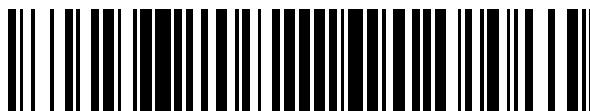


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 481**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2003 E 08169661 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2045270**

54 Título: **Taxanos unidos covalentemente a ácido hialurónico**

30 Prioridad:

18.10.2002 IT PD20020271

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

31.08.2015

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
VIA PONTE DELLA FABBRICA 3-A
35031 ABANO TERME (PADOVA), IT**

72 Inventor/es:

**DE LUCA, GILDA;
MARINI BETTOLO, RINALDO y
MIGNECO, LUISA MARIA**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 544 481 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

Taxanos unidos covalentemente a ácido hialurónico

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a taxanos, en particular paclitaxel y docetaxel, unidos covalentemente a ácido hialurónico, al proceso para su preparación y a su uso en el campo de oncología, en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y restenosis.

[0002] También se describen taxanos unidos covalentemente a derivados de ácido hialurónico.

Estado de la técnica

[0003] Los taxanos, en particular paclitaxel y docetaxel, actualmente comercializados con los nombres comerciales Taxol® y Taxotere®, son agentes anti-cáncer (Huizing M.T. et al., Cancer Inv., 1995, 13: 381-404) que ejercen su efecto anti-proliferador por medio de actuación sobre la organización de los microtúbulos en el sistema de citoesqueleto celular. De hecho, por medio de la inhibición de la despolarización de dichos microtúbulos, evitan su reorganización dinámica normal que tiene lugar durante la división de células mitóticas (Manfredi J.J. et al., J. Cell Biol., 1982, 94:688-696).

[0004] Las principales indicaciones terapéuticas de paclitaxel son:

- terapia para cáncer de mama avanzado;
- terapia para sarcoma de Kaposi;
- terapia para carcinoma de pulmón (no microcitoma)
- carcinoma de ovario, resistente al tratamiento de quimioterapia convencional.

[0005] Además, también se usa dicha quimioterapia para tratar carcinoma de vejiga, próstata y endometrio.

[0006] Debido a que paclitaxel es insoluble en agua, se mezcla con Cremophor® EL (aceite de ricino) – alcohol etílico en una proporción de 1:1, en las composiciones farmacéuticas que se usan actualmente en quimioterapia contra el cáncer (Pfeifer R. W. et al., Am. J. Hosp. Pharm., 1993, 50:2520-2521). Normalmente, esta formulación se usa para infusión continua intravenosa (entre 3 y 24 horas) a una dosificación de 135-175 mg/m².

[0007] La presencia de Cremophor® EL en la formulación mencionada anteriormente es la causa principal de reacciones adversas que normalmente tienen lugar durante la administración de paclitaxel, que varían desde ataques simples de urticaria a disnea y broncoespasmo, e incluso choque anafiláctico (Weiss, R. B. et al., J. Clin. Oncol., 1990, 8: 1263-1268).

[0008] Por este motivo, cualquier paciente que se disponga a recibir el tratamiento con una composición farmacéutica de paclitaxel Cremophor® EL debe seguir en primer lugar un protocolo de pre-medicación, con la administración de dexametasona, posiblemente asociada con una antihistamina.

[0009] A pesar de estas precauciones, hasta 40 % de los pacientes que reciben infusión intravenosa de paclitaxel todavía experimentan reacciones adversas más o menos graves.

[0010] Por tanto, se puede decir que la formulación de Taxol® que se encuentra actualmente en uso clínico, y los métodos usados para la administración de la misma, constituyen una limitación a su eficacia. Este es el motivo por el cual se está desarrollando investigación en busca de la síntesis de nuevas formulaciones farmacéuticas y hacia nuevas formulaciones químicas del fármaco anticáncer anterior, que sean solubles en agua.

[0011] Por ejemplo, los investigadores han intentado encapsular paclitaxel en liposomas, nanocápsulas y microesferas constituidas por una pared polimérica formada por co-polímeros biodegradables, tales como ácido poliláctico y co-polímeros no biodegradables, tales como etileno-vinilo-acetato.

[0012] Además, se han preparado microesferas que se cargan con paclitaxel formado por un polímero biodegradable, tal como polifosfoéster, con el fin de crear un sistema para la liberación retardada de un fármaco en el sitio de tratamiento en la terapia para el carcinoma de pulmón (Nuijen, B. et al., Investigational New Drugs, 2001, 19: 143-153).

[0013] También han llevado a cabo intentos para preparar micelas de dicho fármaco anti-cáncer por medio de precipitación de paclitaxel en un disolvente orgánico con sales de fosfatidilcolina/bilis (Nuijen, B. et al., Investigational New Drugs, 2001, 19: 143-153).

[0014] No obstante, estos nuevos sistemas para el encapsulado de paclitaxel pueden resultar problemáticos con respecto a la estabilidad, producción y reproducibilidad.

[0015] Además, se han llevado a cabo diversos intentos para disolver el fármaco con ciclodextrina, pero las nuevas formulaciones no aportaron los resultados deseados (Nuijen, B. et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19: 143-153).

[0016] La investigación clínica de nuevas formulaciones de paclitaxel que convierte el fármaco en más soluble en agua al tiempo que mantiene su eficacia como agente anti-cáncer, ha conducido a la síntesis de nuevos análogos modificados en las posiciones C2' y C7 (solicitud de patente de Estados Unidos N° 2001/0018531) así como también a la preparación de nuevos profármacos. Los profármacos son derivados del fármaco terapéuticamente inertes que se activan tras la introducción en el cuerpo. Una vez allí, tras procesos de hidrólisis espontánea y/o degradación enzimática, se libera el principio activo.

[0017] A la vista de esto, y por los motivos anteriormente mencionados, se han llevado a cabo muchos intentos para sintetizar nuevos profármacos que han conducido, por ejemplo, a la preparación de fármacos tales como acetil-paclitaxel (Mellado, W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 124(2): 329-336) o a la síntesis de nuevos ésteres de dicho fármaco con ácido succínico, glutárico y sulfónico sobre el carbono de la posición C2'. Se demostró, no obstante, que estos ésteres eran inestables en un entorno acuoso.

[0018] Además, se han sintetizado algunos derivados con un grupo éster de fosfonoxifenilpropionato en la posición C2' o C7, tales como paclitaxel-2'-carbonato, y una serie de nuevos ésteres de amino ácido de paclitaxel y sus derivados, con un grupo glutarilo en la posición C2'.

[0019] Se ha demostrado que glutaril-paclitaxel asparagina y glutaril-paclitaxel glutamina son los dos productos más solubles en agua obtenidos por medio del tipo de síntesis descrita anteriormente, pero son menos eficaces que paclitaxel por sí mismo (Nuijen, B. et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19: 143-153).

[0020] También se sabe que se ha esterificado paclitaxel con ácido poli-L-glutámico para formar un nuevo derivado soluble en agua de dicho fármaco de quimioterapia, con una semi-vida en plasma significativamente más elevada que paclitaxel no conjugado (LiC et al., *Cancer Research*, 1998, 58(11): 2404-2409).

[0021] También se ha derivatizado paclitaxel con PEG (polietilenglicol) por medio de esterificación del fármaco de quimioterapia en la posición C2'; no obstante, se ha demostrado que la nueva molécula es altamente soluble pero no muy estable.

[0022] Finalmente, se ha desarrollado recientemente un nuevo sistema de administración para el fármaco, por medio de la conjugación de paclitaxel con albúmina de suero humano (HSA). Se ha demostrado que el conjugado de paclitaxel-HSA es muy soluble en agua y capaz de transportar hasta 30 moléculas de fármaco de quimioterapia. No obstante, los experimentos llevados a cabo *in vitro* han mostrado que es menos eficaz frente al cáncer que paclitaxel por sí mismo (Nuijen, B. et al., *Investigational New Drugs*, 2001, 19: 143-153).

[0023] Recientemente, los investigadores han sintetizado un nuevo sistema de administración de paclitaxel esterificado con ácido hialurónico previamente modificado (en lo sucesivo denominado "HA"), haciendo reaccionar HA con moléculas de hidrazida ligadas al grupo carboxilo de HA por medio de un enlace amida (Luo Y et al., *Biomacromolecules* 2000, 1(2): 2008-218; patente de Estados Unidos N° 5.874.417). Este nuevo sistema de administración de paclitaxel permite que el fármaco vaya directamente a la superficie de la membrana de la célula cancerígena diana, caracterizada por la sobre-expresión del receptor para HA, CD44. Por consiguiente, se demuestra que paclitaxel ligado a HA funcionalizado con una hidrazida es capaz de unirse específicamente a CD44 de la célula cancerígena, y de este modo permite (gracias a un proceso de endocitosis) la entrada en el citoplasma celular, donde se puede liberar enzimáticamente y activar, desbloqueando su inhibición de la despolarización de tubulina y, por tanto, la división celular. Este mecanismo de transporte selectivo del fármaco se denomina "establecimiento de dianas celulares".

[0024] Además, se sabe que HA se puede usar como vehículo para fármacos anti-cáncer en composiciones farmacéuticas en las cuales HA se asocia con (y no se une covalentemente a) fármacos de quimioterapia, tales como paclitaxel, para aumentar su eficacia terapéutica gracias al fenómeno de establecimiento de dianas descrito anteriormente (Solicitud de Patente Internacional N° WO 00/41730) y para permitir la rebaja de las dosis comúnmente especificadas en los protocolos normales de quimioterapia (Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/02151).

[0025] Finalmente, se conoce el uso de HA de bajo peso molecular y sus derivados de lípido para preparar liposomas usados para la administración de fármacos, incluyendo fármacos anti-cáncer tales como paclitaxel (Solicitud de Patente Internacional N° WO 01/39815).

[0026] A la vista de lo anterior, todavía se percibe la necesidad de nuevos derivados de taxanos, que sean estables y solubles en agua, y terapéuticamente tan eficaces al menos como los son los taxanos no modificados.

Sumario de la invención

[0027] Ahora el solicitante ha encontrado que la unión de taxanos a HA o derivados de HA, mediante un espaciador, da lugar a la obtención de productos estables y solubles en agua, útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores, trastornos autoinmunitarios y restenosis.

[0028] Por tanto, es un objetivo de la invención un taxano unido covalentemente a HA, en el que el enlace covalente se forma indirectamente entre el taxano y ácido hialurónico mediante un espaciador, estando seleccionado dicho espaciador entre el grupo que consiste en cadenas lineales alifáticas sustituidas con uno o más grupos amino y más de un grupo carboxilo, en el que el enlace covalente entre el grupo amino del espaciador y los grupos carboxilo del ácido hialurónico es un enlace amida, y el enlace covalente entre los grupos hidroxilo del taxano y el grupo carboxilo del espaciador es un enlace de éster, en el que el porcentaje de enlace entre ácido hialurónico y taxano se encuentra entre 0,1 % y 35 %, y en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular entre 400 y 230.000 Dalton.

[0029] La presente invención además se refiere a procesos para la preparación de taxanos unidos covalentemente a HA.

[0030] Otro objetivo de la invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden como sustancia activa al menos un taxano unido covalentemente a HA, y su uso en el tratamiento de tumores, trastornos autoinmunitarios y restenosis.

[0031] Los presentes taxanos unidos covalentemente a HA pueden tener muchas ventajas, que se puede resumir como se muestra a continuación:

- 1) son solubles en el torrente sanguíneo de forma instantánea;
- 2) no se requiere la mezcla con Cremophor® EL para la preparación de formulaciones, solucionando de este modo los problemas anteriormente mencionados relativos a hipersensibilidad y anafilaxis;
- 3) gracias a la acción enzimática de las enzimas tales como esterases comúnmente presentes en el plasma, los taxanos se liberan de forma instantánea por medio de su vehículo de HA o derivado de HA a partir de las presentes composiciones en la sangre, donde pueden desarrollar libremente su actividad anti-cáncer;
- 4) permiten la obtención de nuevo fármaco que, en el caso de determinados tipos de cáncer, pueden ejercer una actividad de quimioterapia sorprendente que es significativamente mayor que la que se obtiene cuando se administra un taxano que no está conjugado, cuando se consideran las mismas dosis de fármaco.

Breve descripción de los dibujos

[0032]

La Figura 1 muestra el porcentaje de supervivencia tras el implante de células neoplásicas como se describe en el Ejemplo 1 para los controles (histograma negro) y para ratones que recibieron paclitaxel (histograma gris) y paclitaxel unido covalentemente a un éster de HA con 16 % de esterificación (histograma blanco) preparado como en el Ejemplo 7.

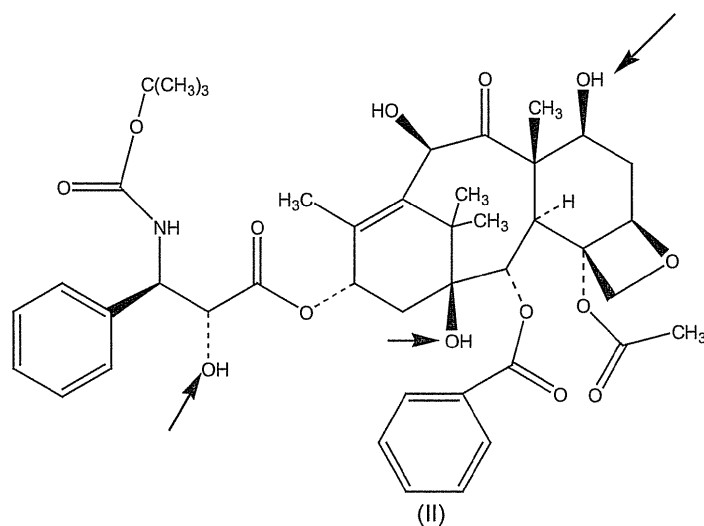
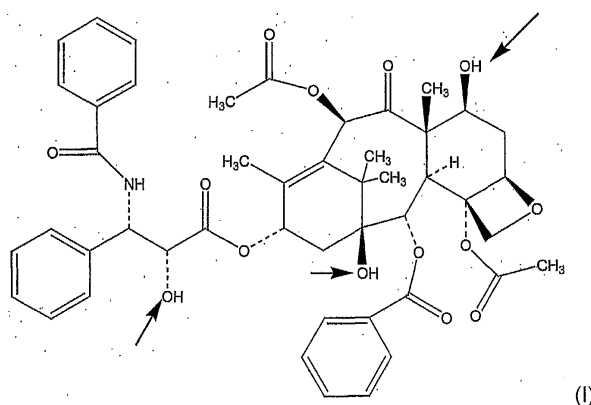
La Figura 2 muestra la potencia farmacológica expresada como IC₅₀ y resultante de los experimentos del Ejemplo 2, de paclitaxel ligado covalentemente a derivados de éster de HA que tienen una esterificación de 16 % (histograma gris), 22 % de esterificación (histograma negro) y 6,8 % de esterificación (histograma blanco) para cuatro estirpes celulares de cáncer de mama, frente a paclitaxel de producto de referencia.

La Figura 3 muestra el porcentaje de supervivencia tras el implante de células neoplásicas como se describe en el Ejemplo 3, en ratones de control (línea discontinua) y en ratones que recibieron gel de ACP® (línea continua).

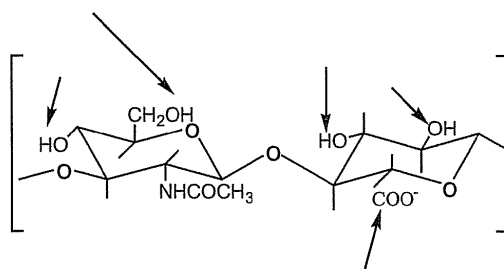
La Figura 4 muestra el porcentaje de paclitaxel ligado covalentemente a un éster de HA preparado como se describe en el Ejemplo 7, liberado en plasma humano como se describe en el ensayo del Ejemplo 13, frente a tiempo.

Descripción detallada de la invención

[0033] La presente invención describe compuestos que pertenecen a la familia de taxanos, preferentemente paclitaxel y docetaxel, en lo sucesivo representados por medio de las fórmulas (I) y (II), respectivamente, ligados covalentemente a HA o derivados de HA, preferentemente mediante un espaciador como interfaz entre el componente de taxano y HA o el derivado de HA, ligado covalentemente a ambas moléculas.



- 5 **[0034]** HA es un hetero-polisacárido formado por residuos alternos de ácido G-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que tiene la siguiente unidad de repetición:

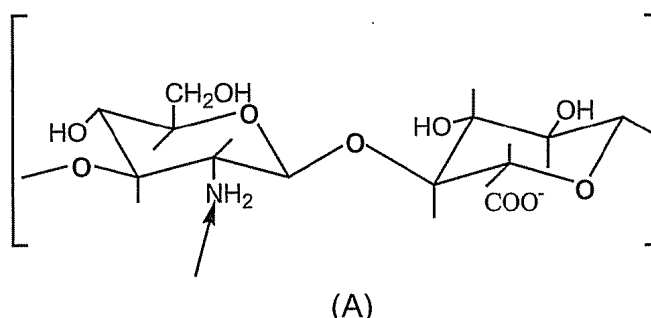


- 10 **[0035]** HA es un polímero de cadena lineal con un peso molecular que puede variar entre 50.000 y 13×10^6 Da, de acuerdo con su fuente y el método usado para su obtención. Está presente en la naturaleza en los geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conectivo en organismos vertebrados (de los cuales es uno de los componentes principales), en el fluido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo y en el cordón umbilical.
- 15 HA juega un papel importante en el organismo biológico, como soporte mecánico para las células de muchos tejidos tales como piel, tendones, músculos y cartílago. Es el componente principal de la matriz extracelular, pero tiene otras funciones, tales como la hidratación de tejidos, lubricación y migración celular y diferenciación.

- 20 **[0036]** El HA usado en la presente invención se puede extraer a partir de cualquier fuente, por ejemplo a partir de cresta de gallo, o se puede obtener por medio de una ruta de fermentación, o mediante medios tecnológicos, o puede tener un peso molecular de entre 400 y 3×10^6 Da, en particular entre 400 y 1×10^6 Da, y preferentemente, entre 400 y 230.000 Da.

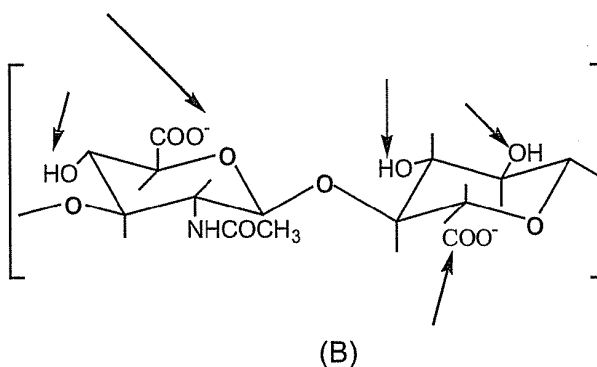
[0037] Preferentemente, los derivados de HA están seleccionados entre el grupo que consiste en los siguientes derivados de HA:

- HA salificado con bases orgánicas y/o inorgánicas;
- 5 - Hyaff®: ésteres de HA con alcoholes de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un grado de esterificación que puede variar de acuerdo con el tipo y longitud del alcohol usado, y que no es en ningún caso superior a 50 % de esterificación, y preferentemente entre 0,1 y 20 %, ya que el polímero final que se obtiene debe ser siempre soluble en agua, al tiempo que el porcentaje restante de HA no esterificado se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas, como se divulga en la patente de Estados Unidos N° 4.851.521, incorporada por referencia en el presente documento;
- 10 - Hyadd®: amidas de HA con aminas de las series alifáticas, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación de entre un 0,1 y un 10 %, ya que el polímero final debe siempre ser soluble en agua, al tiempo que el porcentaje restante de HA que no está amidado se puede salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas, como se divulga en la solicitud de patente Europea N° 1095064, incorporada por referencia en el presente documento;
- 15 - derivados de HA O-sulfatados hasta el 4º grado de sulfatación, como se divulga en la patente de Estados Unidos N° 6.027.741, incorporada por referencia en el presente documento;
- ACP®: ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación de no más que un 15 %, ya que el polímero debe ser siempre soluble en agua, preferentemente entre un 0,05 y un 10 % de esterificación, al tiempo que el porcentaje restante de HA no esterificado se puede esterificar con bases orgánicas y/o inorgánicas, como se divulga en la patente Europea N° 0341745B1 incorporada por referencia en el presente documento;
- 20 - desacetilatos de HA: estos proceden de la desacetilación de la unidad de N-acetil-glucosamina con un porcentaje de desacetilación preferentemente entre un 0,1 y un 30 %, al tiempo que todos los grupos carboxílicos de HA se pueden salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas, como se ilustra en la siguiente estructura (A):



Los desacetilatos de HA se divulgan en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 02/18450, que los inventores incorporan por referencia en el presente documento;

- 30 - Hyoxx™: derivados de HA percarboxilados obtenidos por medio de oxidación del hidroxilo primario de la unidad de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación de entre un 1 y un 100 %, preferentemente entre un 25 y un 75 %. Todos los grupos carboxílicos de HA se pueden salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas como se ilustra en la siguiente estructura (B):



[0038] Preferentemente, los derivados de HA se divulgan en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US2003181689.

[0039] Además, los presentes compuestos en los cuales un taxano, y en particular paclitaxel, se encuentra ligado covalentemente a un éster de HA, se pueden obtener partiendo de moléculas de HA no modificado químicamente y, únicamente tras la síntesis con el fármaco de quimioterapia, modificando el HA por medio de esterificación con todos

los alcoholes listados anteriormente para los productos de Hyatt®, o por medio de la formación de ésteres internos como en el caso de ACP® (véase Ejemplo 8).

[0040] Los derivados de HA comentados anteriormente, que son particularmente importantes en el proceso de síntesis del profármaco HA-taxano, y en particular del profármaco HA-paclitaxel, son los derivados desacetilados y sulfatados, ya que al mismo valor de porcentaje de paclitaxel ligado al ácido hialurónico previamente no modificado, dan lugar a un producto final más soluble en el torrente sanguíneo.

[0041] Se sabe que, por medio del receptor de membrana CD44, HA modula muchos procesos diferentes relativos a la fisiología y biología celulares tales como la proliferación, diferenciación y locomoción de células cancerígenas y otras células.

[0042] La bibliografía científica ha demostrado recientemente la eficacia de HA frente al cáncer, cuando se inyecta HA como tal, directamente en la proliferación del cáncer. Se ha demostrado que es capaz de determinar la regresión completa de un 30 % de los tumores (Herrer Gayol, A. et al., *Experimental and Molecular Pathology*, 2002, 72:179-185).

[0043] También se sabe que HA se puede asociar con cualquier fármaco de quimioterapia para preparar muchas composiciones farmacéuticas diferentes, ya que es capaz de actuar como segundo agente anti-neoplásico que mejora de manera sinérgica la acción anti-cáncer del fármaco asociado al mismo (Solicitud de Patente Internacional N° WO 01/47561); alternativamente, se reivindica HA en un fármaco anti-cáncer que se administra por sí mismo en diversos protocolos clínicos para la reducción/regresión de la proliferación de cáncer (Solicitud de Patente Internacional N° WO 97/40841).

[0044] El presente taxano ligado covalentemente a HA, como se ha comentado anteriormente, difiere de todas las formulaciones de taxanos, en particular el enlace covalente de paclitaxel con HA o derivados de HA, opcionalmente mediante un espaciador, que da lugar al paclitaxel soluble en agua, sin disminuir su eficacia farmacológica.

[0045] De hecho, el experimento *in vivo* descrito en el Ejemplo 1 claramente demuestra la misma eficacia anti-cáncer del presente paclitaxel conjugado y paclitaxel no conjugado, cuando se administran las mismas dosis.

[0046] Además, HA-paclitaxel puede presentar propiedades farmacológicas inesperadas que son diferentes de las de paclitaxel no conjugado, especialmente en el caso de determinados tipos de tumor.

[0047] De hecho, el Ejemplo 2 demuestra claramente que el presente derivado de éster de HA ligado a paclitaxel tiene una nueva actividad farmacológica antineoplásica: en el modelo de citotoxicidad *in vitro* descrito posteriormente, el HA-paclitaxel presenta una actividad anti-cáncer sorprendente que es bastante superior a la ejercida por el paclitaxel no conjugado solo.

[0048] Esta nueva propiedad antineoplásica significa que los presentes taxanos, en particular paclitaxel, conjugados con HA o derivados de HA, se pueden usar para la preparación de composiciones farmacéuticas útiles como fármaco de quimioterapia, no solo para el tratamiento de todas las formas de tumores para las cuales se administra Taxol®, sino también para otras formas de tumor que normalmente no se tratan con Taxol®, tales como cáncer de estómago e hígado, cáncer de colon, melanoma y leucemia. Además, se pueden usar en trastornos autoinmunitarios sistémicos tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis autoinmunitaria y, finalmente, tiroiditis de Hashimoto.

[0049] El uso de los presentes productos en una nueva terapia farmacológica para las patologías anteriormente mencionadas es posible debido a que el nuevo compuesto de HA-paclitaxel reduce la toxicidad sistémica de Taxol®, aumentando de este modo la eficacia terapéutica del propio fármaco, ya que:

- es soluble en agua;
- no está asociado con Cremophor® EL y, por tanto, se encuentra libre de los efectos tóxicos que éste produce;
- es igualmente eficaz a dosis claramente menores que (o iguales que) las que se usan normalmente en los protocolos clínicos.

[0050] También se conoce el uso de paclitaxel como fármaco para su uso para inhibir el proceso de restenosis que generalmente sigue a las angioplastias (prevalentemente arteriales), derivación coronaria y trasplantes de órganos.

[0051] Los presentes taxanos, y en particular el paclitaxel, ligado covalentemente a HA también se pueden usar para evitar la restenosis o se pueden usar para formar un revestimiento interno para endoprótesis vasculares y dispositivos implantados tras las operaciones vasculares comentadas anteriormente, ya que se ha demostrado que es posible la unión química de los mismos a la superficie de dichas endoprótesis vasculares o para la absorción de los mismos a ellas.

[0052] En cualquier caso, el tiempo de residencia de los presentes productos sobre la superficie de la endoprótesis vascular, y por consiguiente su liberación gradual en el interior del torrente sanguíneo, es mayor que la de paclitaxel no conjugado, ya que sus características físico-químicas de HA favorecen una liberación progresiva, lenta pero continua de Taxol® desde la superficie del dispositivo.

[0053] Las composiciones farmacéuticas que comprenden los presentes taxanos ligados covalentemente a HA se pueden administrar de forma sistémica (por medio de rutas intravenosas o arteriales, intramusculares, intraperitoneales, subcutáneas u orales), se pueden usar para administración tópica (por medio de absorción transdérmica), o se pueden administrar directamente al interior del sitio de cáncer por medio de inyección.

[0054] HA ligado covalentemente a paclitaxel también puede actuar como fármaco anti-cáncer por sí mismo.

[0055] En el siguiente Ejemplo 3, el Solicitante demuestra el modo en que el tratamiento de proliferaciones tumorales inducidas experimentalmente en ratones atímicos con el derivado no reticulado de HA, ACP® determina una regresión significativa del tumor en comparación con los controles no tratados.

[0056] Por tanto, el solicitante describe por primera vez un nuevo papel de HA que constituyen los presentes productos de taxano-HA, como agentes anti-neoplásicos y sus usos relativos en el campo de la oncología.

[0057] Además, los presentes taxanos ligados covalentemente a HA pueden asociarse a diversas moléculas biológica y farmacológicamente activas tales como, por ejemplo, esteroides, hormonas, proteínas, factores tróficos, vitaminas, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, fármacos de quimioterapia, antagonistas de calcio, antibióticos, agentes anti-víricos, interleucinas y citoquinas tales como interferón.

[0058] De este modo, es posible obtener muchas asociaciones diferentes de los fármacos anteriormente mencionados y composiciones farmacéuticas relativamente diferentes que comprenden los taxanos de la invención.

[0059] La presente invención también se refiere al proceso de preparación de los presentes taxanos, en particular paclitaxel, ligado covalentemente a HA; se pueden lograr los presentes productos por medio de los siguientes procesos:

- 1) por medio de síntesis indirecta que implica la introducción de un espaciador entre el taxano y HA, o
- 2) por medio de síntesis directa entre el taxano y HA.

[0060] Los grupos funcionales de HA que pueden reaccionar con el taxano indirectamente mediante un espaciador, son los siguientes:

- 1) grupos hidroxilo;
- 2) grupos carboxilo;
- 3) grupos amino de HA desacetilado.

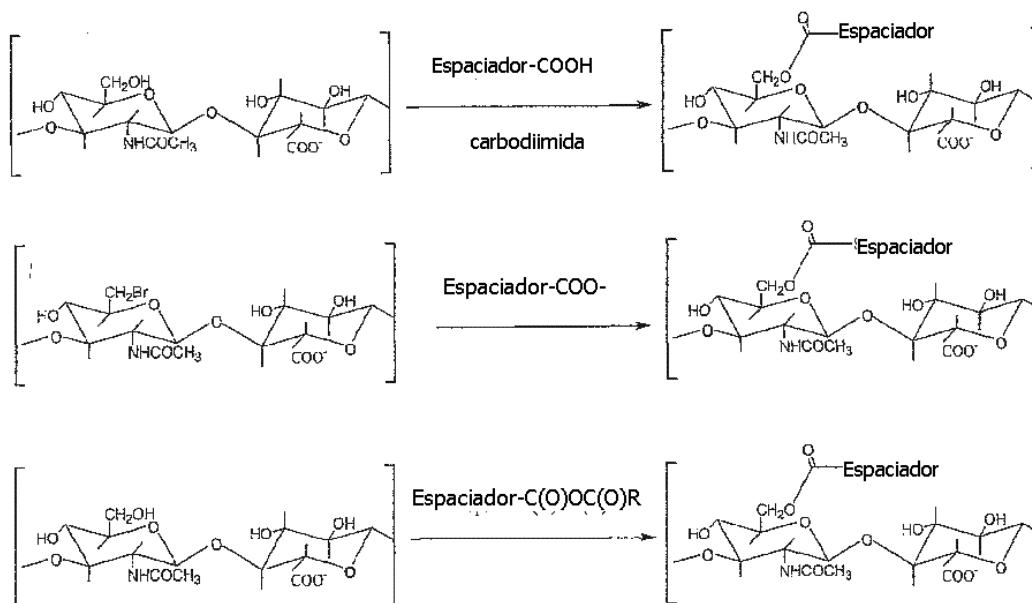
[0061] La reacción de síntesis entre los grupos funcionales hidroxílicos de HA y un componente de taxano tal como paclitaxel, se puede lograr por medio de un proceso de síntesis indirecta.

[0062] La síntesis indirecta puede conducir a la formación de los siguientes tipos de enlace covalente entre el espaciador y HA o los derivados de HA:

enlace de éster:

- que implica la función de carboxilo de un espaciador escogido de forma apropiada que se activa mediante un agente de activación tal como, por ejemplo, una carbodiimida (Esquema 1 siguiente);
- que implica los grupos hidroxilo de HA o un derivado de HA que experimentan bromación o sustitución con un grupo toxilo con sustitución nucleófila posterior por medio del carboxilo del espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 2 siguiente); o
- que implica la función de anhídrido de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 3 siguiente).

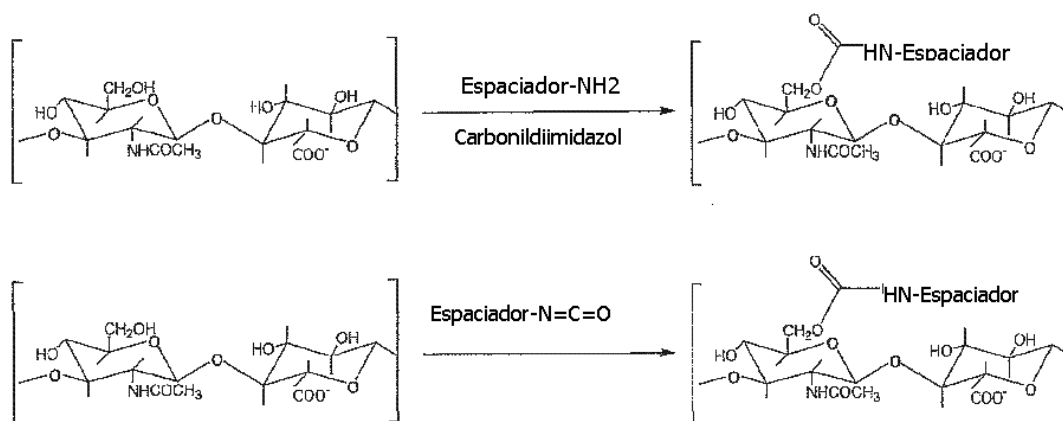
Esquemas 1-2-3



enlace de uretano o tiouretano:

- que implica el grupo amino de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 4 siguiente); o
- que implica la función isocianato o isotiocianato de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 5 siguiente).

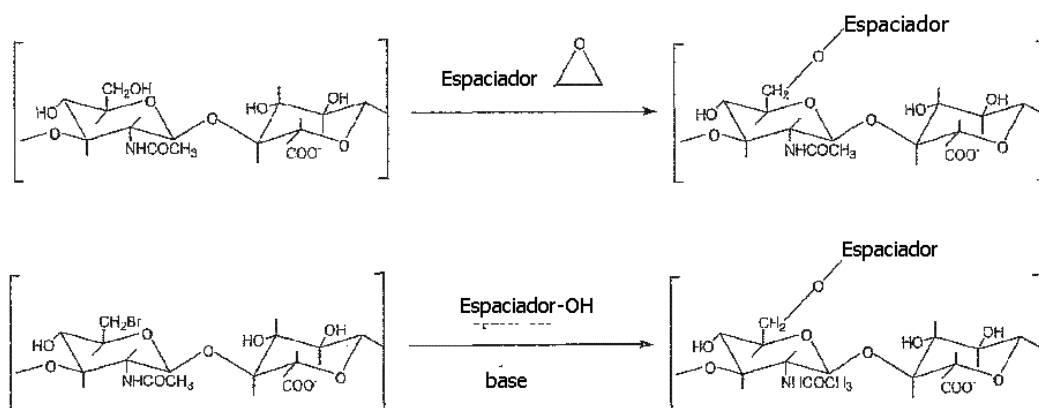
Esquema 4-5



enlace de éter:

- que implica la función epoxi del espaciador (escogido de forma apropiada) (Esquema 6 siguiente);
- que implica los grupos hidroxilo de HA o un derivado de HA que experimentan bromación o sustitución por medio de un grupo tosilo, con la sustitución nucleófila posterior por medio del grupo hidroxilo de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 7 siguiente).

Esquema 6-7

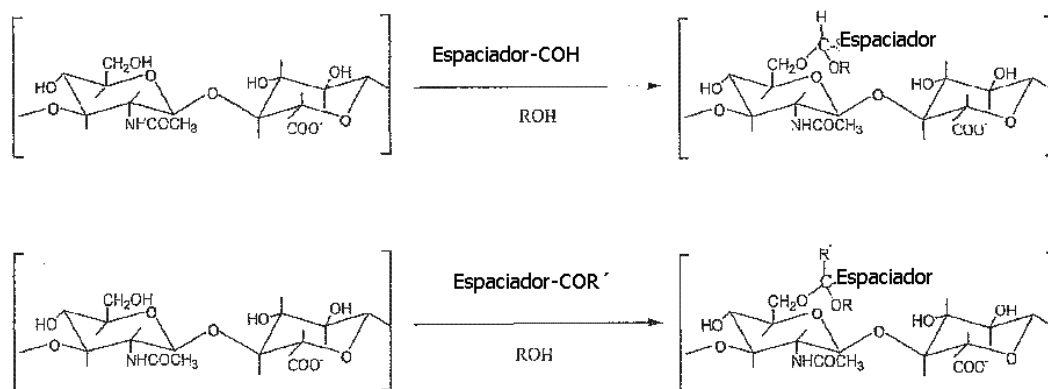


5 enlace de acetal o cetal:

- que implica el aldehído y/o grupo cetónico del espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 8 siguiente);
- que implica el grupo hidroxilo del espaciador escogido de forma apropiada y que requiere la presencia de un compuesto de carbonilo simple, tal como formaldehído (Esquema 9 siguiente).

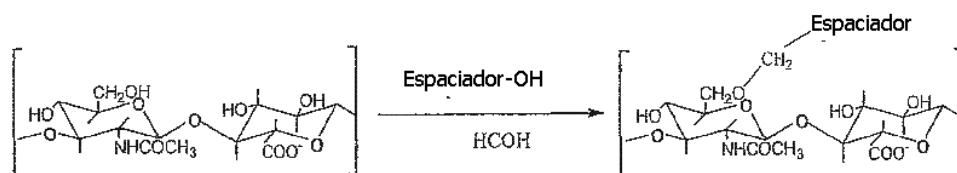
10

Esquema 8



15

Esquema 9



20 **[0063]** Se pueden llevar a cabo los procesos anteriormente mencionados usando agentes que activan el grupo hidroxilo de HA, por ejemplo seleccionados entre el grupo que consiste en carbonildiimidazol y di-(N-succimidil)carbonato.

25 **[0064]** La reacción de síntesis directa entre los grupos hidroxilo de HA o derivados de HA y un taxano tal como paclitaxel, puede conducir a la formación del tipo siguiente de enlace covalente:

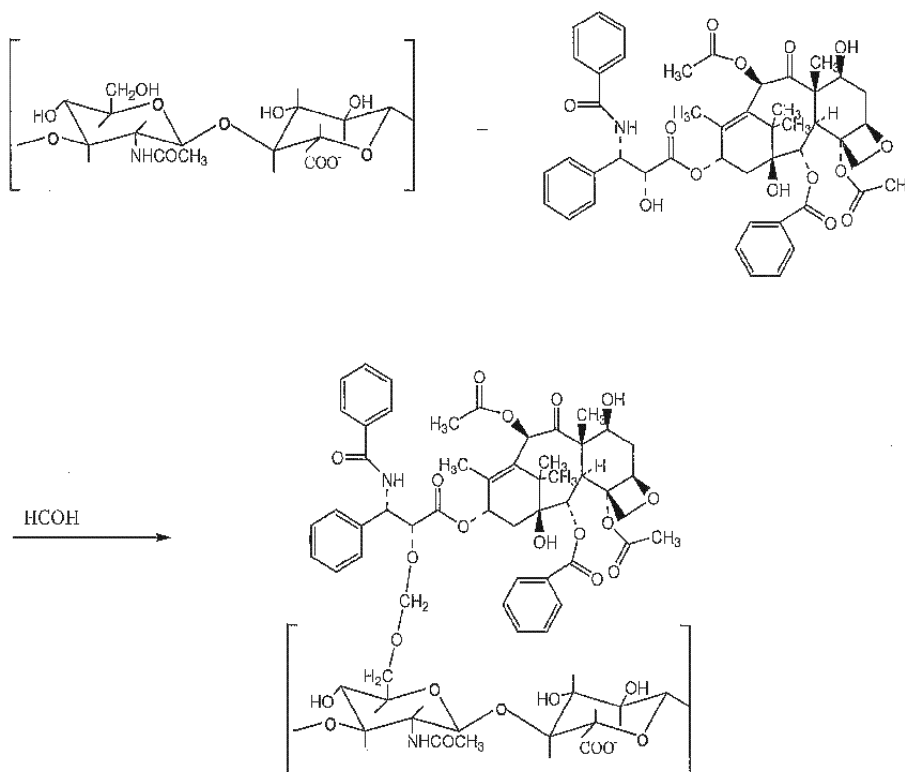
enlace de acetal:

- que implica el grupo hidroxilo del taxano y los grupos hidroxilo de HA o derivados de HA, que se unen covalentemente por medio de adición de un compuesto de carbonilo simple tal como un formaldehído

30

(Esquema 10).

Esquema 10



5

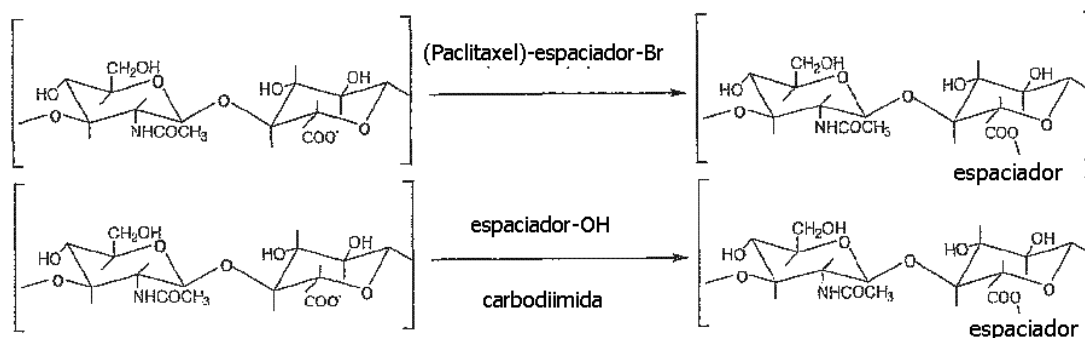
[0065] La reacción entre los grupos carboxilo de HA y un taxano tal como paclitaxel, se puede lograr por medio de un proceso de síntesis indirecta.

10 **[0066]** La síntesis indirecta puede conducir a la formación de los siguientes tipos de unión covalente entre el espaciador y HA o los derivados de HA:

enlace de éster:

- 15 - se activa el grupo carboxílico del espaciador escogido de forma apropiada, tal como ácido 4-bromobutírico, mediante un agente de activación tal como una carbodiimida y, de este modo, se hace posible para la síntesis con el grupo hidroxilo, del taxano (preferentemente sobre el carbono en la posición C2'), tal como paclitaxel. Posteriormente, por medio de contacto directo en un disolvente anhidro con una sal de amonio cuaternaria, en particular la sal de tetrabutilamonio (TBA) de HA o un derivado de HA, se obtiene una sustitución
- 20 nucleófila del carboxilo de HA o derivado de HA por el bromo del espaciador. De este modo, se forma un enlace de éster entre HA o derivado de HA y el espaciador, a su vez ligado a paclitaxel. Alternativamente, la sustitución nucleófila del grupo carboxilo de HA o derivado de HA por el bromo del espaciador puede tener lugar antes de la unión entre el propio espaciador y el taxano (Esquema 11 siguiente).
- 25 - por medio del uso de los agentes de activación del grupo carboxilo de HA o derivado de HA tal como carbodiimida, es posible obtener un enlace de éster entre dicho grupo y la función de hidroxilo del espaciador (escogido de forma apropiada), ligado previa o posteriormente a paclitaxel (Esquema 12 siguiente).

Esquema 11-12

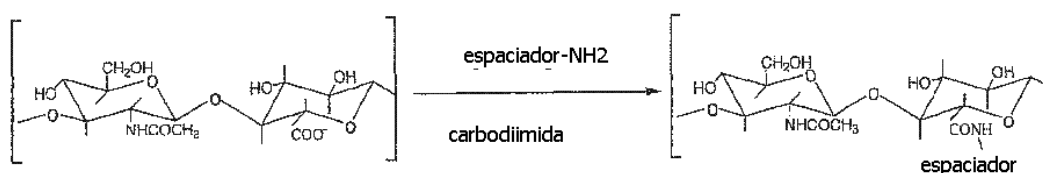


5 enlace de amida:

- la activación de los grupos carboxilo de HA mediante un agente de activación, permite una unión con el grupo amino del espaciador escogido de forma apropiada, con la excepción de todas las hidrazidas, ligadas previa o posteriormente a un taxano tal como paclitaxel (Esquema 13 siguiente).

10

Esquema 13



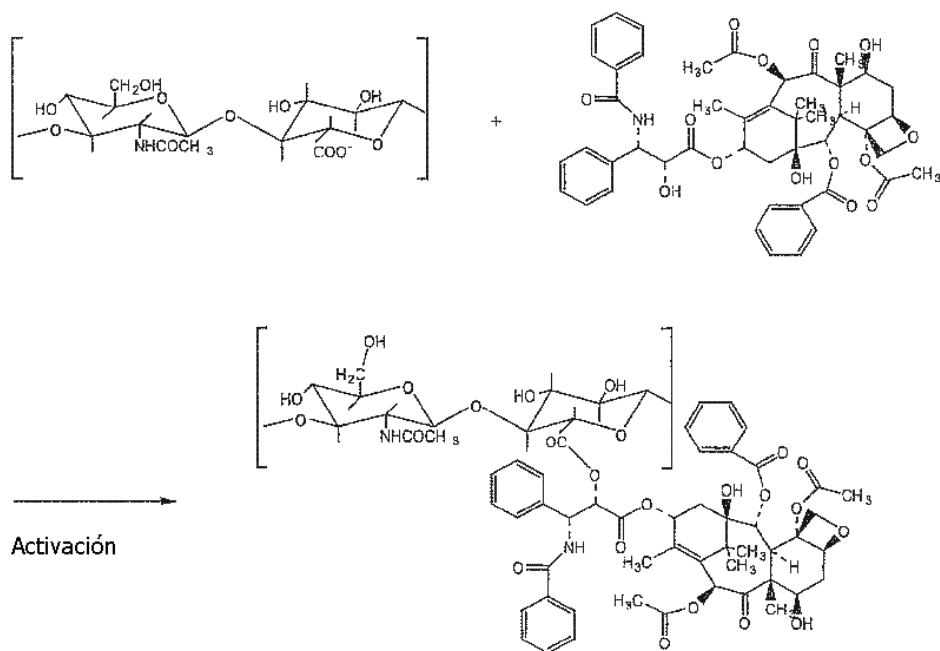
15 **[0067]** La síntesis directa puede conducir a la formación de los siguientes tipos de enlace covalente

enlace de éster:

20

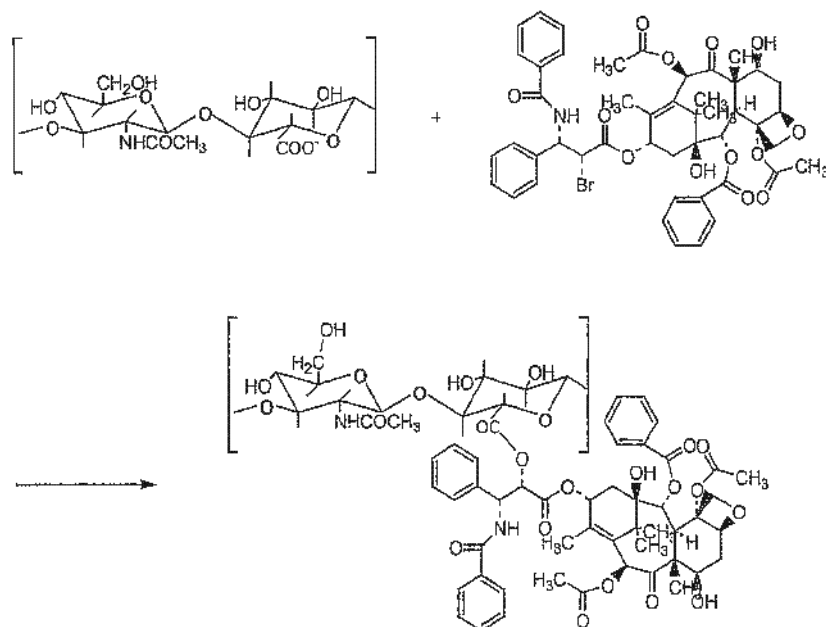
- la activación de los grupos hidroxilo de HA o derivados de HA mediante un agente de activación, permite su unión con el grupo hidroxilo del taxano (Esquema 14 siguiente);
- la activación del hidroxilo del componente de taxano por medio del agente de activación permite su unión con la función carboxílica de HA o uno de sus derivados (Esquema 14);

Esquema 14



- 5 - el siguiente tipo de enlace requiere el bromuro o tosilato del taxano. Dicho enlace se prepara por medio de sustitución nucleófila del bromuro o grupo tosilato por medio del grupo carboxilo de HA o derivado de HA (Esquema 15).

Esquema 15



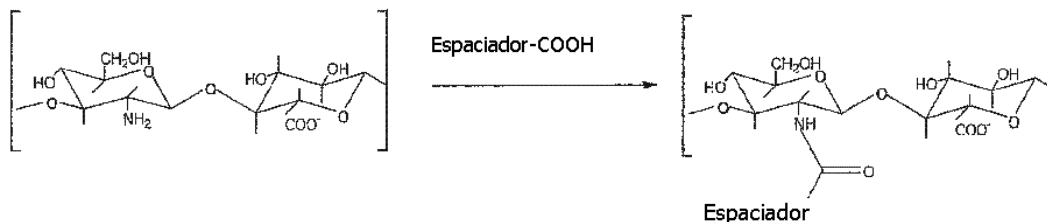
[0068] La reacción de síntesis entre los grupos amino de HA desacetilado y un componente de taxano, tal como paclitaxel puede tener lugar por medio de un proceso de síntesis directa o indirecta.

[0069] La síntesis indirecta puede conducir a la formación de los siguientes tipos de enlace covalente entre el espaciador y HA:

enlace de amida:

- que implica el grupo carboxílico de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 16);

Esquema 16



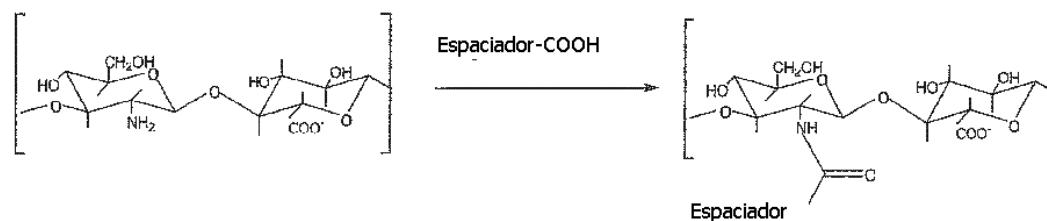
5

enlace de uretano o tiouretano:

- que implica el grupo hidroxilo o tiólico de un espaciador escogido de forma apropiada (Esquema 17).

10

Esquema 17

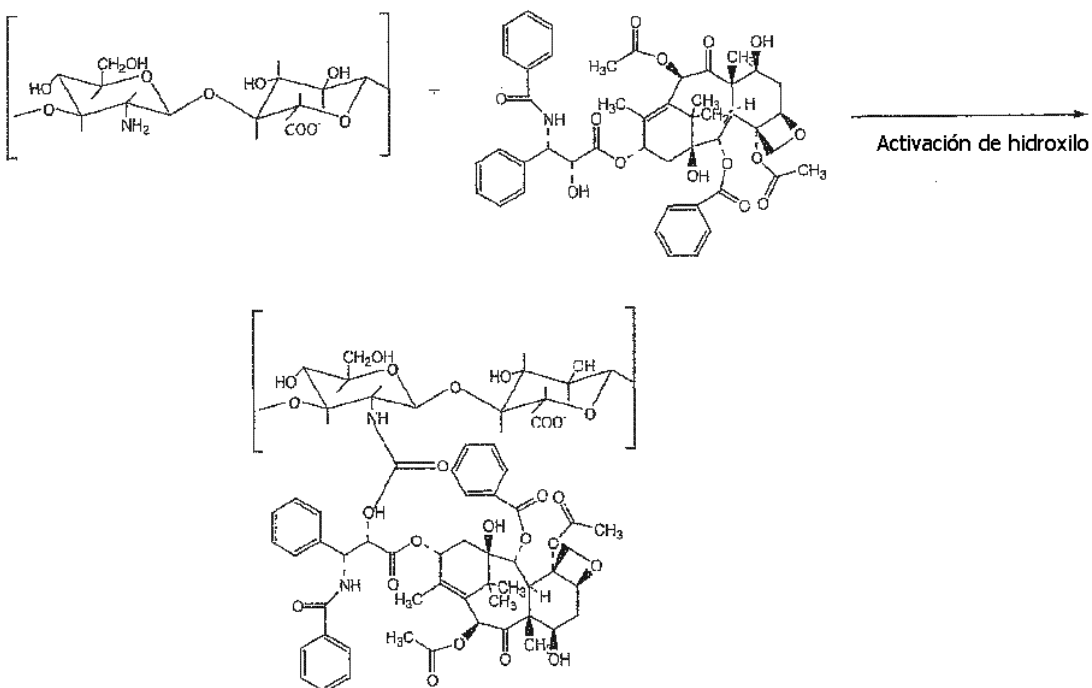


[0070] La síntesis directa puede conducir a la formación del siguiente tipo de enlace covalente: enlace de uretano:

15

- que implica el grupo hidroxilo de taxano y la función amino de HA desacetilado (Esquema 18).

Esquema 18

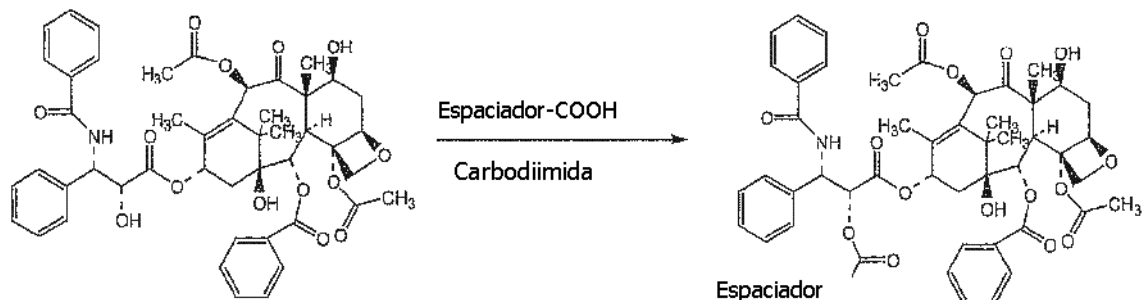


20

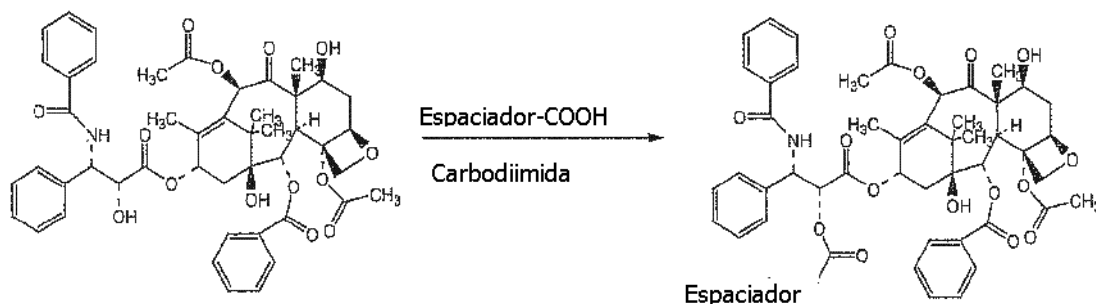
[0071] De la misma forma, el enlace que implica el espaciador y un taxano tal como paclitaxel, puede ser de tipo éster (Esquema 19), uretano o tiouretano (Esquema 20), acetal o cetal (Esquema 21) y puede requerir la presencia de un agente de activación especialmente para los enlaces de éster y uretano.

25

Esquema 19

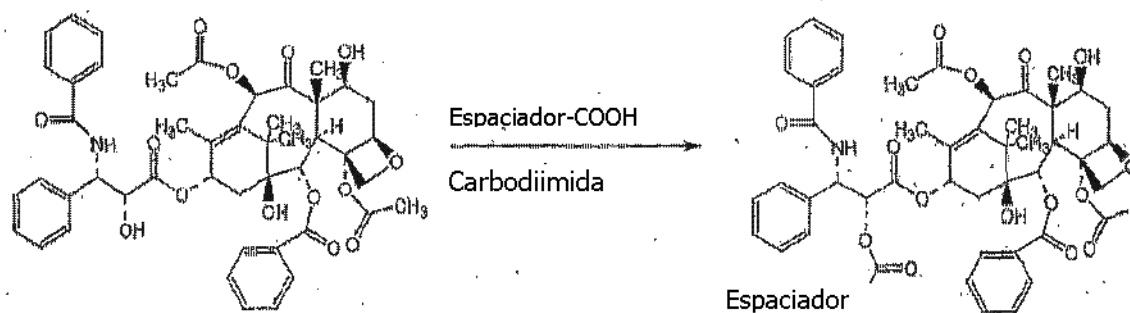


5 Esquema 20



Esquema 21

10



[0072] El espaciador se puede ligar al taxano tal como paclitaxel antes o después de su unión con los grupos funcionales de HA, dependiendo del tipo de grupos funcionales del espaciador escogido de forma apropiada.

15

[0073] El porcentaje de unión directa del taxano, tal como paclitaxel, a HA puede variar entre 0,1 % y 100 %, y preferentemente entre 0,1 % y 35 %.

[0074] Se proporcionan los siguientes ejemplos para proporcionar ilustraciones no limitantes de la presente invención.

20

Ejemplo 1

Efecto del nuevo derivado de éster de HA con paclitaxel en ratones atímicos tras el implante de células neoplásicas

25

[0075] Para este experimento, los inventores usaron células de adenocarcinoma de ovario humano, células OVCAR-3, en ratones atímicos inmunodeprimidos que pertenecían a la especie CD-1 Atímico.

[0076] Se inoculó cada ratón por medio de ruta intraperitoneal con 5×10^6 células de cáncer.

30

Diseño experimental

Fármacos de ensayo:

5 **[0077]**

- Taxol®, 5 animales tratados
- HYTAD1p20: derivado de éster de HA ligado covalentemente a paclitaxel con un 16 % de esterificación del carboxilo (peso/peso). El peso molecular de HA usado para la síntesis de este nuevo fármaco fue de 200.000 Da (véase el Ejemplo 7 para los detalles de su preparación). Se usaron cinco animales para este fármaco también.

[0078] Animales Tratados: en primer lugar se inocularon 10 animales con células OVCAR-3. Se usaron cinco para el experimento con Taxol® y otros cinco para el experimento con HYTAD1p20:

- los diez animales recibieron, por medio de inyección intraperitoneal, 3 dosis de tratamiento farmacológico (en los días 6, 13 y 20 después de la inoculación de las células cancerígenas), igual a 20 mg/kg en peso de Taxol® o 125 mg/kg de peso corporal de HYTAD (que correspondió a 20 mg/ratón de paclitaxel).

[0079] Animales de control: en primer lugar se inocularon 5 animales con la suspensión inductora de cáncer de células OVCAR-3, después de lo cual no recibieron tratamiento alguno.

Determinación de la curva de supervivencia

[0080] Se calculó la curva de supervivencia a partir de la fecha de intervención en el día 92 después de la inoculación de las células de cáncer en el peritoneo.

[0081] Resultados: la Figura 1 ilustra los resultados obtenidos.

[0082] Tres animales de control desarrollaron adenocarcinoma de ovario y murieron entre los días 70 y 75 después de la inoculación de las células de cáncer.

[0083] En el día 92 después de la intervención, el último día del experimento, ninguno de los animales que recibió el tratamiento farmacológico con paclitaxel o HYTAD murió.

Ejemplo 2

Experimento in vitro

[0084] El objetivo de este experimento fue principalmente definir el perfil de actividad de los nuevos derivados de éster de HA unido a paclitaxel y evaluar/comparar la actividad antineoplásica de los derivados de HYTAD frente a paclitaxel, determinando de este modo su potencial farmacológico, en comparación con el fármaco antineoplásico.

Diseño experimental:

Productos de ensayo:

[0085]

- Taxol®: producto de referencia
- HYTAD1 p20 – HYTAD2p20 – HYTAD2p10: derivados de éster de HA ligado covalentemente a paclitaxel con un 16 % de esterificación del carboxilo (peso/peso) (en el caso de HYTAD1p20, el peso molecular de HA usado en la síntesis del nuevo fármaco es 200.000 Da) (véase el Ejemplo 7 para los detalles de su preparación) o un 22 % (en el caso de HYTAD2p20, el peso molecular de HA usado es 39.000) o un 6,8 % (en el caso de HYTAD2p10, el peso molecular de HA usado es 39.000 Da).

Estirpes celulares

Estirpes celulares de origen humano

[0086] Se usaron cuatro estirpes celulares de cáncer de mama humano. Normalmente, las cuatro estirpes celulares del ensayo responden a paclitaxel y expresan el receptor CD44 aparentemente con la misma amplificación.

- MCF-7
- MDA-MB-231
- MDA-MB-468
- SKBR-3

Protocolo Experimental:**[0087]**

- 5 1) Se coloca la estirpe celular de ensayo en una placa a una concentración de 3.000 células por pocillo, sobre una placa de 96 pocillos de fondo redondo;
- 2) 24 horas después, se complementan las células con disoluciones de ensayo diluidas de forma apropiada en medio de cultivo;
- 10 3) Trascurridas otras 72 horas, se someten a ensayo las células por medio de colorimetría con bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT); evaluando la viabilidad celular, este ensayo también revela la diferente sensibilidad de las células frente al fármaco de ensayo. Esto es posible ya que la deshidrogenasa de mitocondria es capaz de reducir las sales de tetrazolio (amarillo) para dar lugar a cristales de formazano azules. La mayor o menor intensidad de color se evalúa por medio de espectrofotometría (Dezinot, F., et al., J. Immunol. Methods, 1986, 22 (89): 271-277).

Resultados

[0088] A continuación, los inventores presentan, en la tabla y el gráfico de la Figura 2, los resultados obtenidos en términos de IC₅₀ (la concentración de fármaco necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 % con respecto al producto de ensayo y las diferentes estirpes celulares usadas).

[0089] En la Figura 2, el eje de abscisas representa la potencia farmacológica, expresada como IC₅₀ y calculada como la proporción entre las concentraciones molares, frente al producto de referencia (paclitaxel), que normalmente se toma para disponer de un valor de cero. Por consiguiente, las rayas indican una potencia farmacológica que es mayor que el producto de referencia.

[0090] IC₅₀ (expresado en nM o µM de paclitaxel o sus derivados de HYTAD en el medio de cultivo)

Estirpes celulares	Taxol®	HYTAD2p20	HYTAD1p20	HYTAD2p10
Estirpes celulares de cáncer de mama				
MCF/7	3,5 nM	0,86 nM	0,024 nM	0,68 nM
MDA/MB/231	0,35 nM	2,58 nM	---	0,24 µM
Estirpes celulares	Taxol®	HYTAD2p20	HYTAD1p20	HYTAD2p10
MDA/MB/468	9,4 nM	---	0,18 nM	---
SKBR/3	0,23 nM	---	---	0,14 nM

30 Conclusiones

[0091] Como se presenta en la bibliografía, todas las estirpes celulares usadas son sensibles a taxol, un fármaco usado para tratar carcinoma metastásico de mama y ovario. En lo que respecta a las estirpes celulares de cáncer de mama, los diversos HYTAD probados son considerablemente más intensos que paclitaxel, con un factor de +150 con respecto a HYTAD1p20 sobre la estirpe celular MCF-7.

Ejemplo 3

[0092] *Efecto del gel ACP® en ratones atímicos tras la implantación de células neoplásicas.*

[0093] Para este experimento, los inventores usaron células HT29 de carcinoma de colon humano en ratones atímicos inmunodeprimidos que pertenecían a la especie Nude-nu Athymic (nu/nu). Se anestesió cada animal y se inyectaron 0,3 ml de suspensión de células HT29 en el interior de su cavidad peritoneal a una concentración de 166.000 células/ml. De este modo, cada ratón recibió 50.000 células de cáncer.

Diseño experimental:

[0094] Animales tratados: en primer lugar se inocularon 113 animales con HT29 e inmediatamente después recibieron una dosis individual de tratamiento igual a 0,2 ml de gel de ACP 40 mg/ml;

[0095] Animales de control: se inocularon 117 animales con una suspensión de células de cáncer HT29 pero no recibieron tratamiento.

[0096] *Curva de supervivencia:* se calculó la curva de supervivencia a partir del día de inoculación hasta el día de la muerte. Las muertes se adivinaron o bien se provocaron por medio de sacrificio de los animales cuyo peso disminuyó en más de un 20 % de su peso de partida, y en el caso de homoperitoneo que indicaba metástasis difusas. Se determinó diariamente el porcentaje de supervivencia en los dos grupos y se expresó en forma de

gráfico para obtener la curva presentada en la Figura 3.

[0097] El experimento duró 120 días, después de lo cual se sacrificaron todos los animales y se examinaron necroscópicamente para comprobar la presencia de tumores abdominales.

[0098] Resultados: 32 de 230 animales no desarrollaron ninguna neoplasia apreciable. 22 de estos animales pertenecieron al grupo de ratones tratados con gel ACP®, 10 al grupo de control.

Gel de ACP®: un 19,5 % de los animales tratados no desarrolló neoplasia;

Control: un 8,5 % de los animales de control no desarrolló neoplasia.

Ejemplo 4

Preparación de HA con elevado peso molecular entre 5.000 y 10.000 Dalton (para la posible síntesis de HA-paclitaxel con HA de bajo peso molecular)

[0099] Se disuelven 2,40 g de HA de sodio con un peso molecular de 990.000 Da en 240 ml de disolución de NaCl 0,15 M. Posteriormente, se complementa con 7,9 ml de una disolución de un 14 % de NaOCl. A una temperatura constante de +4 °C, se somete la disolución a tratamiento de ultrasonidos durante 120 minutos a una frecuencia de 20 Hz y 150 W. Una vez que se completa la reacción, se ajusta el pH a 6,5 con HCl de 0,1 N y posteriormente se precipita la disolución en 1000 ml de una mezcla 2:1 de metanol-acetona. Se recoge el producto por medio de filtración y se seca a vacío durante 48 horas a 45 °C. De este modo, se obtienen 1,65 g de sal de sodio. El análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)-GPC revela que la fracción de HA obtenida tiene un peso molecular medio (MW) de 5.850, un peso molecular medio numérico (MN) de 3.640 y un índice de polidispersidad de 1,61.

Ejemplo 5

Preparación de un derivado de éster de HA ligado a paclitaxel con esterificación del carboxilo de aproximadamente un 4 % en peso/peso

[0100] Se disuelven 51 mg de paclitaxel en CH₂Cl₂ y se complementa la disolución con 104 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y 20 mg de ácido 4-bromobutírico. Posteriormente, se separa la disolución en agua. Tras eliminar los residuos de carbodiimida y bromuro, se seca el disolvente de reacción con sulfato de sodio anhidro y se elimina con un evaporador rotatorio, se disuelven 21 mg de producto obtenido de este modo en n-metil-pirrolidona (NMP) y se añaden a una disolución de 20 mg/ml de HA salificada con tetrabutilamonio. (TBA) en NMP (200 mg en 10 ml de NMP). Transcurrida una reacción de siete días a temperatura ambiente, se diluye la reacción con 5 ml de agua y 1 ml de disolución de NaCl saturada. Se agita la disolución obtenida de este modo durante 1 hora para permitir el intercambio de sodio con el ión de TBA. Posteriormente, se añade lentamente etanol gota a gota y se disuelve el producto filamentosos obtenido de este modo en agua, se somete a diálisis y finalmente se seca por congelación.

Ejemplo 6

Preparación de un derivado de éster de HA con paclitaxel con esterificación en el carboxilo de aproximadamente un 10 % en peso/peso

[0101] Como en el Ejemplo 5, se complementan 308,7 mg de paclitaxel disueltos en 15 ml de diclorometano con 117,2 mg de ácido 4-bromobutírico y 614,1 mg de EDC. Posteriormente, se añade agua a la disolución para eliminar todo el bromuro y la carbodiimida. La disolución orgánica obtenida de este modo se complementa con sulfato de sodio para deshidratarla, al tiempo que se elimina el disolvente con un evaporador rotatorio. Finalmente, se obtienen 363 mg de producto intermedio.

[0102] Se añaden 175 mg de producto intermedio obtenido a 1 g de HA-TBA disuelto en NMP anhidro. Se agita la disolución a temperatura ambiente durante 7 días, después de lo cual se añaden 20 ml de agua y 4 ml de disolución de NaCl saturada. Se agita durante 1 hora para permitir el intercambio de sodio con el ión TBA. Posteriormente, se añade lentamente etanol gota a gota y se disuelve en agua el producto filamentosos, se somete a diálisis y finalmente se seca por congelación.

Ejemplo 7

Preparación de un derivado de éster de HA con paclitaxel con esterificación en el carboxilo a aproximadamente un 16 % en peso/peso

[0103] Se añaden 164 mg de un producto intermedio, obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos anteriores N° 5 y 6, a una disolución de 680 mg de HA-TBA disuelto en 25 ml de NMP anhidro. Transcurrida una reacción de 7 días a temperatura ambiente, se complementa la disolución con 20 ml de agua y 4 ml de disolución de NaCl saturada. Transcurrida 1 hora, se añade lentamente etanol gota a gota. Se recoge el producto

obtenido por medio de filtración y se disuelve en agua, se somete a diálisis y, cuando la conductividad de la disolución de diálisis ha disminuido por debajo de 10 μ S, se congela. A continuación, se seca por congelación la disolución congelada.

5 Ejemplo 8

Preparación de un derivado de éster de HA con paclitaxel con esterificación en el hidroxilo a aproximadamente un 10 % en peso/peso

- 10 **[0104]** Se disuelven 102,6 mg de paclitaxel en 5 ml de diclorometano y se complementa la disolución con 20,4 mg de anhídrido succínico. Tres horas más tarde, se elimina el disolvente por medio de evaporación usando un evaporador rotatorio. Se disuelve el producto obtenido de este modo en 5 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) con un bajo contenido en agua, y se añaden 27,3 mg de dicitelo-hexil-carbodiimida. Aproximadamente 5 minutos después, se complementa la disolución con una disolución de HA-TBA, obtenida disolviendo 327 mg de polímero en 15 ml de DMSO con un bajo contenido de agua. Se agita la disolución a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente, se añaden unos pocos ml de agua y 3 ml de una disolución de NaCl saturada a la disolución. Trascurre 1 hora, se precipita por medio de adición de etanol. Se disuelve el producto filamentososo recogido por medio de filtración en agua, se somete a diálisis y finalmente se seca por congelación.

20 Ejemplo 9

Preparación de un derivado de éster de HA con paclitaxel con esterificación en el carboxilo de aproximadamente un 4 % en peso/peso

- 25 **[0105]** Se complementan 510,1 mg de paclitaxel disueltos en 6 ml de diclorometano con 95,4 mg de ácido 3-3-bromopropiónico y 525,0 mg de EDC. Posteriormente, se añade agua a la disolución para eliminar el bromuro y la carbodiimida por medio de separación, al tiempo que se usan 10 volúmenes de agua para eliminar los reactivos. Se complementa la disolución orgánica con sulfato de sodio para deshidratarla y se elimina el disolvente con un evaporador rotatorio.

- 30 **[0106]** Se añaden 155,5 mg de producto intermedio obtenido de este modo a 1,46 g de HA-TBA disuelto en NMP anhidro y se agita la disolución obtenida de este modo a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente, se añaden 20 ml de agua y 4 ml de disolución de NaCl saturada. Se agita la disolución durante 1 hora para permitir el intercambio de sodio con el ión TBA. Posteriormente, se añade lentamente etanol gota a gota y se disuelve el producto filamentososo obtenido de este modo en agua, se somete a diálisis y finalmente se seca por congelación.

Ejemplo 10

- 40 *Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con esterificación en el carboxilo a aproximadamente un 30 % en peso/peso*

- 45 **[0107]** Se disuelven 500 mg de paclitaxel en CH_2Cl_2 y se complementa la disolución con 397,6 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y 300,9 mg de ácido 4-bromobutírico. Posteriormente, se separa la disolución en agua. Una vez que se han eliminado los residuos de carbodiimida y bromuro, se seca el disolvente de reacción con sulfato de sodio anhidro y se elimina con un evaporador rotatorio. Se disuelve el producto obtenido de este modo en NMP y se añade a una disolución que contiene ~ 20 mg/ml de ácido hialurónico salificado con TBA en NMP (1,95 g en 100 ml de NMP). Tras una reacción de 7 días a temperatura ambiente, se diluye la reacción con 20 ml de agua y 4,5 ml de una disolución de NaCl saturada. Se agita la disolución durante 1 hora para permitir el intercambio de sodio con el ión de TBA. Posteriormente, se añade lentamente etanol gota a gota y se disuelve el producto filamentososo obtenido de este modo en agua y se somete a diálisis y finalmente se seca por congelación.

Ejemplo 11

- 55 *Preparación de un éster autoreticulado parcial (aproximadamente un 10 % de sustitución) de HA con un 8 % de paclitaxel en peso/peso*

- 60 **[0108]** Se solubilizan 3,10 g de HA salificado con TBA en 150 ml de DMSO con un bajo contenido de agua a temperatura ambiente. Posteriormente, se complementa la disolución con 541,0 mg de paclitaxel intermedio obtenido de acuerdo con el método descrito en los ejemplos 5, 6 y 7. Una vez que se ha dejado reaccionar durante 7 días a temperatura ambiente, se complementa la disolución de reacción con 126,5 g de trietilamina y se agita todo durante 30 minutos.

- [0109]** Se añade lentamente una disolución de 319,5 g de yoduro de 2-cloro-1-metil-piridina en 30 ml de DMSO durante un intervalo de 45 minutos y se deja la mezcla a 30 °C durante 15 horas.

65

[0110] Se añade una disolución formada por 50 ml de agua y 1,7 g de cloruro de sodio y se vierte la mezcla resultante lentamente en 400 ml de acetona al tiempo que se agita de forma continua. Se forma un precipitado que se filtra y se lava tres veces con 50 ml de acetona agua 5:1 y tres veces con acetona (50 ml). Se seca a vacío el producto final obtenido de este modo a 38 °C.

Ejemplo 12

Ensayos de solubilidad del éster de HA-paclitaxel obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5 en una disolución de glucosa de un 5 %.

[0111] Se disuelven 14,6 mg de un producto de HA-paclitaxel obtenido por medio de esterificación de acuerdo con el Ejemplo 7 (comenzando a partir de HA con un peso molecular de 200 kDa) con un grado de sustitución en el carboxilo de un 16,3 % en peso/peso, en 1 ml de una disolución acuosa de glucosa de un 5 %. Se puede filtrar la disolución, agitada con una barra de agitación magnética, a través de un filtro esterilizado de 0,20 µm equipado sobre una jeringa. La concentración de paclitaxel en la disolución es de 2,38 mg/ml.

[0112] Los inventores también intentaron encontrar la concentración máxima de producto por ml de disolución acuosa de glucosa de un 5 %. A una concentración de 32,8 mg de producto de HA-paclitaxel por ml de disolución de glucosa, se obtiene una disolución viscosa con una concentración de paclitaxel de 5,35 mg/ml.

Ejemplo 13

Ensayos para recuperar paclitaxel a partir de plasma humano

[0113] Se prepara una disolución que está formada por 101,3 mg de HA-paclitaxel en 10 ml de agua. Se prepara HA-paclitaxel como se ha descrito en el Ejemplo 7.

[0114] Se lleva a cabo el ensayo de recuperación colocando 40 mg de la disolución anteriormente descrita en contacto con 2 ml de plasma humano a 37 °C.

[0115] Para determinar que el paclitaxel se ha liberado en el plasma por medio de desligado del mismo a partir de HA, se establecieron tres tiempos de contacto: 6, 30 y 60 minutos. Al final de cada intervalo de contacto, se extrajo paclitaxel de la disolución de plasma-HA-paclitaxel con 3 lavados, cada uno con 1,5 ml de terbutilmetiléter (TBME), que se recogieron juntos, se evaporaron hasta sequedad por medio de evaporación natural a 65 °C y se re-suspendieron en 400 µl de etanol absoluto para determinar el contenido del fármaco en cuestión por medio de HPLC (cromatografía de líquidos de alta presión). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4: transcurridos 6 minutos más de un 80 % de paclitaxel se había desligado de HA y el porcentaje no aumentó por medio de los tiempos de observación posteriores.

[0116] Se ha descrito de este modo la invención, es evidente que se pueden modificar estos métodos de diversas formas.

REIVINDICACIONES

1. Un taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico, en el que el enlace covalente se forma indirectamente entre el taxano y ácido hialurónico mediante un espaciador, estando seleccionado dicho espaciador entre el grupo que
5 consiste en cadenas lineales alifáticas sustituidas con uno o más grupos amino y más de un grupo carboxilo, en el que el enlace covalente entre el grupo amino del espaciador y los grupos carboxilo del ácido hialurónico es un enlace amida, y el enlace covalente entre los grupos hidroxilo del taxano y el grupo carboxilo del espaciador es un enlace de éster, en el que el porcentaje de enlace entre el ácido hialurónico y el taxano está entre un 0,1 % y un 35 %, y en el que el ácido hialurónico tiene un peso molecular de entre 400 y 230.000 Dalton.
- 10 2. El taxano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el taxano está seleccionado entre paclitaxel y docetaxel.
3. El taxano de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho taxano es paclitaxel.
- 15 4. El taxano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido hialurónico se salifica con bases orgánicas y/o inorgánicas.
5. Una composición farmacéutica que comprende como sustancia activa al menos un taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en combinación con excipientes y
20 diluyentes farmacéuticamente aceptables.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para administración oral, intravenosa, arterial, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o transdérmica, o por inyección directa en un sitio tumoral.
- 25 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para administración por vía oral.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que además comprende una o más sustancias biológica o farmacológicamente activas.
- 30 9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dichas sustancias biológica o farmacológicamente activas están seleccionadas entre el grupo que consiste en esteroides, hormonas, factores tróficos, proteínas, vitaminas, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, fármacos de quimioterapia, agentes de bloqueo de calcio, antibióticos, antivíricos, interleucinas y citoquinas.
- 35 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha sustancia biológica o farmacológicamente activa es interferón.
11. El taxano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como medicamento.
- 40 12. Uso de un taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico como se define en las reivindicaciones 1-4, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores, patologías auto-inmunitarias o restenosis.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el tratamiento de los tumores comprende quimioterapia para
45 cáncer de mama, cáncer de ovario y/o endometrio, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, de próstata y/o vejiga, cáncer gástrico y/o intestinal, leucemia y/o sarcoma de Kaposi.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dichas patologías auto-inmunitarias se escogen entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis auto-inmunitaria.
- 50 15. Uso del taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico como se define en las reivindicaciones 1-4, para el revestimiento de endoprótesis vasculares y dispositivos médicos.
16. Endoprótesis vasculares y dispositivos médicos revestidos mediante un taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico como se define en las reivindicaciones 1-4.
- 55 17. Un proceso para la preparación de un taxano ligado covalentemente a ácido hialurónico mediante un espaciador, como se define en la reivindicación 1, en el que el enlace amida se forma por activación de los grupos carboxilo de ácido hialurónico mediante un agente de activación, permitiendo un enlace con el grupo amino del espaciador, ligado
60 previa o posteriormente al taxano.
18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, que además comprende la etapa de purificación del taxano obtenido ligado covalentemente a ácido hialurónico.

FIGURA 1

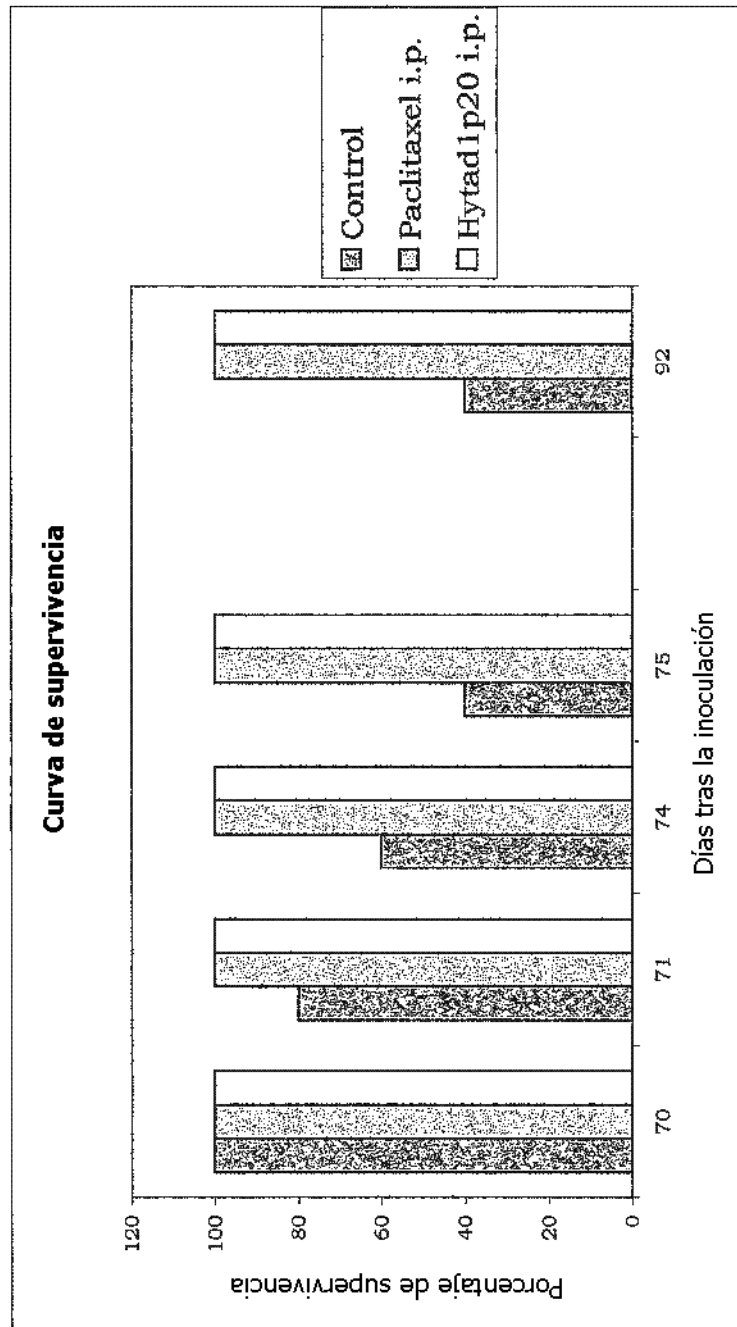


FIGURA 2

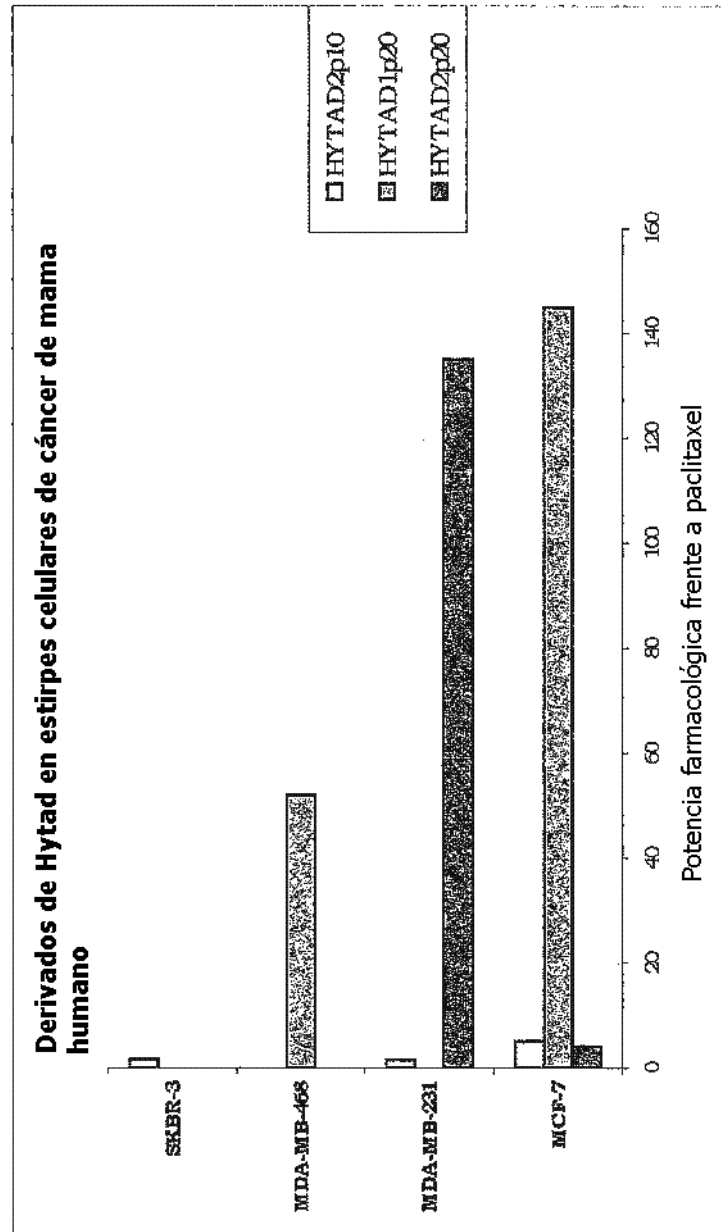


FIGURA 3

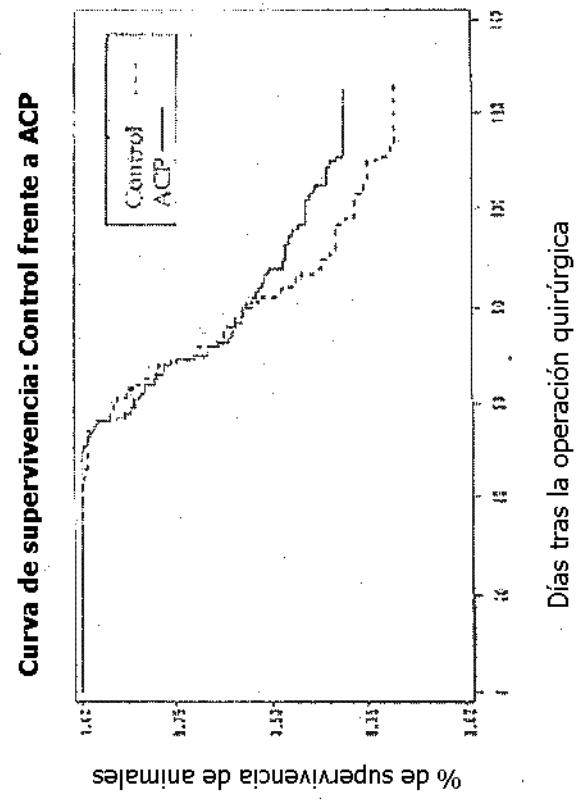


FIGURA 4

Recuperación de Paclitaxel en plasma humano