conduce no sólo a eliminación del tumor, sino que también protege a los animales curados frente a 5 evolución secundaria/metastásica del cáncer o su recidiva.

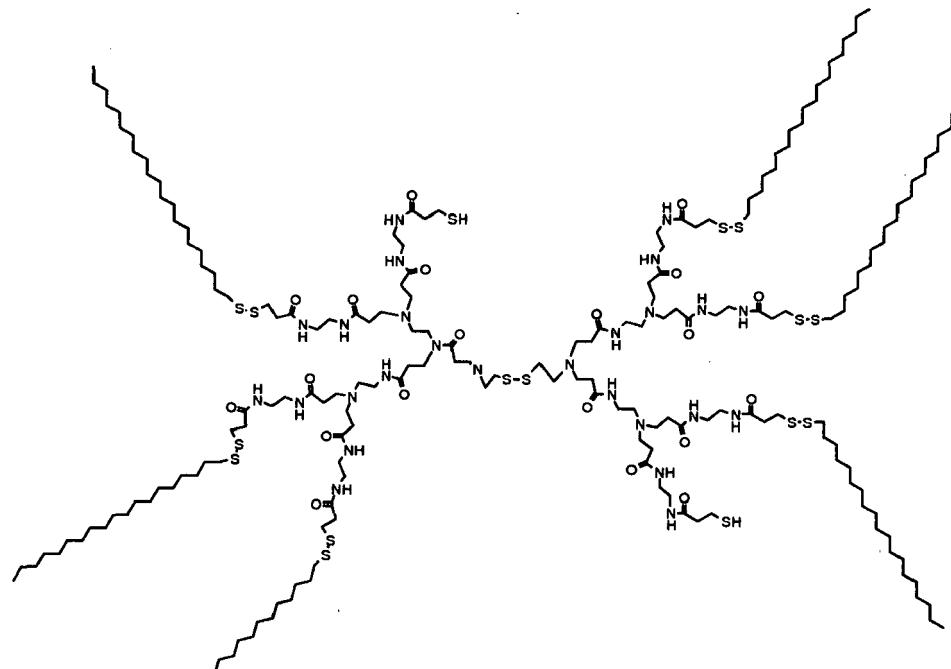
### Bibliografía

- 10 Bae, Y. S.; Fukushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K. pH responsive drug-loaded polymeric micelles: Intracellular drug release correlated with in vitro cytotoxicity on human small cell lung cancer SBC-3. Winter Symposium and 11th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems. Salt Lake City, Utah, EE.UU. 2003. Salt Lake City, Utah, EE.UU.
- 15 Bai S., Ahsan F., Synthesis and Evaluation of Pegylated Dendrimeric Nanocarrier for Pulmonary Delivery of Low Molecular Weight Heparin, PHARMACEUTICAL RESEARCH Pharm. Res. 26,539-548 (2009).
- 20 Bronich, T. K.; Nehls, A.; Eisenberg, A.; Kabanov, V. A.; Kabanov, A. V. Colloids Surf. B 16, 243-251 (1999).
- 25 Chan, W. C.; White, P. D., Eds., "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", Oxford University Press, Oxford 2000.
- Duncan, R., Lloyd, J.B., J. Kopeček, P. Rejmanová, J. Strohalm, K. Ulbrich, B. Řihová, V. Chytrý: Synthetic Polymeric Drugs (1985). Patente CZ 0095/85, Australia 589587, Canadá 130053, Dinamarca 164485, Europa 0187547, US 5.037.883, Japón 000137/86.
- 30 Etrych T., Chytíl P., Ulbrich K., Řihová B, Polymerní léčivo a zpusob jeho výroby (Grafted Macromolecular conjugates of doxorubicin with anticancer activity and method of their preparation), patente CZ 298 945 B6.
- Etrych T., Chytíl P., Mrkvan T., Širová M., Řihová B., Ulbrich K., Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting, J. Controlled Release 132, 184-192 (2008).
- 35 Etrych T., Jelinková M., Řihová B., Ulbrich K., New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties, J. Controlled Release 73, 89-102 (2001).
- Chytíl P., Etrych T., Hrubý M., Ulbrich K., Řihová B., Micelární nosiče doxorubicinu s protinádorovou aktivitou, 40 solicitud de patente CZ 2006-207.
- Gajbhiye V., Kumar P., Tekade R., Jain N., PEGylated PPI dendritic architectures for sustained delivery of H-2 receptor antagonist, Eur. J. Med Chem. 44, 1155-1166 (2009).
- Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Adv. Drug Delivery Rev. 47, 113-131 (2001).
- Kojima C., Haba Y., Fukui T., Kono K., Takagishi T., Design of biocompatible dendrimers with environment sensitivity. Macromolecules 36/7, 2183-2186 (2003).
- 45 Kopeček, J., Kopečková, P., Minko, T., Lu, Z.R., Peterson, C.M.; "Water soluble polymers in tumor targeted delivery". J. Controlled Release 74, 165-173 (2001).
- F. Kratz, U. Beyer, M.T. Schutte, Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16, 245-288 (1999).
- 50 Lele, B., Leroux, J.: Amphiphilic diblock, triblock and star-block copolymers and their pharmaceutical compositions, patente estadounidense 7.018.655.
- Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, y K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Controlled Release 65:271-284 (2000).
- 55 Li, Ch., Vega, J., Wallace, S., Tansey, W., Chamsangavej, Ch.: DENDRITIC POLY (AMINO ACID) CARRIERS AND METHODS OF USE, patente WO 03055935.
- T. Mrkvan, M. Širová, T. Etrych, P. Chytíl, J. Strohalm, D. Plocová, K. Ulbrich, B. Řihová, Chemotherapy based on HPMA copolymer conjugates with pH-controlled release of doxorubicin triggers anti-tumor immunity, J. Controlled Release 110, 119-129 (2005).
- 60 Y. Noguchi, J. Wu, R. Duncan, J. Strohalm, K. Ulbrich, T. Akaike, H. Maeda, Jpn. J. Cancer Res. 89, 307-314 (1998).

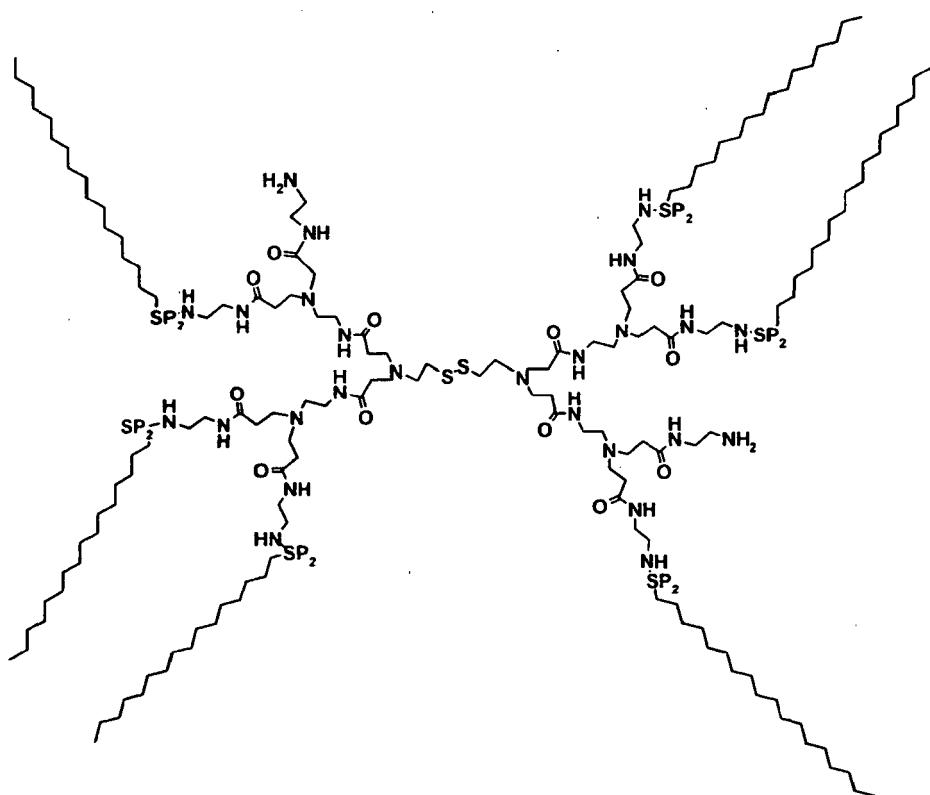
- P. Rejmanová, J. Labský, J. Kopeček, Aminolyses of Monomeric and Polymeric 4-nitrophenyl Esters of N-Methacrylamino Acids, *Makromol. Chem.* 178, 2159 -2168 (1977).
- 5 F. Rypáček, J. Drobnič, V. Chmelař, J. Kálal, The renal excretion and retention of ??macromolecules – the chemical structure effect, *Pflug. Arch. Eur. J. Pgy.* 392, 211-217 (1982).
- B. Řihová, M. Jelinková, J. Strohalm, V. Šubr, D. Plocová, O. Hovorka, M. Novák, D. Plundrová, Y. Germano, K. Ulbrich, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules II. Anti-cancer Activity of antibody or (Fab')2-targeted Conjugates and Combined Therapy with Immunomodulators. *J. Controlled Release*. 64, 10 241-261 (2000).
- L.W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, *Eur. J. Cancer A* 31, 766 - 770 (1995).
- 15 V. Šubr, K.Ulbrich, B. Řihová, Reactive polymers and copolymers based on N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, a method of their preparation and their use for synthesis of polymer drugs, for modification of biologically active proteins and for gene transport systems, solicitud de patente CZ PV 2003-1950.
- 20 V. Šubr, Č. Koňká, R. Laga, K.Ulbrich, Coating of DNA/poly(L-lysine) complexes by covalent attachment of poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide], *Biomacromolecules* 7, 122-130 (2006).
- K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelinková, B. Řihová, Polymeric Drugs Based on Conjugates of Synthetic and Natural Macromolecules I. Synthesis and Physico-chemical Characterisation. *J. Controlled Release* 64, 25 63-79 (2000).
- K. Ulbrich, T. Etrych, B. Rihova, M. Jelinkova, M. Kovar, pH-sensitive polymeric conjugates of an anthracycline cancerostatic drug for targeted therapy, solicitud de patente WO 03/053473.
- 30 K. Ulbrich, T. Etrych, P. Chytil, M. Jelinková, B. Řihová, Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with pH-Controlled Activation, *J. Drug Targeting* 12, 477-489 (2004)(A).
- K. Ulbrich, V. Šubr, Polymeric Anticancer Drugs with pH-Controlled Activation, *Adv. Drug Delivery Rev.* 56/7, 1025-1052 (2004) (B).
- 35 K. Ulbrich, V. Šubr, Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers, *Adv. Drug Delivery Rev.* 62/2, 150-166 (2009).
- D. Wang, P. Kopeckova, T. Minko, V. Nanayakkara, J. Kopecek, Synthesis of Star-Like N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers - Potential Drug Carriers, *Biomacromolecules* 1, 313-319 (2000).

## REIVINDICACIONES

1. Portador de fármaco de polímero de alto peso molecular dendrítico caracterizado porque consiste en una parte dendrítica central de generación cero a sexta de dendrímero seleccionado del grupo que consiste en unidades de amidoamina- y ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico, cuyos grupos de extremo amino o hidroxilo están injertados con copolímeros semitelequélidos de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), que tienen el peso molecular no mayor de 50000 g/mol, a través de enlaces amida o éster y espaciadores biodegradables.
- 5
2. Portador de fármaco de polímero según la reivindicación 1, caracterizado porque consiste en un dendrímero de amidoamina central, cuyos grupos amino están injertados con un copolímero de HPMA semitelequélico unido al dendrímero con los extremos de cadenas de polímero por medio de enlace amida y un espaciador biodegradable formado por enlace disulfuro, tal como se muestra en la estructura I o un espaciador biodegradable formado por una secuencia de oligopéptido SP<sub>2</sub> tal como se muestra en la estructura II
- 10

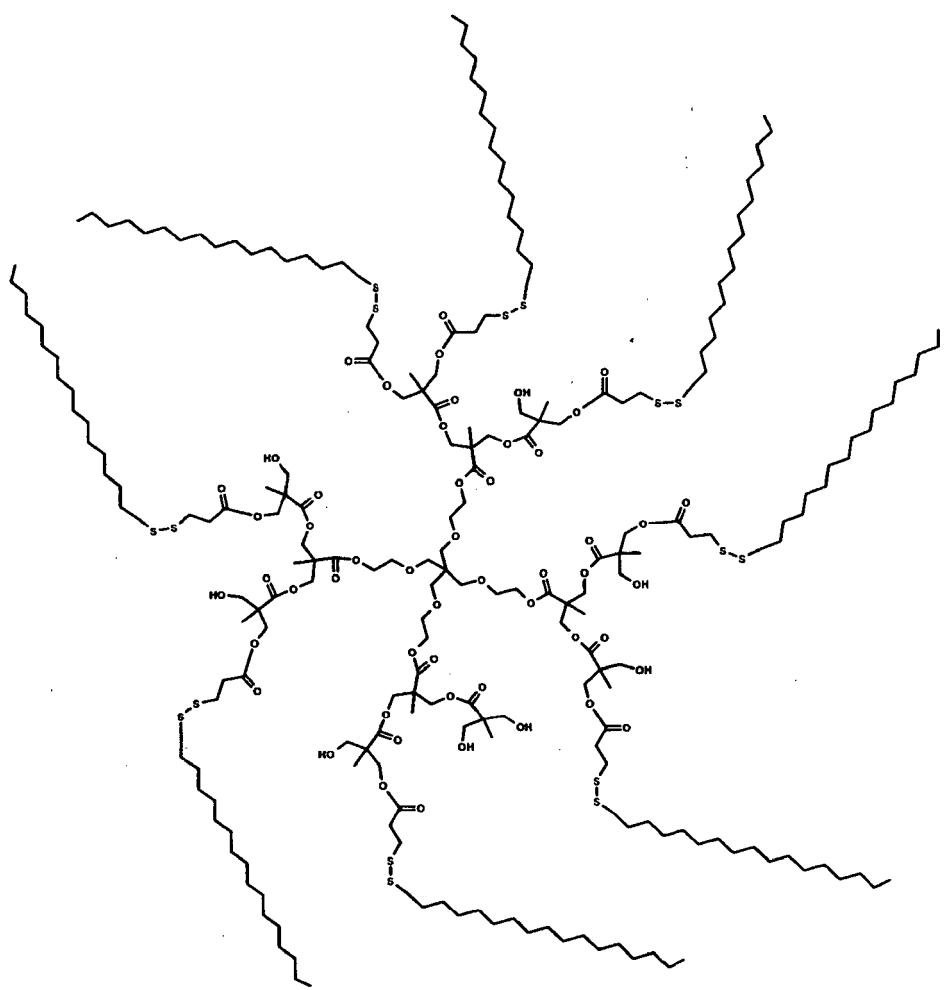


I

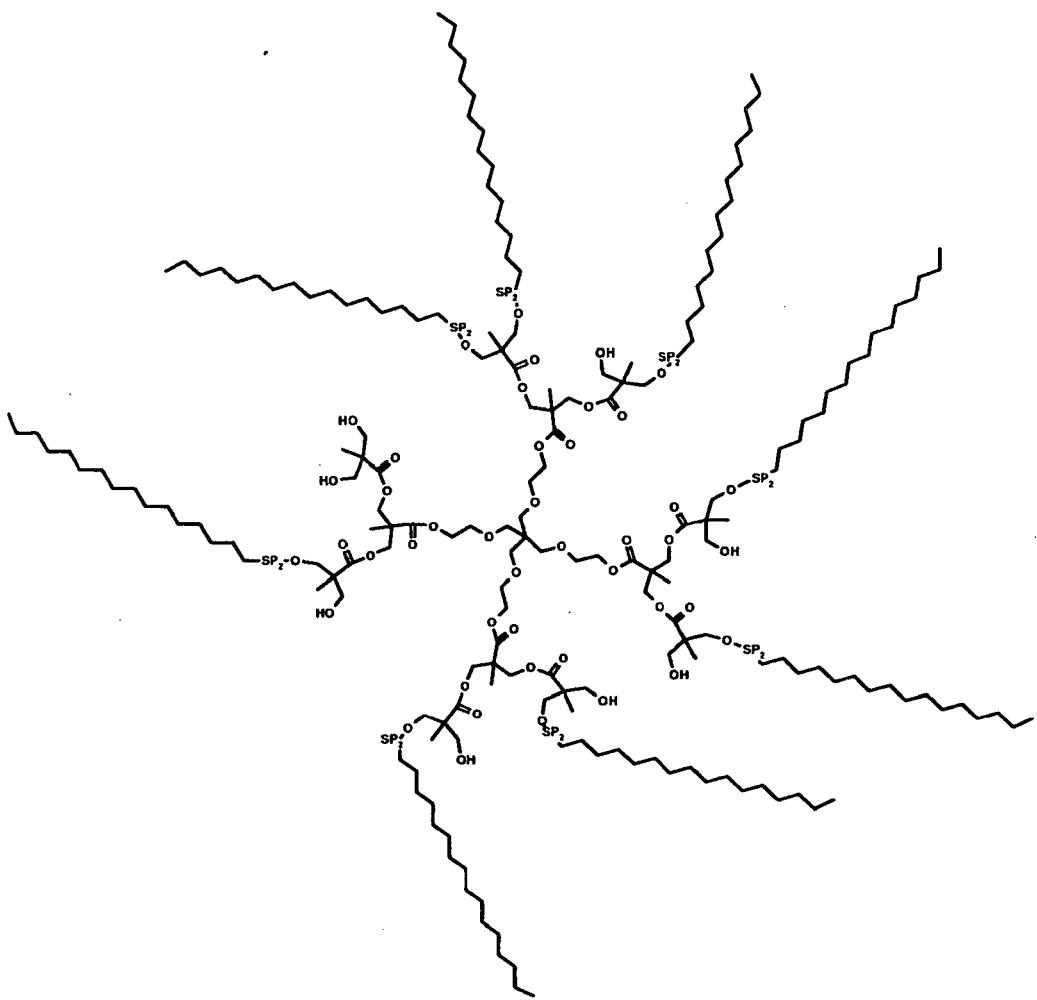


II.

3. Portador de polímero según la reivindicación 1, caracterizado porque consiste en un dendrímero central a base de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico, cuyos grupos hidroxilo están injertados con cadenas de copolímero de HPMA semitelequético unidas a su vez al dendrímero mediante el enlace éster del extremo de la cadena y un espaciador biodegradable que contiene enlace disulfuro tal como se muestra en la estructura III o por medio de la secuencia de oligopéptido SP<sub>2</sub> tal como se muestra en la estructura IV
- 5



III



## IV.

4. Portador de polímero según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque su parte central está formada por un dendrímero de amidoamina de generación cero a sexta, que contiene 4 - 256 grupos de extremo seleccionados del grupo que consiste en grupos amino, piridildisulfanilo y carboxilo, estando formada la unidad de núcleo preferiblemente por cisteamina, etilendiamina, butano-1,4-diamina, hexano-1,6-diamina o dodecano-1,12-diamina.
5. Portador de polímero según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado porque su parte central está formada por un dendrímero de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico de generación cero a sexta, que contiene 8 - 256 grupos de extremo seleccionados del grupo que comprende grupo hidroxilo, piridildisulfanilo y carboxilo.
10. Portador de polímero según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se forman 2 - 28 injertos mediante copolímero de HPMA que contiene el 0,5 - 8% en moles de unidades de monómero de hidrazida metacriloilada de aminoacilo SP<sub>1</sub>, en el que el aminoacilo se selecciona preferiblemente del grupo de glicilo, β-alanilo, 6-aminohexanoilo (AH), 4-aminobenzoilo y/o un acilo combinado derivado de los oligopéptidos GlyGly, GlyPheGly, GlyleuGly, GlyleuPheGly y GlyPheLeuGly.
15. Portador de polímero según las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque los injertos de polímero están unidos a la poli(amidoamina) o al ácido 2,2-bis(hidroximetil)propanoico dendrítico central mediante un espaciador biodegradable que contiene un grupo disulfuro o un oligopéptido biodegradable SP<sub>2</sub>.
20. Portador de polímero según la reivindicación 7, caracterizado porque el oligopéptido SP<sub>2</sub> se selecciona

preferiblemente del grupo de oligopéptidos que incluye GlyleuGly, GlyPheGly, GlyPheLeuGly y GlyleuPheGly.

- 5 9. Conjugado de polímero caracterizado porque consiste en un portador de polímero según las reivindicaciones 1 a 8 y un fármaco unido covalentemente, preferiblemente un agente cancerostático.
10. 10. Conjugado de polímero según la reivindicación 9, caracterizado porque consiste en un portador de polímero según las reivindicaciones 1 a 8 y un agente cancerostático, preferiblemente doxorubicina.
- 10 11. Conjugado de polímero según la reivindicación 10, caracterizado porque la doxorubicina está unida al portador mediante un enlace de hidrazona escindible hidrolíticamente.
- 15 12. Conjugado de polímero según la reivindicación 10, caracterizado porque consiste en un portador de polímero según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 y un fármaco unido mediante enlace amida, en el que se forman 2 - 28 injertos de polímero mediante un copolímero de HPMA que contiene el 0,5 - 8% en moles de unidades de monómero de oligopéptido metacriloilado SP<sub>2</sub> con doxorubicina unida al extremo del oligopéptido a través de un enlace amida, en el que el oligopéptido se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en los oligopéptidos GlyPheGly, GlyleuGly, GlyleuPheGly y GlyPheLeuGly.
- 20 13. Conjugado de polímero según las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque el peso molecular de tal sistema dendrítico oscila preferiblemente entre 40000 y 1400000 g/mol y el contenido en doxorubicina, tanto en cadenas de polímero v como en el conjugado dendrítico resultante oscila entre el 1 y el 25% en peso (el 0,3 - 8% en moles en relación con el polímero).
- 25 14. Composición farmacéutica que contiene como componente activo una sustancia según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para su uso en el tratamiento de tumores.
15. 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de tumores sólidos.
- 30 16. 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de algunos tipos de linfomas y leucemias.

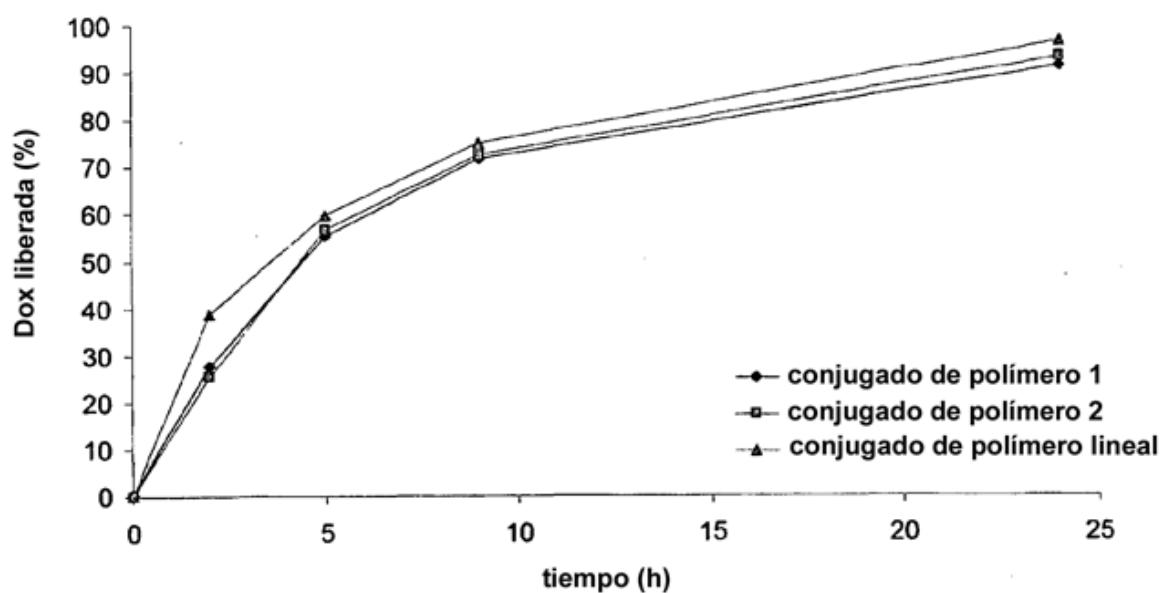


Figura 1

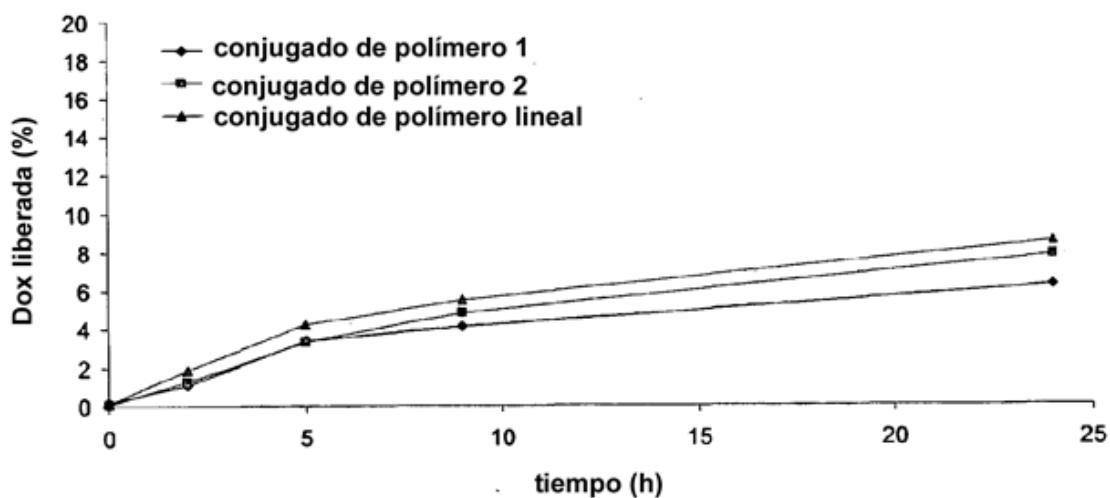


Figura 2

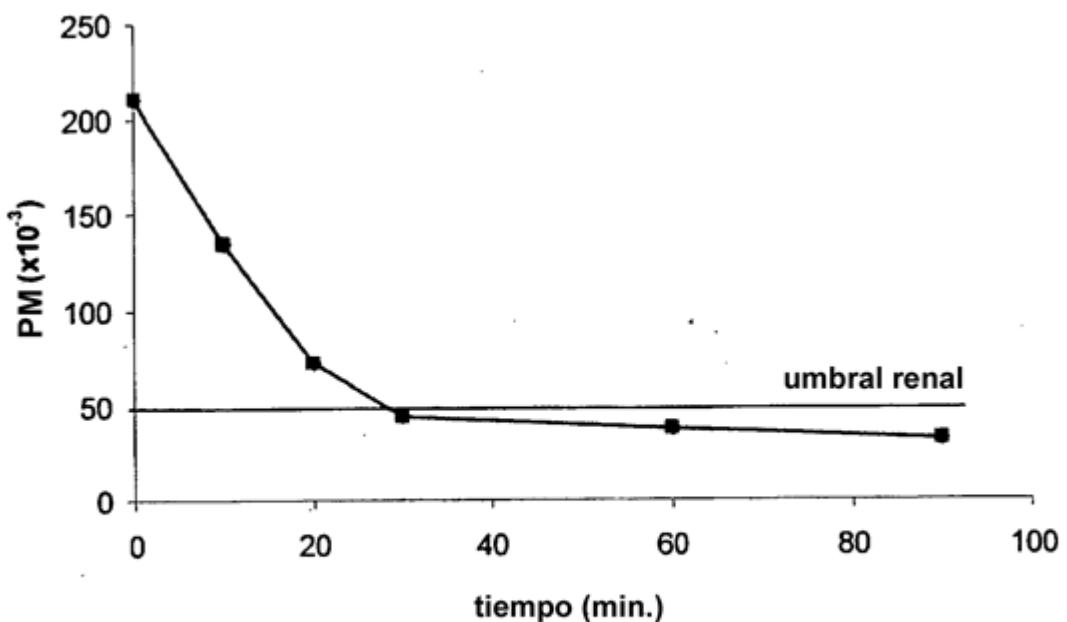


Figura 3

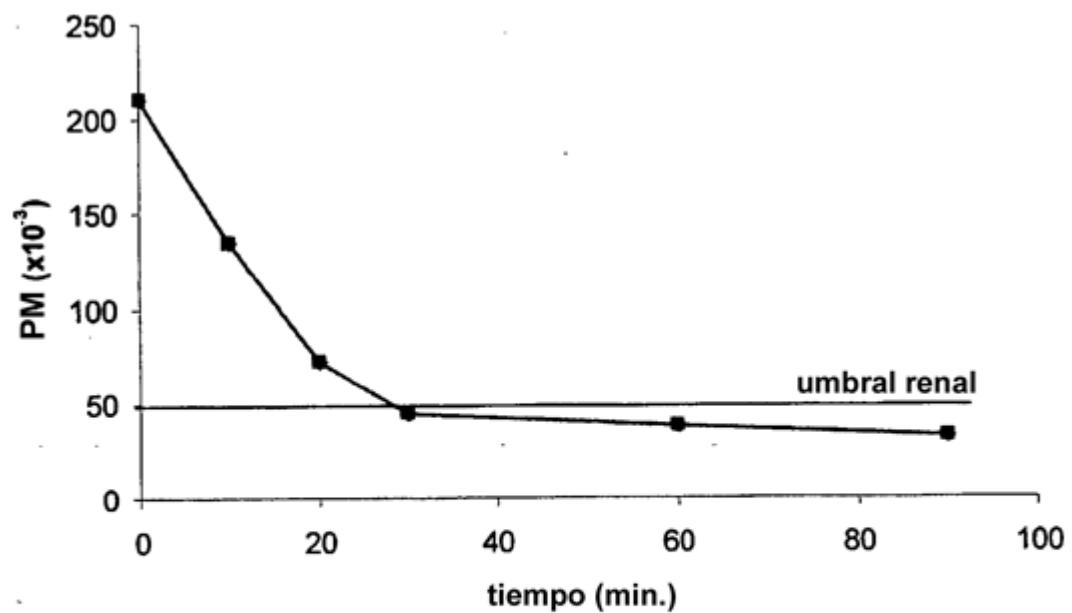


Figura 4

ES 2 458 841 T3

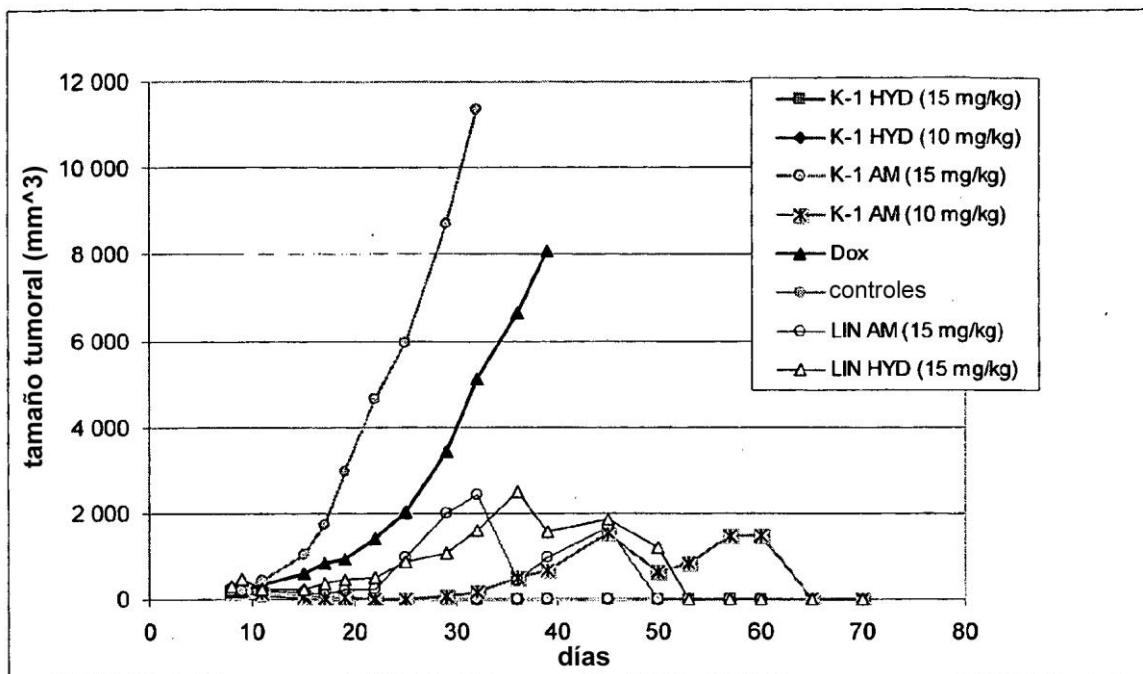


Figura 5

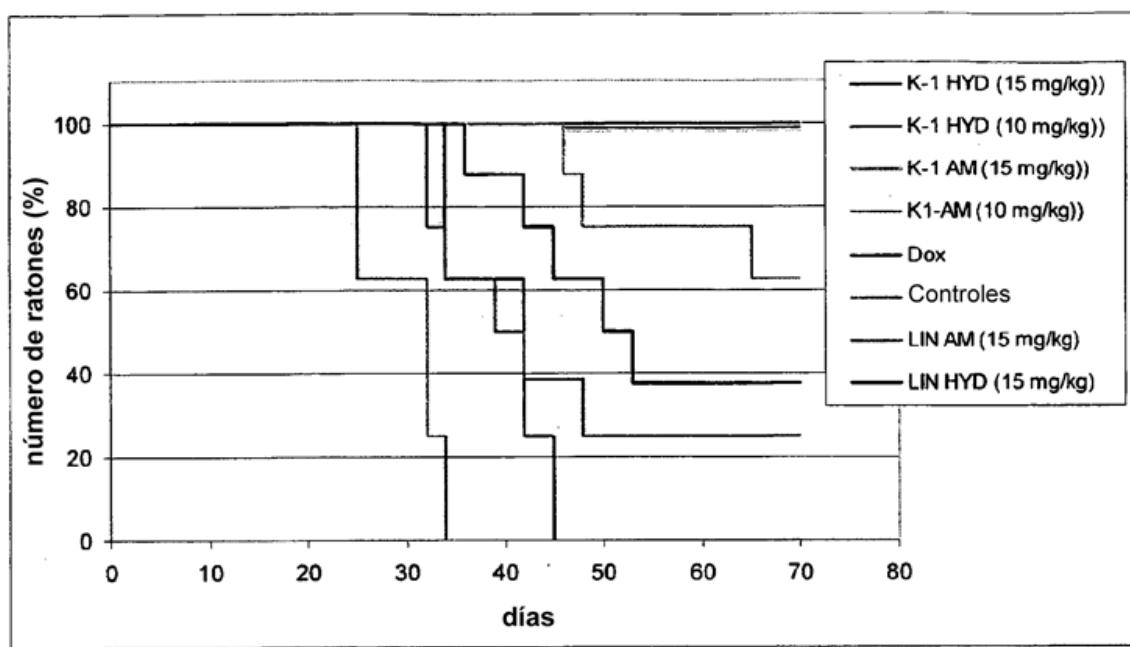


Figura 6

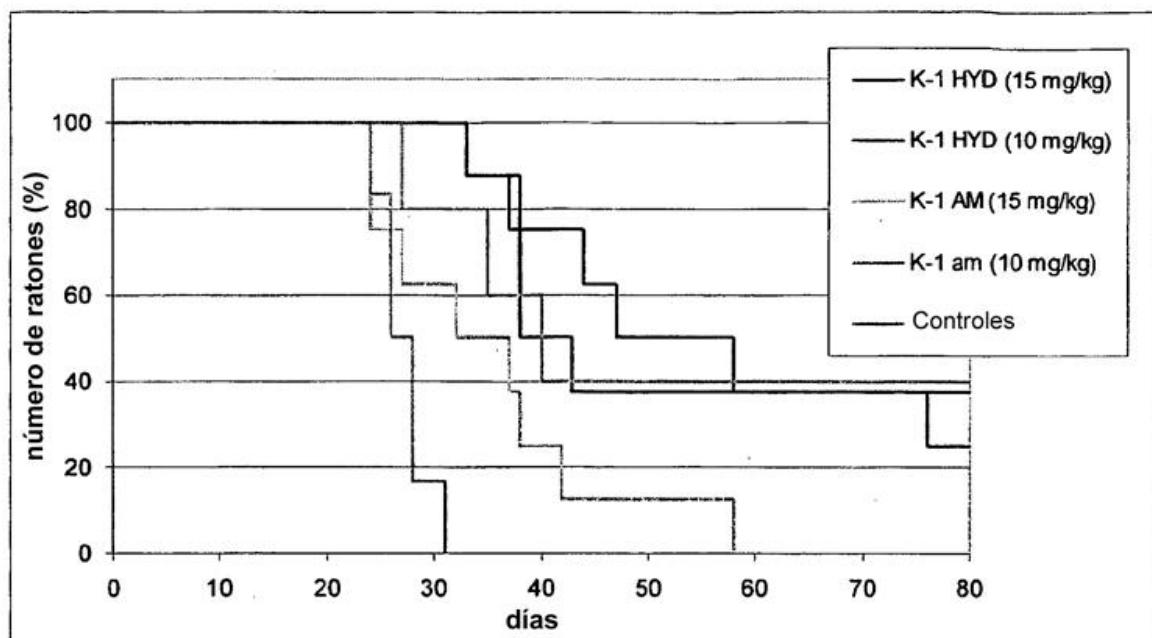


Figura 7