

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 525 066**

(51) Int. Cl.:

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

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09734556 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2279006**

---

(54) Título: **Uso terapéutico de preparaciones farmacéuticas que contienen fármacos antitumorales unidos a ácido hialurónico en el tratamiento de neoplasias**

(30) Prioridad:

**22.04.2008 IT PD20080125  
08.10.2008 IT PD20080283**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.12.2014**

(73) Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)  
Via Ponte della Fabbrica 3-A  
35031 Abano Terme (Padova), IT**

(72) Inventor/es:

**CAMPISI, MONICA;  
RENIER, DAVIDE;  
PIERIMARCHI, PASQUALE y  
SERAFINO, ANNALUCIA**

(74) Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 525 066 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## Descripción

Uso terapéutico de preparaciones farmacéuticas que contienen fármacos antitumorales unidos a ácido hialurónico en el tratamiento de neoplasias

5

## Objeto de la invención

La presente invención describe el nuevo uso en el campo oncológico de bioconjungados como agentes diferenciantes obtenidos por la conjugación entre el ácido hialurónico (HA) y un producto quimioterapéutico (identificado de aquí en adelante con el nombre comercial ONCOFID®) seleccionado de SN38. La doxorrubicina y cis-platino para tratar tumores primarios y metástasis. Particularmente, el comportamiento biológico se describe en términos del mecanismo de acción, eficacia y tolerabilidad de preparaciones farmacéuticas del derivado de ONCOFID® soluble en agua.

10

Más específicamente, la invención se relaciona con el sorprendente efecto biológico y farmacológico demostrado por formulaciones basadas en ONCOFID-S (conjungados HA-SN38) y ONCOFID-D (conjungados HA-doxorrubicina) en promover la diferenciación de células tumorales hacia un fenotipo no transformado, comparado con el fármaco de referencia Irinotecan (o CPT11 cuya forma activa se representa por SN38) y doxorrubicina.

15

## Campo de la invención

20

En años recientes, el conocimiento progresivo de procesos vitales que determina el comienzo, desarrollo, dispersión e implantación de un tumor y su metástasis no solo ha ofrecido a los investigadores la posibilidad de estudiar, sintetizar y/o probar nuevas moléculas químicas como nuevos agentes antitumorales, sino que ha facilitado además el estudio y perfeccionamiento de nuevas terapias de tratamiento que toleran problemas que permiten que problemas ligados a la toxicidad de fármacos antineoplásicos sean superados. Numerosos fármacos con una actividad antitumoral, de hecho, generalmente tienen una serie de características negativas tales como:

25

- baja solubilidad en agua, ya que muchas moléculas son sustancias hidrófobas que son difíciles de administrar;
- baja selectividad hacia las células tumorales, con una toxicidad consecuente hacia las células no cancerígenas;
- múltiples efectos no deseados a nivel sistémico;
- baja vida media plasmática, con la consiguiente necesidad de administraciones repetidas;
- inducción de resistencia al tratamiento quimioterapéutico en el tumor.

30

Adicionalmente a la búsqueda para nuevos principios activos crecientemente más efectivos en la terapia oncológica, el campo científico está tratando paralelamente de explotar las moléculas lo más posible cuya actividad antiblástica ya es conocida, mejorando sus rendimientos e intentando reducir las características negativas, como se describe anteriormente.

35

Una de las estrategias más ampliamente usadas para reducir la toxicidad intrínseca de fármacos antitumorales está ligada a la posibilidad de guiar el principio activo directamente y selectivamente a la célula tumoral.

40

Un enfoque prometedor se ofrece por la conjugación química de un fármaco antitumoral con grupos proporcionados con orientación activa que, por interacción específicamente con sitios receptores de la célula neoplásica, garantizan una alta selectividad del fármaco en tejidos tumorales. Un enfoque diferente se representa por la unión con macromoléculas (es decir polímeros) que, al conferir un alto peso molecular, permiten una mayor acumulación del principio activo en neoplasias debido al efecto EPR (retención y permeación mejoradas), es decir una acumulación ligada al paso a través del epitelio fenestrado de los vasos que alimentan el tumor (orientación pasiva) inadecuadamente drenado por el sistema linfático.

45

Desde hace muchos años, muchos fármacos antitumorales usados en el campo oncológico se modificaron químicamente para obtener profármacos, derivados terapéuticamente inactivos que sólo se hacen activos *in vivo*, gracias a procesos de hidrólisis espontánea y/o degradaciones enzimáticas que conducen a la liberación del principio activo, incrementando así su eficacia terapéutica.

50

La solubilidad de fármacos quimioterapéuticos en el sistema circulatorio representa la condición esencial para su efecto farmacológico. Algunos fármacos, de hecho, que han probado ser extremadamente activos en varios tipos de tumores tal como, por ejemplo, Camptotecinas, Paclitaxel y alcaloides que se derivan de Vinca, debido a su alta insolubilidad tienen problemas de administración intravenosa (y, para hormonas y antihormonas, también intramuscular) que pueden limitar y restringir su aplicación clínica.

Por las razones anteriores, nuevos fármacos quimioterapéuticos han sido sintetizados, que son creados por enlace químico (directo o indirecto por medio de un espaciador) entre el fármaco clásico y los llamados "polímeros terapéuticos" que, adicionalmente a conferir importantes características físico-químicas al principio activo (tal como mayor solubilidad), son capaces de dar un marcate activo y/o pasivo, incrementando su eficacia. Estos polímeros terapéuticos pueden de hecho actuar como un portador para el fármaco, o ellos pueden además ejercer una actividad biológica intrínseca.

Entre estos polímeros, el uso de ácido hialurónico (HA) ha probado ser extremadamente prometedor, cuyas características favorables lo hacen un portador adecuado para la administración de agentes antineoplásicos.

Los nuevos bioconjugados de HA y fármacos antitumorales identificados con el nombre comercial de ONCOFID®, conocidos en el estado de la técnica (WO2004/035629 e WO2007/014784), reivindican las siguientes características:

- superar el problema que se relaciona con la toxicidad intrínseca del fármaco en el que es directamente guiado a la célula tumoral, ya que muchos fenotipos tumorales sobreexpresan el receptor CD-44 específico para HA en su superficie;
- aumento en la solubilidad, ya que se ha demostrado que la unión de fármacos liposolubles a moléculas fuertemente hidrófilas tal como HA, aumenta considerablemente la solubilidad del fármaco en sí mismo en el sistema circulatorio;
- superar el problema de resistencia inducida por los fármacos antitumorales clásicos;
- nuevas características físico-químicas (tal como por ejemplo un aumento en la estabilidad del fármaco y por lo tanto un aumento en su permanencia en el sitio tumoral).

SN-38 es el metabolito activo de Irinotecan, un derivado farmacológico de Camptotecina, cuyo uso se relaciona con el tratamiento de varios tipos de tumores tales como melanomas, cáncer de mama, tumores ováricos, gástrico, de pulmón, cerebro, tumores pancreáticos y cáncer colon-rectal. Este fármaco tiene una alta actividad antitumoral pero no puede ser administrado como tal ya que este es no soluble en agua y, por esta razón, se ha conjugado químicamente con HA.

Los tumores colon-rectales son una de las formas más agresivas de tumores y representan una de las causas más frecuentes de muerte por neoplasia en los países occidentales.

La formación de cáncer en el colon-recto es debido a la proliferación descontrolada de células de la mucosa que reviste este órgano, su etiología es aún desconocida aún cuando estudios epidemiológicos han identificado posibles factores de riesgo, tales como:

- hábitos alimenticios
- factores genéticos
- pólipos neoplásicos
- enfermedades inflamatorias intestinales.

Se conoce que uno de los factores biológicos de pronóstico del carcinoma y adenoma de colon-recto es el gen APC (poliposis coli adenomatosa). Supuesto responsable de la poliposis cólica familiar, las mutaciones somáticas de este gen representan el primer evento en la historia natural de adenomas y carcinomas del colon.

Bajo condiciones normales (en la ausencia de neoplasias), el gen APC se localiza en el cromosoma 5 y codifica una proteína citoplasmática (proteína APC) que juega un papel clave en la regulación de la apoptosis del ciclo celular, adhesión e interacción intercelular, procesos de migración adicionalmente a la metastatización de tumores. La función mejor conocida de la proteína APC es su asociación con la proteína GSK-3β (proteína glucógeno-sintetasa quinasa 3 β) para la regulación de la cantidad de β-catenina libre presente en el citoplasma y por lo tanto en el núcleo: las proteínas anteriores, de hecho, mediante fosforilación de la β-catenina libre en un nivel citoplasmático, promueve su degradación. La β-catenina es una proteína capaz de unirse por sí misma al dominio citoplasmático de una proteína de membrana, la E-cadherina, involucrada en el proceso de adhesión celular. La destrucción del complejo intracelular E-cadherina-β-catenina (un evento asociado con la conversión de una célula no tumoral en una célula neoplásica), causa la pérdida de la capacidad de adhesión intercelular y por lo tanto facilita la formación de metástasis. Existen muchas demostraciones científicas que indican cómo este proceso tiene lugar tanto en las primeras fases como en la progresión de diferentes neoplasias, tales como cáncer de mama, cáncer de piel (particularmente melanomas), cáncer de huesos, cerebro y cáncer de tiroides y en los tumores de cabeza y cuello,

- 5 tumores del sistema linfático, cáncer de pulmón y en cáncer del mesotelio, esófago, estómago, colon, colon-recto, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio y ovarios (con todos los otros órganos abdominales). Como evidencia de esta afirmación, experimentos efectuados para la recuperación de la síntesis/presión normal de E-cadherina en líneas celulares tumorales, han demostrado la reversión de la forma maligna tumoral contra un fenotipo no transformado, por lo tanto ya no neoplásico (Birchmeier W. y otros, *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1198(1):11-26; De Vita V. y otros, *CANCER*, 6ta Edición, 2001, Capítulo 8).
- 10 En muchos carcinomas, una mutación en el gen APC causa la formación de una proteína APC inactiva, anómala, incapaz de unir a la proteína GSK-3 $\beta$  y por consiguiente regular la  $\beta$ -catenina que por lo tanto migra desde el citoplasma hacia adentro del núcleo donde se acumula y forma complejos con factores de transcripción (tal como Tcf-4) actuando como coactivador de activadores del crecimiento de oncogenes y la proliferación celular (*c-MYC*, *ciclina D1*), adicionalmente a proteasas extracelulares (MMP7), que facilitan procesos de invasión y metástasis (ver Figura 1). La Figura 1 muestra un esquema de la regulación de  $\beta$ -catenina en una célula normal (derecha) y en una célula tumoral (izquierda).
- 15 15 La  $\beta$ -catenina por lo tanto tiene todas las características de una oncoproteína, ya que el complejo APC/GSK-3 $\beta$ , debido a su capacidad de regular la actividad de la  $\beta$ -catenina, se define como oncosupresor (Kollings F. y otros *Digestion*, 2002, 66:131-144). La rápida regulación negativa de la  $\beta$ -catenina acumulada en el núcleo es de hecho obtenido gracias a la acción de las proteínas APC (cuando no está mutada) y GSK-3 $\beta$  que cuando se mueven hacia dentro del núcleo unen la oncoproteína degradándola y/o transportándola de nuevo hacia un nivel citoplasmático donde es fosforilada, después degradada (Neufeld K. y otros, *EMBO reports*, 2000, 1, 6:519-523). Este proceso está ausente en células tumorales donde el complejo APC/GSK-3 $\beta$  está inactivo, por lo tanto, la no regulación de la cantidad nuclear y la actividad de  $\beta$ -catenina son eventos de importancia primaria en el desarrollo y metastatización de neoplasias malignas.
- 20 25 La quimioterapia tiene un papel fundamental en el tratamiento de tumores. En el manejo de pacientes afectados por carcinomas de colon-recto, en la fase metastática, varios procedimientos terapéuticos se han adoptado: quimioterapia sistémica, quimioterapia loco-regional, terapias ablativas y cirugía.
- 30 30 El tratamiento quimioterapéutico representa el fulcro de las posibilidades terapéuticas disponibles para este grupo de pacientes. Los porcentajes de respuesta objetiva obtenidos con quimioterapia son iguales al 20% con una duración de respuesta corta y un bajo porcentaje de respuestas completas (solo 5%); las estabilizaciones de la enfermedad representan aproximadamente 30-40%.
- 35 Durante más de 40 años 5-FU fue la única arma terapéutica disponible en carcinomas de colon-recto en la fase avanzada.
- 40 40 En años recientes nuevos fármacos se han estudiado asociados con o sin 5-FU en un intento de mejorar la supervivencia de los pacientes afectados por adenomas metastáticos y carcinomas de colon-recto. Entre estos Irinotecan y Oxaliplatin juegan un papel fundamental. Irinotecan asociado con 5-FU, ha mostrado recientemente mayores porcentajes de respuesta objetiva y tiempo de progresión con respecto a pacientes tratados con 5-FU solo con una supervivencia total de aproximadamente 17 meses.
- 45 El Irinotecan, también conocido como CPT-11, está disponible en la forma de clorhidrato, este actúa al formar un complejo ternario fármaco-ADN-topoisomerasa I, una enzima que convierte una molécula de ADN superenrollada en una sin tensión de torsión en la transcripción del ADN u operaciones de replicación. La formación del complejo ternario con la camptotecina anterior crea una estabilización en el sistema en la fase de corte del ADN y asegura que la célula ya no es capaz de duplicarse ella misma causando la muerte por apoptosis.
- 50 Irinotecan es en sí mismo inactivo, pero la hidrólisis *in vivo* del enlace carbámico, conduce a la liberación del metabolito activo SN38 (Figura 2) que es el fármaco real responsable de la acción citotóxica, pero que, como es insoluble en agua, requiere excipientes particulares para su administración. La Figura 2 muestra la estructura química de Irinotecan® y SN38, respectivamente.
- 55 En la presente invención, el Solicitante describe el nuevo comportamiento biológico y farmacológico de los conjugados de HA-fármacos antitumorales identificados con el nombre comercial ONCOFID® descritos en WO2004/035629 y WO2007/014784 ya que es sustancialmente diferente del mostrado por los fármacos de referencia no conjugados en que comprende nuevas características terapéuticas y farmacodinámicas.
- La presente invención por lo tanto describe y reivindica el sorprendente e inesperado efecto biológico y farmacológico obtenido a partir de formulaciones basadas en ON-COFID® en promover una acción terapéutica antiproliferativa (por lo tanto

antitumoral) debido a la diferenciación/reversión de las células tumorales hacia un fenotipo no transformado más que la inducción de la apoptosis.

5 Descripción detallada de la invención

Se conoce que los derivados de ONCOFID<sup>®</sup>, como se especifica previamente, confieren características ventajosas a los fármacos antitumorales, tales como solubilidad en agua, estabilidad, selectividad con respecto a los tejidos tumorales, reducción en la resistencia a la quimioterapia y potenciación de la eficacia farmacológica.

10 Se conoce que uno de los tumores mortales más ampliamente extendidos está representado por carcinomas colon-rectales o adenomas y que una de las terapias más efectivas en el tratamiento de esta neoplasia está basada en CPT-11 intraperitonealmente. Como se indica anteriormente, se conoce que en este tipo de tumor, la mutación/inactivación del gen APC conduce a una serie de eventos que conducen a la acumulación nuclear de β-catenina y por lo tanto la activación de factores de transcripción que facilitan la invasión celular y la metástasis.

15 La presente invención describe bioconjugados de acuerdo con las reivindicaciones para el uso terapéutico en el campo oncológico que consisten en nuevas formulaciones basadas en ONCOFID<sup>®</sup>, particularmente ONCOFID-S representado por el bioconjugado HA-SN38 y ONCOFID-D representado por el bioconjugado HA-doxorrubicina.

20 Las formulaciones basadas en ONCOFID-S y ONCOFID-D que contienen ciertas concentraciones de los bioconjugados anteriores tienen de hecho determinados resultados sorprendentes y completamente inesperados en el tratamiento de tumores colon-rectales y melanomas ambos *in vitro* e *in vivo*, con un mecanismo de acción completamente diferente del fármaco no conjugado, permitiendo así un uso diferente del bioconjugado ya que es particularmente efectivo en dosificaciones diferentes de aquellas actualmente consideradas terapéuticamente activas.

25 La evaluación de los efectos en la proliferación celular indicada en el Ejemplo 10 ha revelado sorprendentemente cómo ONCOFID<sup>®</sup> causa un mecanismo de bloqueo de la proliferación celular atribuible a un efecto diferenciativo de la célula neoplásica que por lo tanto experimenta un proceso de reversión del fenotipo de la célula neoplásica maligna hacia un fenotipo no transformado es decir no tumoral, por medio de:

- 30 1. activación del complejo de proteínas APC/ GSK-3β por
- 2. reducción de la acumulación nuclear de β-catenina; y por
- 3. regulación del proceso en relación con la acción de β-catenina y E-cadherina, restableciendo así la capacidad de adhesión celular y la inhibición por contacto específicamente de una célula diferenciada no transformada, por

35 consiguiente sin inducir la muerte de la célula tumoral por apoptosis (como se conoce, por el contrario, para SN38). Al final de su ciclo celular, las células anteriores mueren sin considerar que se produce nueva metástasis y sin considerar que contribuyen al crecimiento del tumor primario.

40 Además, en experimentaciones posteriores, el Solicitante muestra cómo los conjugados de ONCOFID son capaces de modificar radicalmente las diferentes fases de vida de la célula neoplásica al causar la caída drástica de la fase 1 (definida como gap 1) y fase S, incrementando la fase 2 (definida como gap 2) en la que la célula "permanece bloqueada". Este resultado prueba cómo los conjugados de ONCOFID son capaces de modular todas las fases de vida de las células neoplásicas (en donde la fase S de la síntesis del ADN del ciclo celular está muy incrementada), trayéndolas hacia la diferenciación y bloqueando las fases de síntesis de nuevo ADN, por tanto de la proliferación celular activa. Un bloqueo del proceso de crecimiento del tumor primario y el proceso de metastatización se obtiene como consecuencia.

45 Al final de los ensayos experimentales, el Ejemplo 13 claramente muestra la mejor eficacia antitumoral *in vivo* de los conjugados de ONCOFID-S con respecto al fármaco no conjugado con la misma dosis administrada.

50 Como se muestra en los resultados, el uso del fármaco en cuestión como una nueva terapia farmacológica para neoplasias, es posible ya que el conjugado HA-SN38 causa una reducción considerable en la toxicidad sistémica de SN38 incrementando así el índice terapéutico del fármaco por sí mismo, pues es soluble en agua y más efectivo a dosificaciones muy inferiores que aquellas normalmente usadas en protocolos clínicos.

55 La presente invención divulga y reivindica bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales:

- como un agente diferenciante de la célula neoplásica hacia un fenotipo no tumoral no transformado para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas;
  - como un medicamento para el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina;
  - como un medicamento para el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con la inactivación del complejo APC-GSK-3 $\beta$ ;
  - como un medicamento para el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral;
  - como un medicamento para tratar el tumor primario o sus metástasis.
- 5 Los ejemplos de tales patologías neoplásicas asociadas respectivamente a la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina, la inactivación del complejo APC-GSK-3 $\beta$  y el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral son: mama, piel (y en particular el melanoma), huesos, cerebro, tiroides y tumores de cabeza y cuello, tumores del sistema linfático, los pulmones y en el mesotelio, el esófago, el estómago, el colon, el colon-recto, páncreas, el hígado, los riñones, los uréteres y la vejiga, próstata, endometrio y cáncer de ovarios (con todos los otros órganos abdominales).
- 10 El fármaco anterior se puede administrar sistémicamente, (endovenosa o arterial, intramuscular, intraperitoneal, intralinfática, subcutánea u oral), por vía intratecal, puede ser usado para una aplicación tópica (con una absorción transdérmica o por instilación endotraqueal), o puede ser administrada directamente en el sitio tumoral mediante inyección directa (tratamiento loco-regional).
- 15 En los siguientes ejemplos, el Solicitante ha demostrado cómo la preparación de conjugados de HA con fármacos antitumorales tales como SN38 (ONCOFID-S) y doxorubicina (ONCOFID-D), con un grado de derivatización de 1 a 20% peso/peso, produce derivados ONCOFID que son solubles y efectivos en soluciones acuosas a una concentración de 2 a 15 mg/ml.
- 20 Particularmente, el Solicitante ha demostrado, por medio de estudios experimentales *in vitro* efectuados mediante el uso de líneas celulares tumorales de adenocarcinoma de colon y melanoma humano (necesarios para la comprensión del mecanismo de acción), un comportamiento biológico y farmacológico completamente inesperado de los bioconjungados anteriores. A partir de estos datos, se puede deducir que el bloqueo de la proliferación celular ocurre con un mecanismo 25 diferente de la acción apoptótica del fármaco de referencia, lo que hace así al derivado de ONCOFID® un fármaco con una nueva actividad terapéutica y una eficacia mucho mayor obtenida con diferentes dosificaciones, para el tratamiento de neoplasias tales como tumores de mama, piel (y, en particular melanoma), huesos, cerebro, tiroides y tumores de cabeza y cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, esófago, estómago, colon, colon-recto, páncreas, el 30 hígado, riñones, uréteres y la vejiga, próstata, endometrio y ovarios (con todos los otros órganos abdominales). Para demostrar esto, el Solicitante proporciona los resultados de los estudios *ex vivo* obtenidos a partir de tejidos explantados después de la administración *in vivo* de los conjugados, y los resultados de los estudios *in vivo* que han revelado la sorprendente capacidad de inhibición tumoral de ONCOFID®.
- 35 ONCOFID® (como se describió previamente) identifica un nuevo grupo de bioconjungados basados en ácido hialurónico (HA) y fármacos antitumorales unidos covalentemente a través de un espaciador, que comprenden:
- 40
- antimetabolitos tales como, por ejemplo, análogos del ácido fólico (entre los cuales metotrexato), análogos de pirimidina (entre los cuales el 5-fluorouracilo y 1- $\beta$ -D-Arabino-furanosil- citosina, (Ara-C));
  - alcaloides/productos naturales, tales como, por ejemplo, vincristina y vinblastina (alcaloides de Vinca), el metabolito activo de irinotecan: SN38, taxanos tales como paclitaxel y docetaxel;
  - antibióticos y productos análogos, tales como por ejemplo, doxorubicina y epirubicina;
  - modificadores de la respuesta biológica;
  - diterpenoides;
  - agentes alquilantes, por ejemplo, nitrosoureas;
  - complejos de coordinación de platino, tales como, por ejemplo, carboplatino y cisplatino;
  - hormonas sintéticas y antihormonas, tales como, por ejemplo, el estradiol.
- 45
- 50 Particularmente adecuados para los fines de la presente invención son la doxorubicina, paclitaxel y el metabolito de irinotecan, SN38.
- 55

- El ácido hialurónico usado en la presente invención tiene un peso molecular que varía de 400 a 3,000,000 Da, preferentemente de 5,000 a 1,000,000 Da, y aún con mayor preferencia de 30,000 a 500,000 Da; puede ser de un origen extractivo, fermentativo o biosintético. El enlace covalente con el espaciador involucra el grupo carboxílico del ácido D-glucurónico de la unidad repetitiva del polímero, en un porcentaje que varía desde 1 a 100% (grado de sustitución), que forma un enlace éster o amida con el grupo funcional del espaciador molecular seleccionado que por lo tanto actúa como una conexión entre el ácido hialurónico y el fármaco quimioterapéutico. El agente espaciador consiste en una cadena alifática, aralifática, alicíclica o heterocíclica, lineal o ramificada, con o sin heteroátomos, que comprende grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amina (excluyendo hidrazidas y polipéptidos), grupos epoxi, cloruros de ácido, tioles, nitrilos, halógenos, anhídridos, isocianatos, e isotiocianatos; bromuros, yoduros y cloruros de ácidos carboxílicos con una cadena alifática C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> se prefieren, y particularmente, bromuros tales como ácido bromo propiónico, ácido bromo butírico, bromo butanol o bromo propanol. El grado de sustitución varía preferentemente desde 1 a 50% peso/peso, y aún con mayor preferencia desde 1 a 25%; %; para la conjugación con doxorrubicina, una sustitución de 3 a 20% es preferible, mientras que para SN38 de 1 a 15% peso/peso.
- Se describe que ONCOFID-P es el conjugado entre HA y paclitaxel, ONCOFID-S es el conjugado entre HA y SN38, ONCOFID-D es el conjugado entre HA y doxorrubicina y ONCOFID-Pt es el conjugado entre HA y cisplatino.
- Más específicamente, ONCOFID-S es el derivado de éster de HA (que tiene un peso molecular de 200 kDa) y SN38 previamente unido a un espaciador con cuatro átomos de carbono tales como ácido bromo butírico. El grado de sustitución está de acuerdo con las reivindicaciones.
- La síntesis de ONCOFID-S está ampliamente descrita en la descripción detallada y en los ejemplos 1-2 de la publicación de solicitud de patente PCT núm.WO2007/014784.
- ONCOFID-D es un éster de ácido hialurónico con un espaciador tal como bromo butanol o bromo propanol, a su vez unido a la doxorrubicina por medio de un enlace carbámico.
- La síntesis de ONCOFID-D también está ampliamente descrita en la descripción detallada y en el Ejemplo 10 de la publicación de la solicitud de patente PCT núm.WO2007/014784.
- ONCOFID-P ha sido previamente descrito ampliamente en la publicación de la solicitud de patente PCT núm. WO2004/035629.
- Finalmente, el Solicitante describe la preparación de diferentes formulaciones farmacéuticas acuosas en las que los bioconjungados en cuestión han demostrado ser particularmente solubles (es decir, en presencia de β-ciclodextrina, glucosa o liposomas), pero anteriormente todas las formulaciones que permiten la administración de los principios activos a dosis terapéuticamente activas sin problemas ligados a la biodisponibilidad/solubilidad de los fármacos en cuestión, contribuyendo así con las nuevas propiedades químicas/físicas/terapéuticas descritas anteriormente y demostradas a continuación, para aumentar la eficacia.
- Algunos ejemplos de la preparación de formulaciones de ONCOFID se proporcionan más abajo con propósitos puramente ilustrativos, junto con algunos ejemplos de estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que muestran el comportamiento biológico particular de los conjugados descritos anteriormente.
- EJEMPLO 1**
- Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con MW 200 kDa y SN-38 con un grado de sustitución de aproximadamente 8%*
- Primera fase: 500 mg de SN-38 se disuelven en DMF. Se agregan posteriormente 0.8866 g de EDC, 0.7011 de ácido 4-bromo butírico y finalmente 0.1163 g de DMAP.
- La reacción se controla por medio de TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>), mediante el uso de una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN 60/40.
- Después de aproximadamente 1 h la reacción se considera concluida y se añaden 10 ml de metanol y la mezcla se agita

durante aproximadamente 30'. El producto se precipita después en agua, se filtra, se añade a CHCl<sub>3</sub>, y se lava con H<sub>2</sub>O, ligeramente acidificada con HCl (pH ≈ 4), por medio de un embudo separador.

5 Las fases orgánicas secadas dan un producto amarillento que se purifica en una columna de cromatografía de gravedad y gradiente se eluye, a partir de CHCl<sub>3</sub> 100% a CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5.

El BrC4SN38 recuperado se seca en un rotovap y se deja secar durante una noche.

10 Segunda fase: 1.4347 g de HATBA (200 kDa) (tetra alquil amonio o sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico) se cargan en un reactor de vidrio encamisado de 3 cuellos y agitador magnético, y se disuelven en 100 ml de DMSO; la mezcla se agita hasta disolución completa, reactor que es regulado por termostato a 38°C.

15 380 mg de los intermediarios de BrC4SN38 disueltos en DMSO se añaden a la solución de HATBA y la mezcla se deja en agitación durante aproximadamente 48 horas a 38 °C.

20 15 Al final de la reacción, se añaden 14 ml de una solución saturada de NaBr y la mezcla se agita durante aproximadamente 60 minutos para completar el intercambio de cationes TBA-Na y obtener HA sódico. La precipitación se efectúa después con etanol; el sólido obtenido se recupera por filtración en Gooch 4 y se transfiere a un vaso de precipitado para lavados subsiguientes con etanol y finalmente se seca bajo vacío a 40°C.

#### Ejemplo 2

25 *Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con MW 200 kDa y SN-38 con un grado de sustitución de aproximadamente 3.5%*

30 Primera fase: 199 mg de SN-38 se disuelven en 100 ml de ACN y se añaden a la solución 383 mg de 1-(3-dimetilaminopropilo)-3-etylcarbodiimmida (EDC), 258 mg de ácido 4-bromobutírico y 60 mg de DMAP. La tendencia de la solución se controla por medio de cromatografía TLC (fase estacionaria de sílice con indicador de fluorescencia y eluyente de cloroformo-acetonitrilo 60:40). El producto se recupera por la eliminación del disolvente en un rotovap y se purifica por cromatografía en una columna de sílice. El intermediario así obtenido se seca a temperatura ambiente bajo un alto vacío y finalmente se pesa.

35 Segunda fase: 160 mg del intermediario de BrC4SN38 se disuelve en 20 ml de NMP y posteriormente se añade a una solución de HATBA 1.2 g en 120 ml de NMP previamente regulado por termostato a 38°C. La mezcla se deja a 38°C durante 72 h y después se diluye con 5 ml de agua y 8 ml de una solución saturada de bromuro de sodio. Toda la mezcla se deja en agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion TBA. El producto se precipita después mediante la adición gota a gota de etanol y finalmente se purifica por lavados en etanol y se seca bajo vacío a 40°C.

#### Ejemplo 3

40 *Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con MW 200 kDa y doxorubicina con un grado de sustitución de aproximadamente 10%*

45 Primera fase: 770 mg de doxorubicina clorhídrico se pesan y se disuelven en 120 ml de DMF anhídrido en presencia de 770 µl de trietilamina, se añaden posteriormente 560 mg de 3-bromo butanol, previamente activado con N-hidroxisuccinimida. La reacción se controla por medio de cromatografía TLC (fase estacionaria de sílice con indicador de fluorescencia y eluyente de cloroformo-etanol 80:20) y se considera concluida después de 15 minutos. El producto se precipita en agua desmineralizada y se recupera por filtración sobre Gooch 5. El residuo sólido, añadido a CHCl<sub>3</sub>, se lava con H<sub>2</sub>O, ligeramente acidificada con HCl (pH ≈ 4), por medio de un embudo separador.

50 50 Las fases orgánicas secadas dan un producto rojo oscuro que se carga en una columna de cromatografía de gravedad y gradiente se eluye, a partir de CHCl<sub>3</sub> 100% a CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 95:5, para la purificación.

55 El intermediario BrC3ODox recuperado se seca en un rotovap y se deja secar durante una noche. Segunda fase: 964 mg de HATBA (200 kDa) se cargan en un reactor de vidrio encamisado de 3 cuellos y agitador magnético, y se disuelven en 100 ml de DMSO; la mezcla se agita hasta la disolución completa, el reactor que es regulado por termostato a 38°C.

550.5 mg del intermediario de BrC3ODoxo sciolti en DMSO se añaden a la solución de HATBA; la reacción se mantiene bajo agitación durante aproximadamente 48 horas a 38°C.

5 Al final de la reacción, se añaden 8 ml de una solución saturada de NaBr gota a gota y la mezcla se agita durante aproximadamente 30 minutos para completar el intercambio de cationes TBA-Na y obtener HA sódico. La precipitación se efectúa después con etanol; el sólido obtenido se recupera por filtración sobre Gooch 4 y se transfieren a un vaso de precipitado para lavados subsiguientes con etanol y finalmente se seca bajo vacío a 40°C.

10 Ejemplo 4

*Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con MW 200 kDa y un compuesto platinado con un grado de sustitución de aproximadamente 12%*

15 200 mg de cis-diamino(dicloro) platino (II) (0.666 mmol) se disuelven en 20 ml de agua desmineralizada y se hacen reaccionar durante 6 h a 60°C con dos equivalentes de AgNO<sub>3</sub> para ser convertidos en diamina(dinitrato) platino (II). 140 mg de ácido bromosuccínico (0.7 mmol) se añaden después y la reacción de intercambio de los ligandos se lleva a cabo a 60°C durante 24h. La Figura 3 muestra un esquema de la síntesis del intermediario Bromosuccinatodiamino-platino. El intermediario de la síntesis se precipita y se purifica para la reacción subsiguiente con ácido hialurónico.

20 240 mg de Bromosuccinatodiamino-platino (II) se disuelven en 20 ml de DMSO y se añade lentamente a una solución de sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico (HATBA) en DMSO (1.750 g en 150 ml). La reacción se lleva a cabo a 38°C durante 48h, después de lo cual se añaden 14 ml de una solución saturada de NaBr, bajo agitación durante aproximadamente 60 minutos con el fin de completar el intercambio de cationes TBA-Na y obtener HA sódico. La precipitación se efectúa después con etanol; el sólido obtenido se recupera por filtración sobre Gooch 4 y se lava con etanol y finalmente se seca bajo vacío a 40°C. El contenido de platino del conjugado se determina a través de la técnica de ICP (plasma acoplado inductivamente).

25 Ejemplo 5

30 *Preparación de una solución basada en ONCOFID-Pt en una solución glucosato al 5% p/v.*

35 60 mg de ONCOFID-Pt, obtenidos como se describe en el Ejemplo 4, con un grado de sustitución en los residuos carboxílicos de 3 a 15% p/p, se disuelven en 29 ml de solución acuosa que contiene 5% p/v de glucosa. La solución se deja bajo agitación magnética hasta la disolución completa del conjugado; se filtra después sobre filtros esterilizantes en celulosa regenerada (RC) con una jeringa de 0.22 µm. El título de la solución (3 mg/ml en ONCOFID) se determina por medio de espectrofotometría antes y después de la filtración para verificar una recuperación total del conjugado después de la filtración.

40 Ejemplo 6

45 *Preparación farmacéutica basada en ONCOFID-S en una solución de β-ciclodextrina al 1.5% p/v.*

62 mg de ONCOFID-S, obtenido como se describe previamente, con un grado de sustitución en los residuos carboxílicos de 3 a 15% p/p, se disuelven en 22 ml de solución acuosa que contiene 1.5% p/v de β-ciclodextrina. La solución se deja bajo agitación con un agitador magnético hasta la disolución completa del conjugado; se filtra después sobre filtros esterilizantes en celulosa regenerada (RC) con una jeringa de 0.22 µm. El título de la solución (2.8 mg/ml en ONCOFID-S) se determina por medio de espectrofotometría antes y después de la filtración para verificar una recuperación total de conjugado después de la filtración.

50 Ejemplo 7

*Preparación farmacéutica basada en ONCOFID-S en una solución de glucosa al 5% p/v.*

55 56 mg de ONCOFID-S, obtenido como se describe previamente, con un grado de sustitución en los residuos carboxílicos de 3 a 15% p/p, se disuelven en 20 ml de solución acuosa que contiene 5% p/v de glucosa. La solución se deja bajo agitación con un agitador magnético hasta la disolución completa del conjugado; se filtra después sobre filtros esterilizantes en celulosa regenerada (RC) con una jeringa de 0.22 µm. El título de la solución (2.8 mg/ml en ONCOFID-S) se determina por

medio de espectrofotometría antes y después de la filtración para verificar una recuperación total de conjugado después de la filtración.

Ejemplo de Referencia 8

Preparación farmacéutica basada en ONCOFID-P en una solución de glucosa al 5% p/v.

100 mg de ONCOFID-P, obtenidos como se describe en los Ejemplos 5, 6, 7, 9 y 10 de la patente WO2004035629, se disuelven en 20 ml de solución acuosa que contiene 5% p/v de glucosa. La solución se deja bajo agitación con un agitador magnético hasta la disolución completa del conjugado; se filtra después sobre filtros esterilizantes en celulosa regenerada (RC) con una jeringa de 0.22 µm. El título de la solución (5 mg/ml en ONCOFID-P) se determina por medio de espectrofotometría antes y después de la filtración para verificar una recuperación total de conjugado después de la filtración.

Ejemplo 9

Preparación farmacéutica basada en ONCOFID-D en una solución glucosato al 5% p.v.

60 mg de ONCOFID-D, obtenidos como se describe previamente, con un grado de sustitución en los residuos carboxílicos de 3 a 15% p/p, se disuelven en 20 ml de solución acuosa que contiene 5% p/v de glucosa. La solución se deja bajo agitación con un agitador magnético hasta la disolución completa del conjugado; se filtra después sobre filtros esterilizantes en celulosa regenerada (RC) con una jeringa de 0.22 µm. El título de la solución (3 mg/ml en ONCOFID-D) se determina por medio de espectrofotometría antes y después de la filtración para verificar una recuperación total de conjugado después de la filtración.

Ejemplo 10

Experimentación *in vitro* del bioconjugado ONCOFID-S en modelos preclínicos de adenocarcinoma de colon

El objetivo de esta experimentación *in vitro* es principalmente para definir el perfil de actividad del bioconjugado que consiste en HA unido al preparado de SN38 en el Ejemplo 2 formulado en solución acuosa, para evaluar/comparar la actividad antineoplásica de los derivados de ONCOFID contra los fármacos de referencia, determinando así su capacidad farmacológica en relación con el mecanismo de acción y agente antineoplásico comparativo.

Productos probados y Principios Activos Probados

- SN38: producto de referencia control;
- ONCOFID-S: derivado éster del HA unido covalentemente a SN38 con una esterificación en el carboxilo (p/p) de 3.5%

Preparaciones Farmacéuticas Probadas

- El SN28 se disolvió en una mezcla que consiste en DMSO/CH3CN/EtOH (10:45:45) a temperatura ambiente.
- Solución de ONCOFID-S en β-ciclodextrina: preparado como se describe en el Ejemplo 6.

Líneas Celulares Usadas

Células de adenocarcinoma de colon de una rata DHD/K12/Trb que expresa el receptor para HA CD44

Protocolo experimental

- 1) la línea celular que es examinada se siembra en placas a una concentración de  $6 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ , en placas con 24 pocillos con un fondo plano;
- 2) después de 24 horas, las soluciones a ensayar, adecuadamente diluidas en el medio de cultivo, se añaden a las células;

3) 24 o 48 h después del tratamiento, la vitalidad celular se evalúa con el método de exclusión con azul Tripan, un colorante extruido de células vitales y metabólicamente activas, sin embargo retenido por las células muertas que se vuelven de color azul.

## 5 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en términos de la vitalidad de las células DHD/K12/Trb en relación con la dosis, adicionalmente de los valores de IC50 del nuevo conjugado ONCOFID-S comparado con la de SN38 no conjugado después de 24 h de tratamiento, mostró una mayor eficacia de ONCOFID-S con respecto a SN38. Se encontró que los valores de IC50 de SN38 como tal y ONCOFID-S son 1.4 µg/ml y 0.4 µg/ml respectivamente. Considerando que el conjugado ONCOFID-S en cuestión se derivatizó a 3.5% en peso en SN38, el valor IC50 del equivalente de SN38 (conjugado con HA) es aún más baja (0.014 µg/ml), es decir 100 veces más activo que el fármaco de referencia, lo que confirma una potenciación de su eficacia farmacológica cuando se conjuga con el ácido hialurónico.

15 La Figura 4 muestra el gráfico de la vitalidad celular en relación con el tiempo después del tratamiento con HA, SN38 o ONCOFID-S a una concentración de 0.5 µg/ml.

20 Debido a la importancia de la función de regular la β-catenina en la formación y progresión de carcinomas de colon-rectales, se verificó si el tratamiento con Oncofid-S es capaz de modificar la expresión intracelular y la distribución de las moléculas implicadas en el proceso de control de la proteína anteriormente, como se describió previamente. El efecto del tratamiento con ONCOFID-S en la distribución intracelular de E-cadherina, β-catenina, APC e GSK-3β en las células DHD/Trb por lo tanto se analizó por medio de microscopía de fluorescencia. Los anticuerpos específicos se usaron para las proteínas anteriores, visualizando con el uso de anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos tales como rodamina y fluoresceína.

25 Los resultados obtenidos mostraron que el efecto antiproliferativo y por lo tanto antitumoral, del tratamiento con el bioconjunto Oncofid-S que se muestra en la Figura 4, está precedido por:

- la translocación hacia adentro del núcleo de tanto la proteína APC como GSK-3β quinasa (Figura 4a), donde son capaces de regular la acumulación de β-catenina por medio de fosforilación (como se indica previamente) con la consiguiente detención del funcionamiento de la proliferación celular;
- la translocación de β-catenina desde el núcleo (en donde, como se ha descrito previamente, se sabe que se acumulan y activan oncogenes implicados en la proliferación de células tumorales) al citoplasma (Figura 4b) donde, mediante la combinación del nivel de la membrana celular con E-cadherina, esto regenera el complejo intracelular de E-cadherina-β-catenina que regula la adhesión celular y representa un claro signo de la diferenciación celular;
- el consiguiente aumento de la expresión de E-cadherina (Figura 4b), proteína de membrana involucrada en los procesos de adhesión intercelular y en la formación de la unión célula-célula (que, como se sabe, tiene un papel fundamental en la determinación de la inhibición por contacto y la diferenciación celular); el aumento en la expresión de E-cadherina es, de hecho, considerado un marcador de la diferenciación de células epiteliales no tumorales de mucosa cólica sana;
- un aumento en la expresión de citoqueratina 20 (CK20), 2<sup>do</sup> marcador de la diferenciación de las células epiteliales no tumorales de mucosa cólica sana (Figura 5). Todas las modificaciones anteriores relativas a la diferenciación celular no se revelan en las muestras tratadas con SN38 no conjugado.

45 Estos datos demuestran claramente que el mecanismo de detención de la proliferación de células neoplásicas en las muestras tratadas con ONCOFID-S se muestran con la Figura 4, se puede atribuir a un efecto diferenciante y no a la inducción de una muerte celular masiva por apoptosis, como se sabe, por el contrario, para SN38.

La Figura 5 muestra el análisis con microscopio electrónico de barrido (SEM) de las modificaciones morfológicas inducidas por el tratamiento *in vitro* sobre las células tumorales analizadas después de la experimentación, modificaciones que confirman el efecto diferenciante del bioconjunto con respecto a las células neoplásicas hacia un fenotipo no transformado es decir, no tumoral, por lo tanto, restaurando la capacidad de adhesión intercelular responsable de la inhibición por contacto, causando así el bloqueo de la proliferación del tumor. La Figura 5 muestra el efecto de ONCOFID-S después de 48 h de tratamiento sobre la expresión de CK20 y sobre la morfología de las células de adenocarcinoma de colon de rata DHD/K12/Trb: después del tratamiento se aumentó el número de células que expresan CK20 en comparación con el control no tratado y los cultivos celulares tratados con ácido hialurónico. La morfología celular de las células tratadas con el

bioconjuguado muestra las características típicas de la célula epitelial diferenciada, tales como una mayor adhesión al sustrato, mayor aplanamiento y la presencia de estrechas uniones célula a célula.

#### Conclusiones

En la línea celular de adenocarcinoma de colon, que es positivo para la expresión de los receptores CD44, el derivado ONCOFID-S en dosis bajas muestra un efecto antiproliferativo sorprendente debido no tanto a la inducción de apoptosis, como se observa y conoce para SN38, de una diferenciación/reversión de las células de adenocarcinoma en células epiteliales no transformadas, es decir, no tumorales, por lo tanto no proliferante. Una vez que han concluido su ciclo celular, las células anteriores mueren sin crear nuevas metástasis y sin contribuir al crecimiento de la neoplasia.

#### Ejemplo 11

##### *Experimentación en vitro del bioconjuguado ONCOFID-S en modelos preclínicos de adenocarcinoma de colon*

El objetivo de esta experimentación *in vitro* es principalmente para definir el perfil de actividad del derivado de ONCOFID con un grado de derivatización superior y formulado en solución acuosa de glucosato, para evaluar/comparar la actividad antineoplásica con la del fármaco de referencia, determinando así la capacidad farmacológica en relación con el agente comparativo antineoplásico.

#### Esquema Experimental

##### Productos probados y principios activos probados:

- SN38: producto control de referencia;
- ONCOFID-S: derivado éster del HA unido covalentemente a SN38 con un % de esterificación en el carboxilol (p/p) de 8% preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.

##### Preparaciones farmacéuticas probadas

- El SN28 se disolvió en una mezcla que consiste en DMSO/CH3CN/EtOH (10:45:45) a temperatura ambiente.
- Solución de ONCOFID-S en glucosato preparado como se describe en el Ejemplo 7.

##### Líneas celulares usadas

Células de adenocarcinoma de colon de una rata DHD/K12/Trb.

##### Protocolo experimental

- 1) la línea celular siendo examinado se sembraron en placas a una concentración de  $6 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ , en placas con 24 pocillos con un fondo plano
- 2) después de 24 horas, las soluciones a ensayar convenientemente diluidas en el medio de cultivo se añaden a las células
- 3) 24 o 48 h después del tratamiento, la vitalidad celular se evalúa con el método de exclusión con azul Tripan, un colorante extruido a partir de células vitales y metabólicamente activas, retenido por las células muertas que se vuelven de color azul.

##### Resultados

Los resultados obtenidos en términos de la vitalidad celular en relación con la dosis de ONCOFID-S probada (concentraciones de 0.125, 0.25 y 0.5 y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) después de 48 h de tratamiento, se indican en forma gráfica (Figura 6).

La dosis de 250 ng/ml corresponde a IC50 y confirma la mucho mayor eficacia de ONCOFID-S preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, con respecto al preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 (IC50 igual a 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , como se indica en el resultados del Ejemplo 5); por consiguiente la eficacia es mucho mayor que el SN38 no conjugado.

Este resultado se puede atribuir al porcentaje de derivatización mayor en SN38, es decir, 8% en peso, con respecto a los ONCOFID-S (OF-S) derivatizados en 3.5%.

5 Una tabla se proporciona más abajo, de la IC50 de los 2 conjugados con diferentes grados de sustitución (3.5 y 8%) y los respectivos equivalentes en SN38 conjugado, con respecto al fármaco de referencia SN38 no-conjugado.

	IC50
10	
	SN38 no conjugado 1.4 µg/ml
	OF-S 3.5% w/w 0.4 µg/ml
15	
	SN38 equiv 0.014 µg/ml
	OF-S 8% p/p 0.25 µg/ml
	SN38 equiv 0.02 µg/ml

## 20 Conclusiones

El derivado ONCOFID-S muestra una eficacia cinco veces mayor que la observada para el fármaco SN38 no conjugado, pero, teniendo en cuenta la concentración del equivalente de SN38, la eficacia confirma ser aproximadamente 70 veces mayor que la del fármaco de referencia. Además, una comparación con los estudios del conjugado con un porcentaje de derivatización más pequeño muestra que mientras más el ácido hialurónico se derivatiza en SN38, mayor será la eficacia de ONCOFID-S.

## Ejemplo 12

### 30 *Experimentación in vitro del bioconjugado ONCOFID-S en modelos preclínicos de adenocarcinoma de colon*

El objetivo de la experimentación anterior es para estudiar la influencia del derivado ONCOFID-S en las diversas fases de la vida celular para evaluar su actividad contra la del fármaco de referencia SN38.

### 35 Esquema experimental

#### Productos probados y principios activos probados

- 40 • SN38: producto control de referencia;
- ONCOFID-S: derivado éster del HA unido covalentemente a SN38 con un % de esterificación en el carboxilo (p/p) de 3.5% preparado de acuerdo con el Ejemplo 2;

#### Preparaciones farmacéuticas probadas

- 45 • El SN28 se disolvió en una mezcla que consiste en DMSO/CH3CN/EtOH (10:45:45) a temperatura ambiente.
- Solución de ONCOFID-S en glucosato preparado como se describe en el Ejemplo 7

#### Líneas celulares usadas

### 50 Células de adenocarcinoma de colon de una rata DHD/K12/Trb

#### Protocolo experimental

Como se describe para los ejemplos 8 y 9.

### 55 Resultados

El efecto del conjugado ONCOFID-S (a una concentración de 0,5 µg/ml) se determinó mediante el uso de un análisis del tipo citofluorométrico; después de 24 h de tratamiento farmacológico, las fases de células se identifican con FACS-Scan (Becton Dickinson) por análisis citofluorométrico del contenido de ADN después de colorear las células con *yoduro de propidio*.

5

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos: el tratamiento con el conjugado en cuestión causa el colapso drástico de las fases *gap1* y *S* mientras que la fase *gap2* aumenta lo que diferencia el ONCOFID del fármaco de referencia que, por el contrario, aumenta tanto la primera fase y la fase *S*.

10

Con el fin de evaluar si los datos obtenidos persisten con el tiempo, la prueba de arrastre fue efectuada en la que, después de 48 h de tratamiento, el medio de cultivo se sustituye con medio fresco sin tratamiento: las fases celulares se definieron después, de nuevo en el punto definido como TO y, después de 24 h de la cultura, T24.

15

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 8: ellos muestran claramente que incluso después de 24 horas de suspensión farmacológica, el bloqueo de las fases *gap1* y *S* persiste, lo que indica cómo es por lo tanto irreversible el efecto del fármaco.

#### Conclusiones

20

En cada célula proliferante de mamífero, la replicación de su genoma y la división de la célula misma tienen lugar dentro de fases de la vida de células específicas, identificado como *gap1*, *S*, *gap2*. En *gap1* la célula se encuentra con todas las modificaciones bioquímicas que deben prepararse para la fase *S* en la que se sintetiza ADN nuevo: en *S*, de hecho, se genera la copia exacta del material genético de la célula, que se dividirá en dos células hijas a través del proceso posterior de mitosis *M*. La fase que sigue a *S* y precede a *M*, se define *gap2* y es la fase de preparación de la mitosis. Los resultados obtenidos muestran cómo el bioconjuguado ONCOFID es efectivo en la reducción sustancial de la fase de la vida más importante de la célula neoplásica: la fase *S* de la síntesis activa del nueva ADN para la posterior proliferación y el crecimiento del tumor, que se aumenta significativamente en las células tumorales en comparación con las células no tumorales. Por lo tanto, a dosis bajas, el nuevo fármaco ha demostrado ser capaz de modular las fases de crecimiento celular mediante el bloqueo de la proliferación tumoral de una manera sustancialmente diferente del fármaco de referencia SN38.

25

#### Ejemplo 13

##### *Experimentación in vitro del bioconjuguado ONCOFID-D en modelos preclínicos de melanoma humano*

30

El objetivo de esta experimentación *in vitro* es principalmente para definir el perfil de actividad del derivado ONCOFID-D formulado en solución de glucosato acuosa, para evaluar/comparar la actividad antineoplásica con la del fármaco de referencia, determinando así la capacidad farmacológica relativa al agente antineoplásico comparativo (doxorrubícina).

35

#### *Esquema Experimental*

##### Productos probados y principios activos probados

40

- Doxorubicina: producto control de referencia;
- ONCOFID-D: derivado éster del HA unido covalentemente a la doxorrubícina con un % de esterificación en el carboxilo (p/p) de 10% preparado de acuerdo con el Ejemplo 3;

##### Preparaciones farmacéuticas probadas

45

- La doxorrubícina se disolvió en una solución de glucosa a 5% p/v a temperatura ambiente.
- La solución de ONCOFID-D en glucosato preparada como se describe en el Ejemplo 9.

##### Líneas celulares usadas

50

Células de melanoma humano M14 que expresan el receptor para HA CD44.

Protocolo experimental

- la línea celular está examinando se sembraron a una concentración  $6 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ , en placas con 24 pozos con un fondo plano;
- después de 24 horas, las soluciones a ensayar, adecuadamente diluidas en el medio de cultivo, se añaden a las células;
- 24 horas después del tratamiento, la citotoxicidad se evalúa en microscopía confocal mediante colorante con una prueba de ensayo de vitalidad celular "Live Dead" Cell Vitality Assay test (Molecular Probes, Eugene, OR). La observación se efectúo por medio de un microscopio confocal LEICA TCS SP5.

10

Resultados

15

El efecto citotóxico inducido por ONCOFID-D (OF-D) y doxorrubicina no conjugada se indican más abajo en forma gráfica (Figura 9), en relación con la dosis (concentraciones de 0.25, 0.5, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) después de 24 h de tratamiento de la línea celular de melanoma M14.

20

Conclusiones

25

La línea celular de melanoma confirmó ser fuertemente positiva para la expresión de los receptores CD44; la evaluación de la citotoxicidad en una microscopía confocal indica que ONCOFID-D es capaz de ejercer un efecto citotóxico mayor en esta línea de melanoma que la correspondiente doxorrubicina no conjugada. Además, teniendo en cuenta que en el bioconjungado ONCOFID-D el porcentaje de doxorrubicina conjugada es igual a 10% en peso, la actividad del fármaco es 10 veces mayor.

30

Ejemplo 14

35

*Evaluación de los efectos antitumorales *in vivo* del bioconjungado ONCOFID-S en un modelo de tumor experimental inducido en ratas por una línea de carcinoma del colon singénico*

40

Con el fin de confirmar la alta eficacia mostrada por derivados ONCOFID, también por medio de la experimentación *in vivo*, en la acción citotóxica *in vitro*, se usaron ratas BDIX para la inducción de tumores abdominales. La inoculación de la línea celular DHD/K12/Trb, efectuada intraperitonealmente, de hecho, causó la formación de la carcinomatosis peritoneal y ascitis tumoral.

45

Se hizo una comparación después de la capacidad antitumoral *in vivo* de CPT-11 a una concentración de 40 mg/kg contra ONCOFID-S, de nuevo a una concentración de 40 mg/kg (que corresponde a 3.2 mg/kg del principio activo SN38 el bioconjungado que es derivatizado por 80%), ambos administrados intraperitonealmente.

50

Los objetivos del estudio *in vivo* fueron los siguientes:

55

1. evaluar el crecimiento tumoral con respecto al grupo de control y/o la regresión o desaparición de las lesiones tumorales peritoneales y la observación de ascitis;
2. confirmar los resultados del efecto antitumoral obtenido en los estudios *in vitro*;
3. evaluar la toxicidad hematológica y tisular causada por el tratamiento.

45

Esquema ExperimentalFármacos usados: principios activos probados

50

- Irinotecan® (o CPT-11): producto control de referencia;
- ONCOFID-S: derivado éster del HA unido covalentemente a SN38 con un % de esterificación en el carboxilo (p/p) de 8% preparado de acuerdo con el Ejemplo 1;

55

Preparaciones farmacéuticas probadas

- El Irinotecan se disolvió en una solución de glucosato caliente ( $70^\circ\text{C}$ ) a 5% p/v por aproximadamente 1 hora.

- Solución de ONCOFID-S en glucosato preparada como se describe en el Ejemplo 7.
- Animales tratados: 36 ratas macho BDIX de 7 semanas de edad (aproximadamente 200 g) fueron divididos de acuerdo con criterios experimentales en los siguientes grupos (cada grupo consiste en 12 animales) :
1. Grupo Control : inóculo DHD/K12/trb.
  2. CPT-11 Grupo: inóculo DHD/K12/trb + tratamiento CTP-11 40 mg/Kg intraperitonealmente.
  3. ONCOFID-S Grupo: inóculo DHD/K12/trb + tratamiento ONCOFID-S 40 mg/Kg intraperitonealmente.

Después de 14 días de estabulación,  $1 \times 10^6$  de células DHD/K12/trb por rata fueron inoculadas intraperitonealmente. Después de 7 días se inició el tratamiento terapéutico previsto, que consta de 4 ciclos de terapia. El sacrificio de los animales se estableció de 7 días después del último tratamiento farmacológico. Los animales fueron evaluados una vez a la semana para la aparición de posibles signos de toxicidad, mediante la medición del peso corporal, y para la posible aparición de ascitis. En el momento del sacrificio un muestreo intracardíaco se efectuó en todos los animales y se evaluó la toxicidad hematológica debido al tratamiento farmacológico. Los tumores y ascitis se retiraron y se midieron. Los tejidos extraídos se fijaron en formol para evaluación histológica e inmunohistoquímica.

### Resultados

Evaluación de los volúmenes de carcinomatosis peritoneal.

La evaluación del crecimiento de nódulos tumorales se efectuó al final de los tratamientos; la Figura 10 muestra cómo al final de la prueba (T28), el volumen del promedio de los tumores reveló una buena respuesta al tratamiento en el grupo CPT-11 ( $5.9 \text{ cm}^3$ ) y una excelente respuesta en el grupo de ONCOFID-S ( $1.8 \text{ cm}^3$ ) con respecto al grupo control no tratado ( $15.5 \text{ cm}^3$ ).

### Evaluación de la presencia de ascitis sanguínea

La ascitis sanguínea se debe a la diseminación de un tumor en la cavidad peritoneal; clínicamente, se asocia principalmente con los tumores de origen gastrointestinal y de ovario. El mecanismo responsable de la formación de la ascitis maligna es, sobre todo, la obstrucción del drenaje linfático, se ha demostrado, sin embargo, que cuando la concentración de las células tumorales en el fluido ascítico es alta ( $> 4.000/\text{mm}^3$ ), su sola presencia puede producir ascitis debido a la producción de mediadores químicos (histamina, citocinas, ácido láctico) con un efecto irritante.

La Figura 11, en perfecta coherencia con el resultado de los volúmenes tumorales, muestra cómo al final de la prueba (T28) el volumen promedio de ascitis sanguínea (tumoral) tomado es 46.7 ml en el control, 21.5 ml en el grupo tratado con CPT-11 y sólo 1.9 ml en el grupo tratado con ONCOFID-S.

Cabe señalar que, mientras que 100% y 83% de los animales del grupo control y el grupo tratado con CPT-11 tuvieron ascitis sanguínea, sólo el 16% de los animales del grupo tratado con ONCOFID-S tuvo cantidades modestas de ascitis.

### Evaluación de la toxicidad hematológica:

La Figura 12 ilustra el análisis (a T28) del perfil hematocitométrico de los animales tratados. Se indican los valores de los granulocitos, la población de glóbulos blancos que son en su mayoría influenciados por el tratamiento quimioterapéutico.

En el grupo tratado con ONCOFID-S sin ascitis, no se registra leucopenia a partir de la toxicidad farmacológica, mientras que los animales que han desarrollado una modesta ascitis tienen un número de granulocitos que cae dentro de la norma, confirmando así la no toxicidad del bioconjuguado objeto de la presente invención.

### Conclusiones

En línea con los resultados obtenidos a partir de estudios *in vitro*, la experimentación *in vivo* muestra una diferencia sorprendente en la eficacia del fármaco conjugado con HA con respecto al fármaco libre. No sólo el derivado ONCOFID-S si causa una reducción promedio de la masa tumoral del 88% (contra 62% en el grupo tratado con CPT-11), sino que a partir de los datos de toxicidad hematológica y la medición del volumen de ascitis, un índice de la progresión del tumor, se observa una toxicidad farmacológica reducida inducida por el tratamiento en cuestión.

Ejemplo 15

Estudios *ex vivo* para la evaluación del mecanismo de acción del bioconjuguado ONCOFID-S.

5 Con el fin de confirmar el comportamiento biológico/farmacológico sorprendente de los derivados ONCOFID, que demostraron un efecto antiproliferativo de tipo diferenciativo en lugar de apoptótico, los tumores inducidos como se describe anteriormente fueron explantados para efectuar estudios inmunohistoquímicos.

Protocolo experimental

10 Los tumores explantados inmediatamente después de la extracción, se lavaron cuidadosamente con una solución fisiológica, se fijaron con formalina tamponada, se procesaron para su inclusión en parafina y se cortaron en secciones que tienen un espesor de 4 $\mu$ m. El análisis histológico se llevó a cabo en secciones coloreadas con hematoxilina/eosina mientras que el análisis inmunológico se efectuó con el uso de anticuerpos específicos para las proteínas estudiadas, se reveló con la ayuda de anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa para un análisis que podría tener lugar con un microscopio óptico.

Resultados

20 A partir del análisis inmunohistoquímico *ex vivo* de los tumores intraperitoneales, se proporcionó la confirmación de los datos obtenidos *in vitro* sobre el mecanismo de acción del bioconjuguado relativa a la regulación del complejo E-cadherina- $\beta$ -catenina, para la inducción de un efecto diferenciante y por lo tanto no proliferativo en lugar de tipo apoptótico.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis *ex vivo* son los siguientes:

25 1) en los tumores explantados de animales tratados con ONCOFID-S un patrón de expresión de los complejos oncoproteína/oncosupresor se puede observar que es completamente similar a lo observado en el modelo celular usado *in vitro*, lo que indica la reversión del fenotipo tumoral hacia un fenotipo normal. En los tumores explantados de los animales tratados con ONCOFID-S,  $\beta$ -catenina, de hecho, hay un cambio desde el núcleo hacia las uniones célula-célula mientras que la proteína APC y la proteína GSK3 $\beta$  se mueven hacia dentro del núcleo (Figura 10).

30 2) E-cadherina y CK20, marcadores de la diferenciación de las células epiteliales de la mucosa cólica, en los tumores explantados de los animales tratados con ONCOFID-S tienen una mayor expresión con respecto a los animales de control, exactamente como se observa en la célula modelo tratada *in vitro*. Esta expresión aumentada también es indicativo de la reversión del fenotipo tumoral indiferenciado hacia un fenotipo diferenciado y ya no proliferante ya que no es más tumoral (Figura 13).

Conclusiones

40 El comportamiento biológico/ farmacológico particular del derivado ONCOFID por consiguiente, se confirma además *in vivo*, en el bloqueo de la proliferación celular, la promoción de la diferenciación de las células tumorales hacia un fenotipo no tumoral no transformado.

## Reivindicaciones

- 5        1. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso como un agente diferenciante de célula neoplásica hacia un fenotipo no tumoral no transformado para tratar patologías neoplásicas, dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 10      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;  
           - doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
           - complejos de coordinación de platino.
- 15      2. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con una acumulación nuclear de la proteína  $\beta$ -catenina, seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios, dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 20      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;  
           - doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
           - complejos de coordinación de platino.
- 25      3. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con la inactivación del complejo de proteínas APC-GSK-3 $\beta$ , seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios, dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 30      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;  
           - doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
           - complejos de coordinación de platino.
- 35      4. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral, seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 40      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;  
           - doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
           - complejos de coordinación de platino.
- 45      5. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral, seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 50      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;
- 55      6. Bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de patologías neoplásicas asociadas con el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral, seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 60      - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;

- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
 - complejos de coordinación de platino.

- 5           5. Bioconjugados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales para uso en el tratamiento de tumor primario y sus metástasis, dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 10          - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;  
             - doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;  
             - complejos de coordinación de platino.
- 15          6. Bioconjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, para uso en el tratamiento de tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelio, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios.
- 20          7. Bioconjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de tumor de colon-recto.
- 25          8. Bioconjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en el tratamiento de melanoma.
- 30          9. Bioconjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso como un medicamento adecuado para administración sistémica, tópica o inyección directa hacia dentro del sitio del tumor.
- 35          10. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha administración se lleva a cabo por aplicación intravenosa o arterial, intramuscular, transdérmica, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, aplicación por instilación endotraqueal, subcutánea, aplicación oral o loco-regional.
- 40          11. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fármaco es SN38, metabolito activo de Irinotecan.
- 45          12. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fármaco es doxorrubicina.
- 50          13. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fármaco es carboplatino o cisplatino.
- 55          14. Bioconjugados de acuerdo con las reivindicaciones 1-13, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular en el intervalo de 400 a  $3 \times 10^6$  Da.
- 55          15. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular preferentemente en el intervalo de 5,000 a  $1 \times 10^6$  Da.
- 55          16. Bioconjugados de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular preferentemente en el intervalo de 30,000 a  $0.5 \times 10^6$  Da.
- 55          17. Formulaciones farmacéuticas que contienen bioconjugados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales junto con uno o más adyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables como agente diferenciante de una célula neoplásica hacia un fenotipo no tumoral no transformado, dichos bioconjugados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:
- 55           - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;

- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;
- complejos de coordinación de platino.

5

- 18.** Formulaciones farmacéuticas que contienen bioconjungados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales junto con uno o más adyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables para uso en tratar patologías neoplásicas asociadas con una acumulación nuclear de la proteína  $\beta$ -catenina, seleccionadas entre tumores de mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelia, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio u ovarios, dichos bioconjungados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:

10

- SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;
- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;
- complejos de coordinación de platino.

15

- 19.** Formulaciones farmacéuticas que contienen bioconjungados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales junto con uno o más adyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables para uso en tratar patologías neoplásicas asociadas con la inactivación del complejo de proteínas APC-GSK-3 $\beta$ , seleccionadas entre mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelia, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio y cáncer de ovarios, dichos bioconjungados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:

20

- SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;
- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;
- complejos de coordinación de platino.

25

- 20.** Formulaciones farmacéuticas que contienen bioconjungados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales junto con uno o más adyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables para uso en tratar patologías neoplásicas asociadas con el aumento de la fase S de la vida de la célula tumoral, seleccionadas entre mama, piel, huesos, cerebro, tiroides y para los tumores de cabeza-cuello, tumores del sistema linfático, pulmones y en el mesotelia, del esófago, estómago, colon, páncreas, hígado, riñones, uréteres y vejiga, próstata, endometrio y cáncer de ovarios, dichos bioconjungados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:

30

- SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%;
- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20%;
- complejos de coordinación de platino.

35

- 21.** Formulaciones farmacéuticas que contienen bioconjungados que consiste en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales junto con uno o más adyuvantes y/o excipientes farmacológicamente aceptables para uso en tratar tumores primarios y sus metástasis, dichos bioconjungados que consisten en ácido hialurónico unido a fármacos antitumorales, en donde el fármaco se selecciona de:

40

45

50

55

- 5            - SN38, metabolito activo de Irinotecan, covalentemente unido a través de un espaciador que consiste en ácido 4-bromobutírico que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de SN-38 en el carboxilo del ácido hialurónico igual a 3.5 y hasta 8%  
- doxorrubicina, covalentemente unida a través de un espaciador seleccionado de bromobutanol o bromopropanol, que forma un enlace éster con ácido hialurónico, con un grado de sustitución de la doxorrubicina en el carboxilo del ácido hialurónico que varía de 3 hasta 20 %;  
- complejos de coordinación de platino.

- 10          22. Formulaciones farmacéuticas acuosas de bioconjungados de acuerdo con las reivindicaciones 17-21 que contienen  $\beta$ -ciclodextrina o liposomas.  
23. Formulaciones farmacéuticas acuosas de bioconjungados de acuerdo con la reivindicación 22 que contienen  $\beta$ -ciclodextrina a 1.5% p/v.  
15          24. Formulaciones farmacéuticas acuosas de bioconjungados de acuerdo con las reivindicaciones 17-21 que contienen glucosa.  
20          25. Formulaciones farmacéuticas acuosas de bioconjungados de acuerdo con la reivindicación 24 en una solución de glucosa a 5% p/v.

Fig. 1

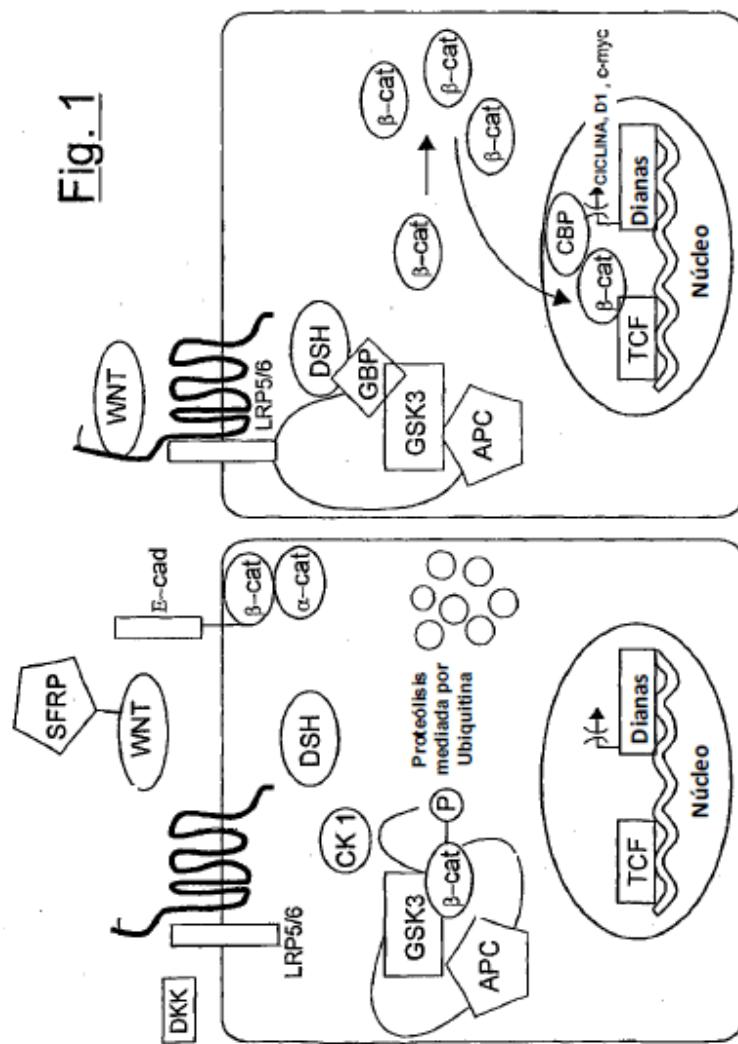


Fig. 2

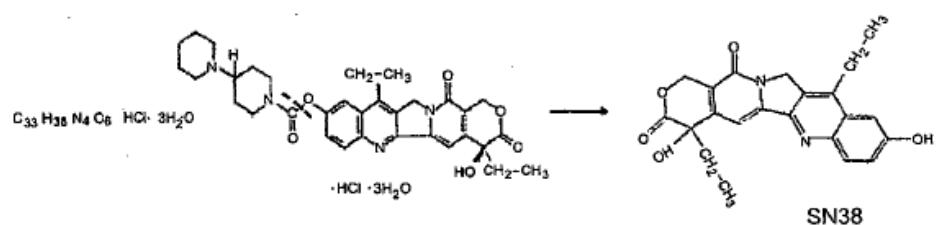


Fig. 3

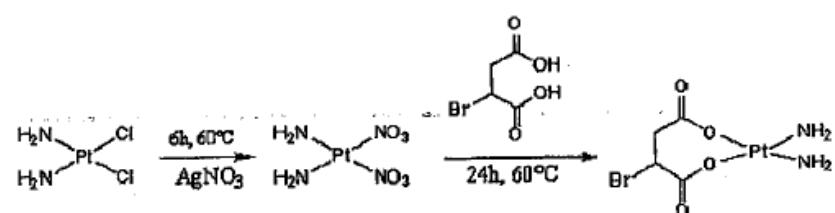
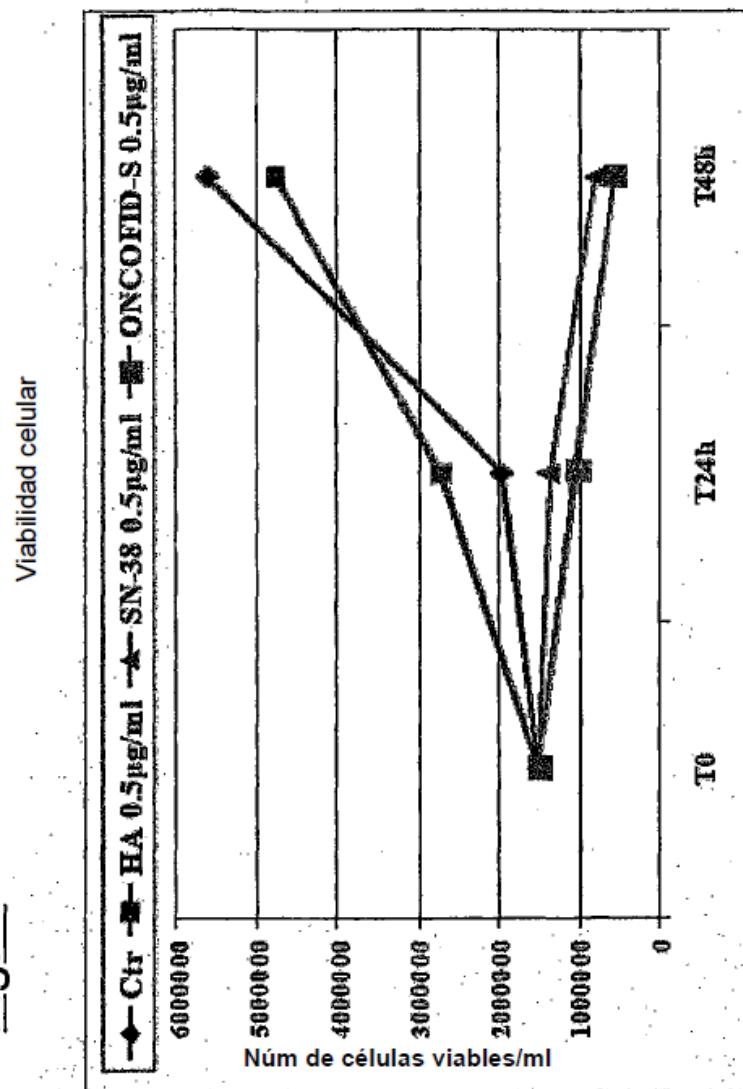


Fig. 4



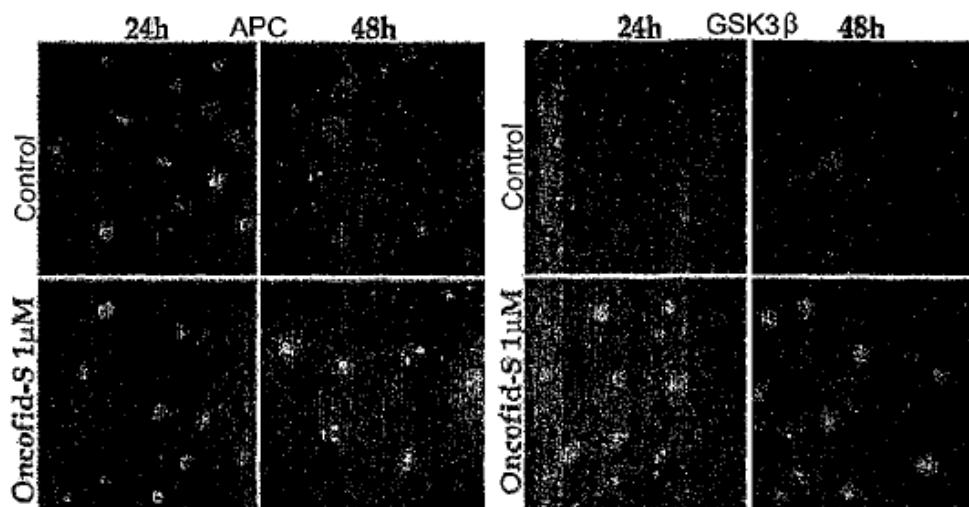


Fig. 4a

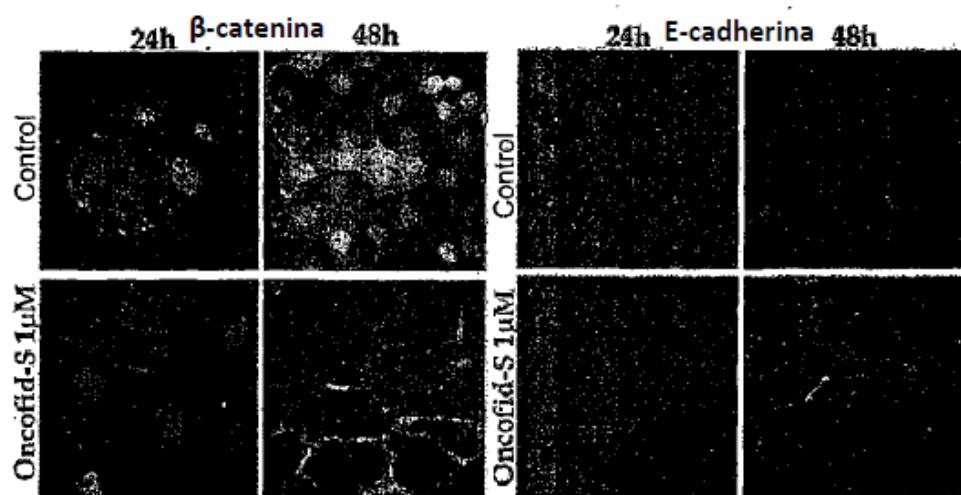


Fig. 4b

Fig. 5

48h de tratamiento

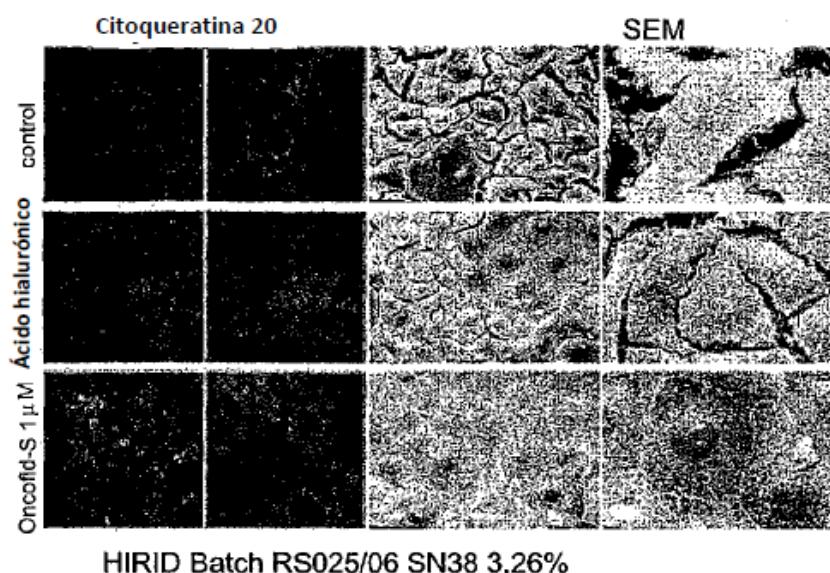


Fig. 6

% de células que sobreviven contra control

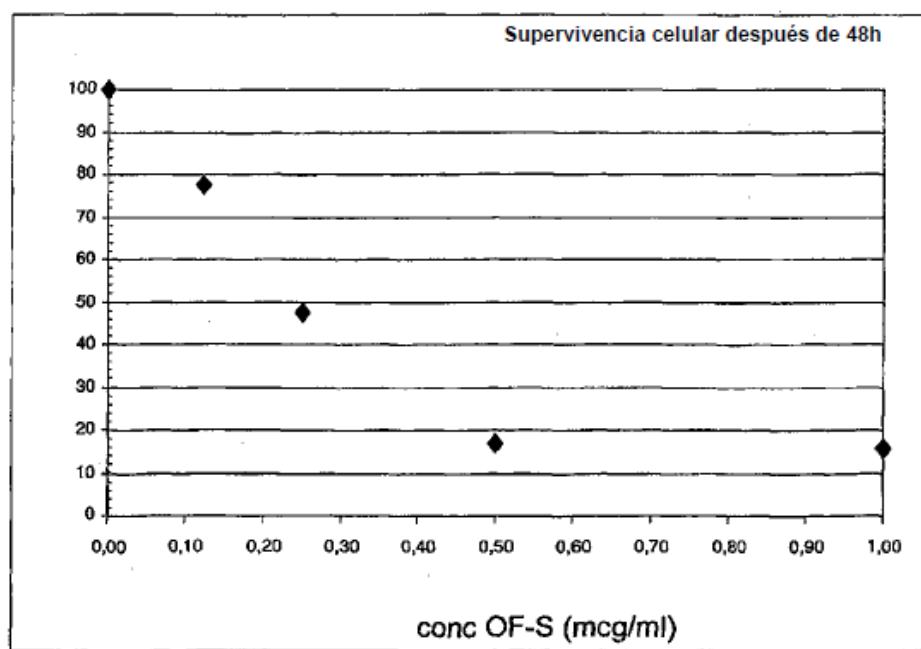


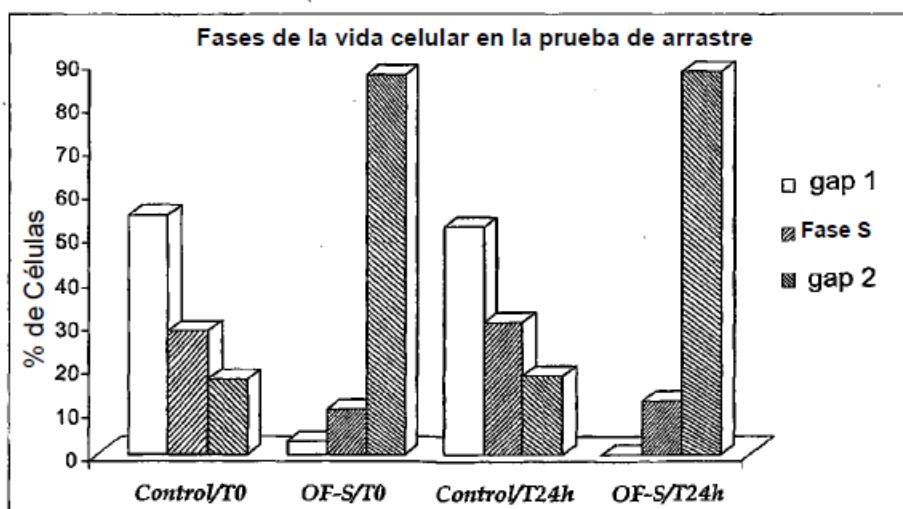
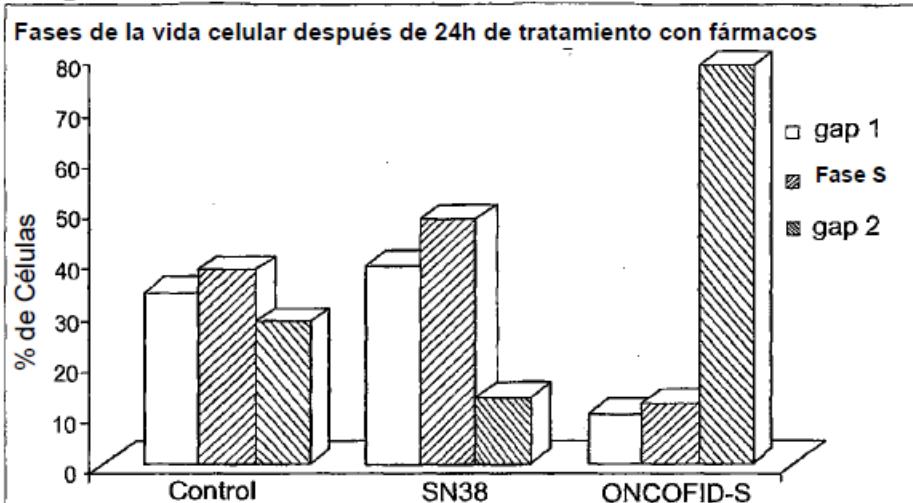
Fig. 7Fig. 8

Fig. 9

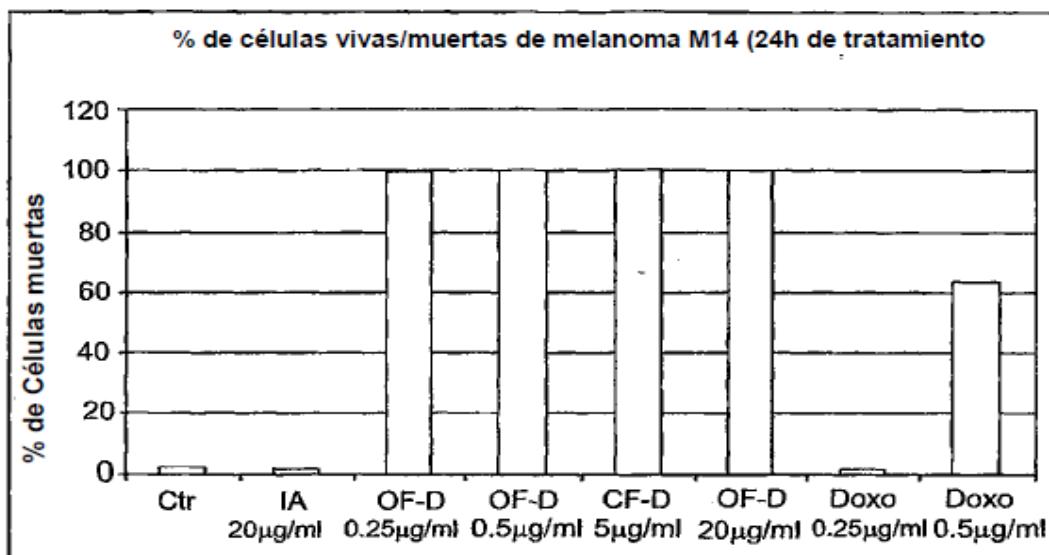


Fig. 10

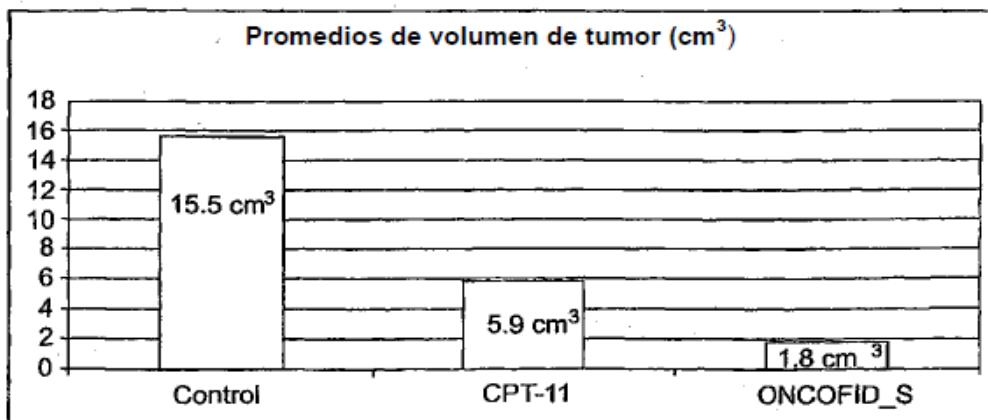


Fig. 11

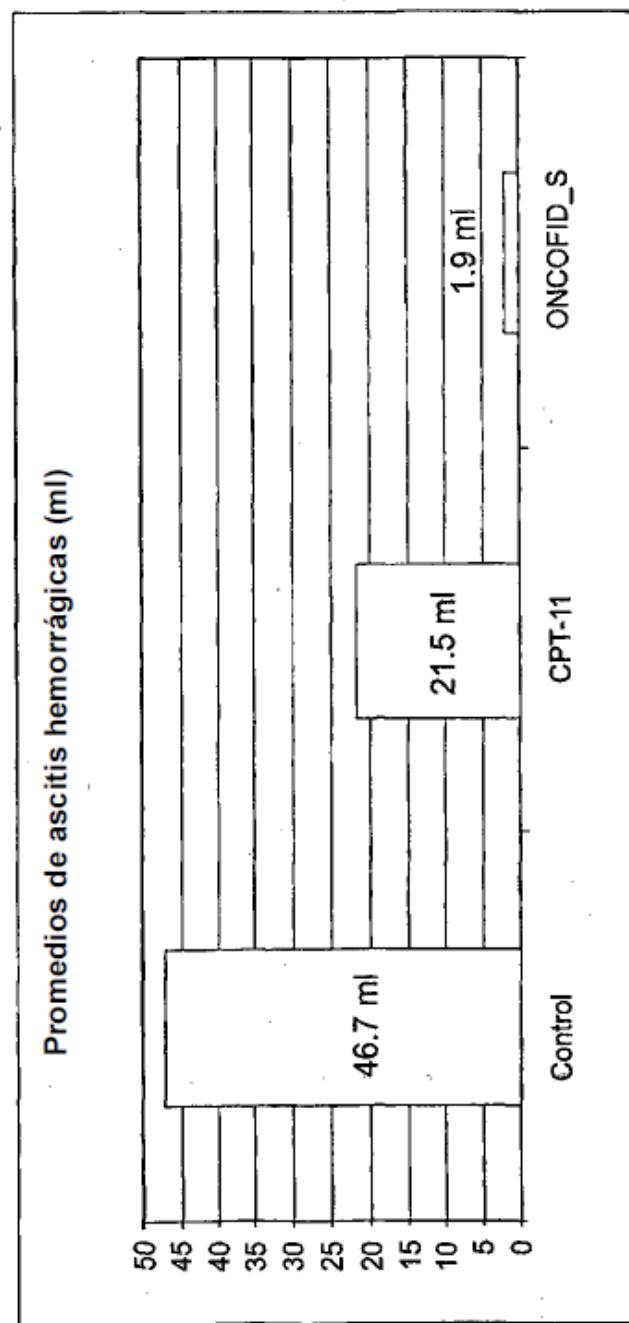


Fig. 12

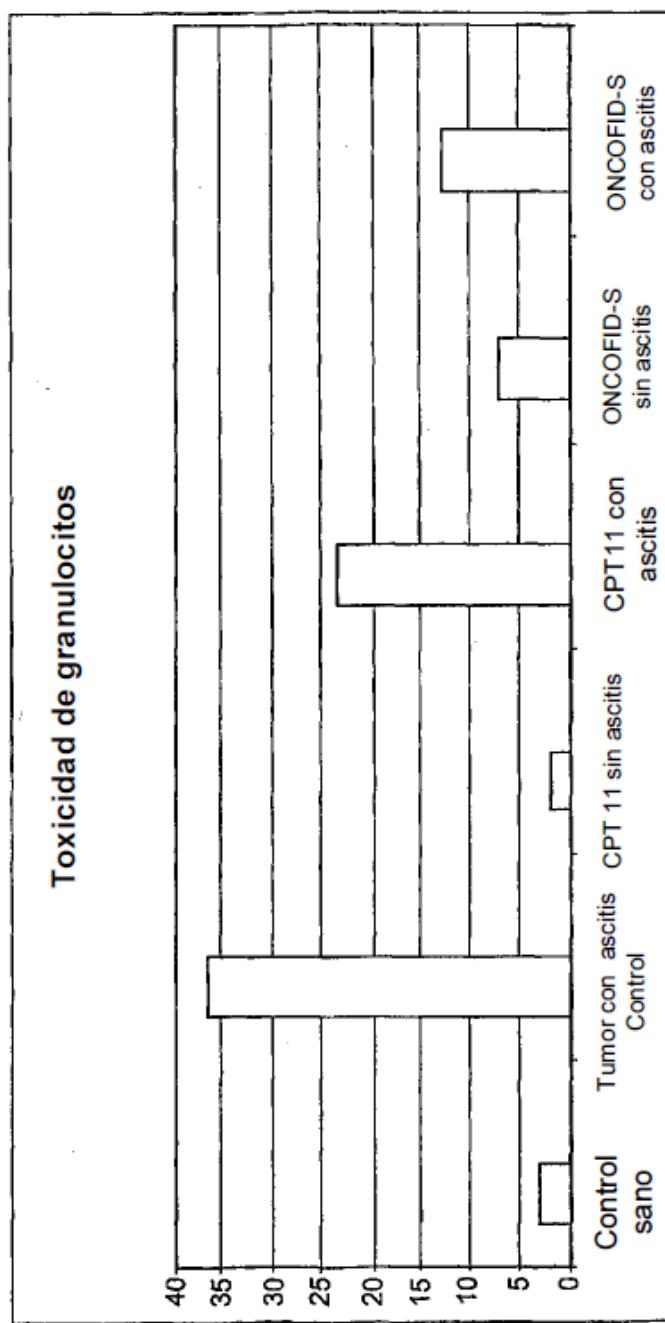


Fig. 13

