

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 877**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2006 PCT/EP2006/007717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2007 WO07014784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006 E 06762981 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 1909843**

54 Título: **Bioconjugados antitumorales de ácido hialurónico o sus derivados obtenidos por conjugación química indirecta, y su uso en el campo farmacéutico**

30 Prioridad:

03.08.2005 IT PD20050242

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

12.01.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RENIER, DAVIDE y
BETTELLA, FABIO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 596 877 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

Bioconjugados antitumorales de ácido hialurónico o sus derivados obtenidos por conjugación química indirecta, y su uso en el campo farmacéutico

5 El desarrollo de un tumor, su crecimiento y la progresión hacia metástasis primarias y secundarias son procesos biológicos altamente complejos que requieren una organización secuencial de eventos celulares (órgano-selectiva) coordinados entre sí.

La diseminación de las células tumorales que conduce a la formación de una metástasis se produce como un resultado de su separación del sitio de crecimiento primario seguido por su penetración en el lecho circulatorio y/o en el sistema linfático.

10 En los últimos años, el conocimiento progresivo de los procesos vitales que causan el inicio, desarrollo, diseminación e implantación de un tumor y sus metástasis, no solamente ha ofrecido a los investigadores la posibilidad de estudiar, sintetizar y/o experimentar nuevas moléculas químicas como nuevos agentes antitumorales sino que también ha facilitado el estudio y el perfeccionamiento de nuevas terapias de tratamiento que superen los problemas relacionados con la toxicidad de los fármacos antineoplásicos y, sobre todo, la comprensión de los mecanismos químico-biológicos que causan resistencia al fármaco anterior.

Uno de los principales problemas relacionados con el tratamiento de tumores se relaciona de hecho con la posible "resistencia" del tumor al tratamiento farmacológico después de una respuesta inicial positiva.

Estas "resistencias" están asociadas con variaciones biológicas/bioquímicas en el funcionamiento de la célula tumoral, tales como, por ejemplo:

- 20
- alteraciones en el transporte celular del fármaco;
 - cambios de afinidad con respecto a esto por parte de un posible inhibidor metabólico;
 - incremento sustancial en la capacidad de la propia célula de inactivar la droga.

25 Experimentaciones científicas publicadas recientemente (Misra et al., The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(28):25285-25288) han demostrado cómo el pre/cotratamiento in vitro de células tumorales resistentes a algunos fármacos de quimioterapia con oligómeros de ácido hialurónico que tienen un peso molecular muy bajo, restableció la sensibilidad inicial de la célula al fármaco. Los datos experimentales obtenidos hasta ahora, sin embargo, no tienen completamente aclarado cómo/por qué se restablece la sensibilidad a la quimioterapia, incluso si se ha observado que estos oligómeros son capaces de interferir con diversos eventos moleculares dentro de la célula responsable de la adquisición de resistencia al fármaco y por tanto del crecimiento y la difusión del tumor.

30 La acción farmacológica del oligómero anterior se hace posible porque, en tanto se enlaza a sí mismo al receptor de CD-44 (específicamente de ácido hialurónico), consigue interferir negativamente con el enlace del receptor nativo de HA, una interacción que es responsable de la coordinación de las numerosas funciones de las células y, sobre todo, de la célula tumoral.

35 A través de su enlazamiento (e internalización subsecuente) con su receptor presente en la membrana celular, el HA que de hecho no participa en la activación de muchos eventos que son de importancia fundamental para la vida de la célula, tales como, por ejemplo, la regulación de los procesos de adhesión/ crecimiento y la migración celular, entra en el mecanismo quimiotáctico durante los procesos inflamatorios, juega un papel principal en los procesos de cicatrización y, como se mencionó más arriba, en la migración de las células tumorales para la formación de metástasis.

40 De hecho muchos tumores sólidos han demostrado grandes cantidades de HA que pueden facilitar consecuentemente, la invasión de otros tejidos y órganos por parte de las células tumorales.

45 Las formas tumorales, tales como, por ejemplo, carcinomas, melanomas, linfomas, tumores de mama, tumores de colon-rectal y pulmonares, sobreexpresan el receptor transmembrana CD-44: en estas líneas celulares, experimentaciones efectuadas con anticuerpos antirreceptores (que consecuentemente "bloquean" el receptor que previene de su enlazamiento al HA nativo) han demostrado la capacidad efectiva de la inhibición del crecimiento y la metástasis tumorales, esto demuestra cómo la "interferencia "de la unión de HA con su receptor provoca una

perturbación de numerosos eventos de importancia fundamental para el vida de la célula y que muestra, consecuentemente, la participación real del HA en el desarrollo de la masa tumoral.

Se sabe que algunos fármacos antitumorales que se han utilizado durante años en el campo oncológico con resultados clínicos satisfactorios se han modificado químicamente para:

- 5 • superar el problema de su toxicidad intrínseca con el objetivo de efectuar una nueva estrategia de tratamiento que consiste en guiar el fármaco antineoplásico directamente a la célula tumoral enlazándolo al HA porque, como se describe completamente más arriba, muchos fenotipos tumorales sobreexpresan el receptor CD-44 para HA en su superficie celular (esto es un mecanismo de direccionamiento activo que incrementa la eficacia celular del fármaco mediante la reducción de su toxicidad sistémica). La unión y la internalización del polímero también llevar al fármaco
10 dentro de la célula tumoral que incrementa su eficacia;

• incrementar su solubilidad (se ha demostrado que la unión de los fármacos liposolubles con moléculas fuertemente hidrofílicas tales como, por ejemplo, HA, incrementa considerablemente la solubilidad del fármaco por sí mismo en el sistema circulatorio).

- 15 La solubilidad de los fármacos de quimioterapia en el lecho circulatorio, de hecho, representa la condición esencial para su eficacia farmacológica, algunos fármacos, sin embargo, que han demostrado ser extremadamente activos en diversos tipos de tumores tales como, por ejemplo, camptotecinas y sus derivados de irinotecán y topotecán, paclitaxel y alcaloides, los derivados de vinca, como resultado de su alta insolubilidad tienen problemas relacionados con la administración intravenosa (y, para las hormonas y anti-hormonas también intramuscular) que pueden limitar y restringir su aplicación clínica.

- 20 Por las razones antes citadas (solubilidad y toxicidad) han sido sintetizados nuevos fármacos de quimioterapia, que se crean a partir del enlace químico (directa o indirecta por medio de un espaciador que consta de aminoácidos o péptidos con una cadena corta de aminoácidos) o simple asociación de algunos fármacos antineoplásicos que contienen un anillo lactónico (tales como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, vincristina, vinblastina y derivados de camptotecinas) con ácido hialurónico (HA) (patente de Estados Unidos 6,291,671).

- 25 Otros conjugados comprenden fármacos antineoplásicos tales como paclitaxel y camptotecinas unidos a un polímero que consiste de ácido poliglutámico, posiblemente asociado con HA (patente U.S. 5,977,163).

También se conocen otros nuevos tipos de fármacos de quimioterapia, representados por la doxorubicina antitumoral unida covalentemente tanto a HA (modificado químicamente con dihidrazida) como a un vehículo tal como el polímero de hidroxipropil-metacrilamida (solicitud de patente internacional WO 02/090390).

- 30 También se conocen nuevos fármacos portadores, que consisten de polisacáridos conjugados químicamente a cadenas de aminoácidos a su vez enlazados covalentemente a fármacos antineoplásicos tales como doxorubicina (patente U.S. 5,688,931). Adicionalmente, por la misma razón, otros sistemas de liberación se han perfeccionado, que consisten, por ejemplo, en la encapsulación de la doxorubicina en los liposomas que contienen derivados lipídicos de HA (Peer D. et al., Neoplasia, 2004, 6(4):343-353; Eliaz R.E. et al., Cancer Research, 2001, 61:2592-2601).

- 35 Se sabe, por ejemplo, que para superar los problemas de los derivados de camptotecinas, para alternar su perfil farmacocinético y reducir su toxicidad que incrementa su eficacia terapéutica, el irinotecan ha sido conjugado con el polímero/portador carboxi-metil-dextrano por medio de un espaciador representados por un péptido de triglicina (Satoshi Okuno et al, Cancer Research, 2000, 60: 2988-2995; patente de Estados Unidos 5.892.043.).

- 40 El profármaco resultante ha demostrado ser activo en su eficacia terapéutica, ya que permanece en circulación durante un período prolongado de tiempo incrementando su acumulación en la masa tumoral, reduciendo contemporáneamente su toxicidad sistémica; para muchos de los conjugados descritos previamente, sin embargo, los datos experimentales definidos no están disponibles todavía, lo que documenta su eficacia con respecto al fármaco no conjugado.

- 45 El derivado de paclitaxel también se conoce, unido covalentemente a HA previamente derivado con hidrazida (patente US 5,874,417), o unido directamente a HA, o indirectamente por medio de un espaciador de una naturaleza variable capaz de formar diferentes tipos de enlaces químicas que incrementan la solubilidad y consecuentemente la eficacia del fármaco (solicitud de patente EP 1560854).

5 La presente invención describe y reivindica nuevos conjugados de HA obtenidos a partir de la unión indirecta entre el polisacárido y los fármacos liposolubles antineoplásicos o con fármacos de quimioterapia solubles o parcialmente solubles para superar los problemas vinculados a su solubilidad (si está presente), su toxicidad y, sobre todo, a restablecer e incrementar la eficacia terapéutica del fármaco en las células tumorales que han adquirido resistencia farmacológica al fármaco en sí mismo. El estado de la técnica representado por los derivados descritos previamente es consecuentemente superado aquí a medida que el Solicitante es capaz de demostrar la superioridad farmacológica de los nuevos conjugados, objeto de la presente invención, gracias a la extremadamente alta capacidad citotóxica de estos derivados hacia las células neoplásicas.

10 Esta nueva eficacia farmacológica permite la aplicación en farmacología clínica de terapias quimioterapéuticas innovadores, para el tratamiento de tumores primarios y/o secundarios que ya no responden a ningún tratamiento médico tras la formación de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR) que generalmente ponen en peligro la posibilidad de un tratamiento efectivo del paciente y consecuentemente, en el análisis anterior, reduce drásticamente su esperanza de vida.

15 Al resolver/superar la MDR, los nuevos derivados, objeto de la presente invención, cambian el pronóstico final del paciente, lo que permite consecuentemente la solución/reducción de la patología tumoral.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención describe y reivindica un nuevo grupo de conjugados/derivados y su proceso de preparación, que consiste en ácido hialurónico (HA) (y/o sus derivados) y fármacos antitumorales, conjugados indirectamente por medio de un puente molecular llamado "espaciador" que consiste de una cadena alifática, aralifática, alicíclica, o heterocíclica, lineal o ramificada con o sin heteroátomos.

En particular, son objeto de la presente conjugados químico-farmacéuticas de la invención de ácido hialurónico y/o sus derivados, obtenidos a través de una unión indirecta entre el polisacárido y un fármaco con una acción antitumoral, de acuerdo con la reivindicación 1, a través de un espaciador molecular que forma un enlace éster con el grupo carboxílico de HA y/o su derivado, con la condición de que dicho separador no es una hidrazida o un polipéptido.

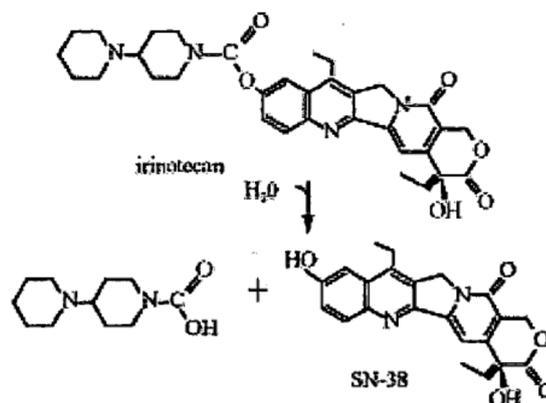
25 El HA (y/o uno de sus derivados) y el fármaco son por lo tanto indirectamente conjugados por medio de uno o más enlaces covalentes del tipo éster que parcial o totalmente involucran los grupos carboxílicos del polisacárido y una función química (por ejemplo, un hidroxilo, un carboxilo, un grupo amino, etc.), que pertenece al espaciador el cual a su vez está unido al fármaco antitumoral seleccionado, como se describe en detalle a continuación.

30 Los derivados que se pueden obtener de acuerdo con la presente invención tienen diferentes propiedades físico-químicas que pueden ser moduladas a través de la selección del tipo de enlace y el grado de sustitución, a fin de mejorar las características del fármaco de quimioterapia de partida, tales como:

- solubilidad,
- características mecánicas y reológicas,
- resistencia a la degradación hidrolítica, haciendo el nuevo conjugado más eficiente en su acción citotóxica, un derivado que tendrá un nuevo mecanismo de acción superando así la resistencia farmacológica del fármaco en sí mismo adquirida por la célula tumoral (como se describe más arriba).

40 Como se sabe, muchos fármacos quimioterapéuticos antitumorales tienen una limitada, si no inexistente, solubilidad en agua o soluciones salinas; esto significa que para su administración, debe recurrirse a solventes orgánicos y aceites que, aunque llevan el fármaco a la solución, tienen una toxicidad intrínseca con efectos colaterales que requieren intervenciones de la medicación antes de la administración del producto.

45 En algunos casos, para el fármaco de quimioterapia irinotecán, la forma activa (SN38) está incluso modificada químicamente (profármaco) para que sea soluble y para promover la liberación de su metabolito que es activo después de la administración intravenosa. Esto sin embargo, causa una baja disponibilidad del metabolito SN38 en el sitio objetivo requiriendo por lo tanto la alta administración de dosificaciones citotóxicas con la consecuente amplificación de los efectos colaterales no deseados.



La literatura internacional (Mathijssen RH et al., Clin Cancer Res, 2001, 7 :2182-2194) indica que la actividad antitumoral de SN38 es de 100 a 1000 veces mayor con respecto a su profármaco comercial; consecuentemente, la posibilidad de conjugar SN38 con ácido hialurónico o uno de sus derivados permite que se obtengan compuestos con una mayor eficacia y, gracias a la necesidad de dosificaciones de administración más bajas, con menores efectos colaterales vinculados a la dispersión del fármaco en las áreas no golpeadas por neoplasia. La conjugación de fármacos de quimioterapia antitumoral con HA también permite que el principio activo sea "dirigido" hacia su objetivo, y consecuentemente hacia el tejido neoplásico. Por lo tanto, el énfasis se da a un mecanismo de direccionamiento activo entre el conjugado y la célula neoplásica que incrementa la concentración local de fármaco cerca al área neoplásica y consecuentemente la eficacia. De esta manera, por otra parte, mediante la reducción de la distribución del derivado a los tejidos sanos, se garantiza una mayor tolerabilidad del producto con respecto al fármaco libre.

Una segunda ventaja fundamental que se deriva de la presente invención es la posibilidad, principalmente gracias a la presencia de HA químicamente modificado, de transformar tecnológicamente el conjugado en un biomaterial tridimensional (para ser aplicado de forma local) procesado en diversas formas, tales como, por ejemplo, hidrogel, nano o microesferas o de fibras a su vez hiladas como productos tejidos o no tejidos; en este caso, la matriz de polisacárido modificado químicamente está en estrecho contacto con la masa tumoral, actúa como un sistema de liberación controlada del fármaco en el sitio de aplicación y por lo tanto favorece una mayor eficacia por parte del fármaco en sí mismo. Una vez que la acción antineoplásica ha sido ejercida, el derivado se degrada de forma natural y segura para el organismo, liberando completamente el principio activo antitumoral y el ácido hialurónico. Los productos generados por la invención, ya sea en la forma de composiciones farmacéuticas clásicas o biomateriales degradables, son por lo tanto caracterizados por una mayor tolerabilidad con respecto al principio activo no modificado y una mayor actividad farmacológica, en algunos casos incluso en varios órdenes de magnitud con respecto al expresado por el principio activo que los forma; ambos efectos se pueden atribuir a la afinidad específica de ácido hialurónico hacia los receptores, tales como CD44 presente en las células tumorales. Estos efectos se ponen de relieve cuando el fármaco conjugado se administra en forma de un material tridimensional, en contacto directo con la neoplasia. La combinación de estas características es tal que los derivados/conjugados de la presente invención claramente superan lo que está disponible en el estado de la técnica en la terapia local o sistémica de diversos tipos de neoplasia y de diferentes orígenes, que también se han hecho resistentes a las tradicionales terapias quimioterapéuticas.

El ácido hialurónico utilizado en la presente invención tiene un peso molecular que varía de 400 a 3,000,000 Da, preferiblemente en el rango de 5,000 a 1,000,000 Da, e incluso más preferiblemente de 30,000 a 500,000 Da, que puede ser de un origen extractivo, fermentativo o biosintético. El enlace covalente con el espaciador involucra el grupo carboxílico de ácido D-glucurónico de la unidad repetitiva del polímero, en un porcentaje que varía de 1 a 100% (grado de sustitución), que forma un enlace éster con el grupo funcional del espaciador molecular seleccionado que consecuentemente actúa como una conexión entre el ácido hialurónico y el fármaco quimioterapéutico.

El agente espaciador consiste de una cadena alifática, aralifática, alicíclica, o heterocíclica, lineal o ramificada que contiene o no contiene heteroátomos, que pueden comprender grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo, grupos amina (con la exclusión de las hidrazidas y polipéptidos), grupos epoxi, cloruros de ácidos, tioles, nitrilos, halógenos, anhídridos, isocianatos, e isotiocianatos; bromuros, yoduros y cloruros de ácidos carboxílicos siendo las preferidas una cadena alifática de C₂ a C₁₀, y, en particular, bromuros, tales como el ácido bromopropiónico o ácido bromobutírico. El grado de sustitución varía preferiblemente de 1 a 50% e incluso más preferiblemente de 1 a 20%.

Los derivados de HA que se pueden usar en los nuevos conjugados, objeto de la presente invención, se listan a continuación:

1. HA salificado con bases orgánicas y/o inorgánicas que tienen un peso molecular de 50-730 KDa (EP0138572 B1) o un alto peso molecular de 750-1230 KDa, (EP 535200 B1);
- 5 2. Hyaff®: ésteres de HA con alcoholes de las series alifática, aralifática, serie de ciclo-alifáticas, aromáticas, cíclicas y heterocíclicas, con un porcentaje de esterificación que puede variar dependiendo del tipo y la longitud del alcohol utilizado, de 1 a 75%, preferiblemente de 30 a 50% (EP 216453 B1);
3. Hyadd™: amidas de HA con aminas de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía desde 1 a 10%, preferiblemente 4% (EP 1095064 B1);
- 10 4. Los derivados O-sulfatados de HA hasta el 4º grado de sulfatación (EP 0702699 B1);
5. ACP®: ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación interna que varía desde 0.5 a 10% y preferiblemente 5% (EP 0341745 B1);
6. Desacetilatos de HA: se derivan de la desacetilación de la fracción de N-acetil-glucosamina con un porcentaje de desacetilación que varía preferiblemente de 0.1 a 30%, mientras que todos los grupos carboxilo del HA se pueden salificar con bases orgánicas y/o inorgánicas (EP 1313772 B1);
- 15 7. Hyox™: derivados percarboxilados de HA obtenidos a partir de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción N-acetilglucosamina, con un grado de percarboxilación que varía de 0.1 a 100%, preferiblemente de 25 a 75%. Todos los grupos carboxílicos del HA pueden ser salificados con bases orgánicas y/o inorgánicas (solicitud de patente EP 1339753). Los fármacos utilizados en la reacción de conjugación con HA pertenecen a la siguiente categorías:
 - 20 • nitrosoureas.

Los fármacos identificados y el ácido hialurónico (y/o uno de sus derivados) están enlazados indirectamente por medio de un espaciador a través de la formación de enlaces éster con los siguientes procedimientos:

- 25 1. un grupo funcional del separador adecuadamente seleccionado (tal como, por ejemplo, un grupo carboxilo, un grupo amino, un haluro, etc.), que contiene también un segundo grupo (llamado "grupo saliente") capaz de reaccionar con la función carboxilo de HA (por ejemplo, un haluro de: bromo, yodo o cloro) reacciona con un grupo funcional que pertenece a la molécula antitumoral representado, por ejemplo, por un hidroxilo, una amina, un carboxilo o un mercaptano. La reacción puede requerir posiblemente la activación de una de las funciones involucradas por medio de un agente de activación (por ejemplo la activación de un grupo carboxilo por medio de carbodiimidias). En una segunda fase, por contacto directo con una sal de tetraalquilamonio (preferiblemente de tetrabutilamonio) de HA en un ambiente anhidro, el compuesto que consiste del fármaco modificado reacciona dando lugar a una sustitución nucleofílica del grupo saliente (por ejemplo bromuro) en el carboxilo del HA, causando la formación de un enlace éster entre el HA y el espaciador;
- 30 2. el grupo carboxilo del ácido hialurónico o uno de sus derivados está enlazado por unión nucleofílica a un espaciador adecuado que se une subsecuentemente a una función de la molécula antitumoral (en todas las formas conocidas por los expertos en el campo);
- 35 3. el grupo carboxilo de HA o uno de sus derivados se activa con un agente activante, por ejemplo una carbodiimida, y se hace reaccionar con una función hidroxilo del espaciador seleccionado adecuadamente, previamente o subsecuentemente enlazado al fármaco (en todas las formas conocidas para expertos en la materia).

Las aplicaciones oncológicas que se relacionan con el uso de conjugados que consisten de ácido hialurónico (y/o uno de sus derivados) y principio activo antitumoral están estrechamente enlazadas a la respuesta de la neoplasia al fármaco conjugado. De conformidad con los usos previstos, los bioconjugados por lo tanto se pueden administrar por vía oral, por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intra-articular, tópica, transdérmica, loco-regional, o en una combinación de los mismos (ambos, un procedimiento de administración local y sistémico, por lo tanto, se reivindica). Las neoplasias involucradas en el tratamiento pueden ser, por ejemplo tumores del páncreas, mama, colon-recto, pulmón y sistema respiratorio *in toto*, cabeza-cuello, hígado, estómago, testículos,

ovario, endometrio, próstata, vejiga, cerebro, leucemia, linfomas, melanoma, sarcoma de Kaposi, osteosarcoma, neuroblastoma y cáncer de piel.

Se proveen a continuación algunos ejemplos de preparación de bioconjugados entre el ácido hialurónico y/o sus derivados, y fármacos de quimioterapia con una actividad antitumoral.

5 Ejemplo de referencia

1: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico que tiene un MW de 200 kDa y SN-38 con un grado de sustitución de aproximadamente 15% (Figura 1)

Se disuelven 199 mg de SN-38 se disuelven en 50 ml de acetonitrilo y 383 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), se añaden a la solución 258 mg de ácido 4-bromobutírico y 40 mg de DMAP. El desarrollo de la solución es seguido por medio de cromatografía TLC (fase estacionaria de sílice con indicador de fluorescencia y eluyente cloroformoacetoneitrilo 60:40). El producto se recupera mediante precipitación y se purifica mediante cromatografía en columna de sílice utilizando cloroformo: metanol 99:1 como eluyente. El intermediario así obtenido se seca a temperatura ambiente bajo alto vacío. Se disuelven 0.84 g de sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HATBA) en 43 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a temperatura ambiente. El intermediario se añade a la solución y toda la mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente. Después de 7 días de reacción, la solución se diluye con 5 ml de agua y 5 ml de cloruro de sodio saturado. Toda la mezcla se deja bajo agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion de TBA. El etanol se añadió subsecuentemente gota a gota, y el producto filamentoso obtenido se disuelve en agua, se dializa y, al final, se liofiliza.

Ejemplo de referencia

20 2: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico (MW 31 kDa) y SN-38 con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente el 10%

Se disuelven 200 mg de SN-38 en 50 ml de DMSO y se añaden 1.00 g de carbonato de etileno a la solución. La solución se calienta hasta 50°C y el desarrollo de la solución se sigue por medio de cromatografía en TLC sobre placas de sílice. Al final de la reacción, el producto se recupera por medio de la precipitación y se seca a temperatura ambiente bajo un alto vacío. Se disuelven 175 mg de intermediario así obtenido en una mezcla anhidra de DMSO/piridina 90:10 con 85 mg de cloruro de p-toluenosulfonilo. Cuando el intermediario ha sido convertido en el toxilato correspondiente, se recupera por precipitación y se disuelve en una solución de HATBA en NMP (0.68 g de polímero en 34 ml de NMP). Toda la mezcla se deja reaccionar durante 7 días a temperatura ambiente. Se añaden 4 ml de una solución saturada de NaCl a la solución y la mezcla se deja bajo agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion de TBA. El etanol se añade subsecuentemente gota a gota, y el producto filamentoso obtenido se disuelve en agua, se dializa y, al final, se liofiliza.

Ejemplo de referencia

3: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con un MW de 55 kDa con vinblastina con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente el 10%

35 Se disuelven 308 mg de vinblastina en 30 ml de cloroformo y 120 mg de ácido 4-bromobutírico y se añaden entonces 150 mg de EDC. Después de un tiempo, se añade agua a la solución para la eliminación del bromuro y carbodiimida. La solución orgánica se anhidrificada por medio de sulfato de sodio y se elimina el solvente en un rotavapor. Se añaden 300 mg de intermediario así obtenido a 1.70 g de HATBA disuelto en NMP anhidro y la solución se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante siete días. Al final, toda la mezcla se deja bajo agitación durante 1 hora con 6 ml de solución saturada de NaCl para permitir el intercambio del sodio con el ion de TBA. El etanol se añade subsecuentemente gota a gota, y el producto filamentoso obtenido se disuelve en agua, se dializa y, al final, se liofiliza.

Ejemplo de referencia

4: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con un MW de 440 kDa y 5-fluorouracilo con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente el 15%

45 Se añaden 680 mg de carbonato de etileno y aproximadamente 10 mg de NaOH a 510 mg de fluorouracilo disuelto en 15 ml de DMF. Toda la mezcla se calienta y la reacción se deja continuar durante 1 hora a temperatura de reflujo. El

5 producto recuperado por precipitación se disuelve en una mezcla anhidra de DMSO/piridina 50/50 con 1.00 g de cloruro de p-toluenosulfonilo. Después de aproximadamente 15 horas, el producto es recuperado por precipitación y se añade a una solución de HATBA disuelto en DMSO (3.60 g en 180 ml de DMSO). La solución se mantiene bajo agitación a 38°C durante aproximadamente 3 días y al final se añaden 20 ml de agua milliQ y 7 ml de una solución saturada de NaCl. Toda la mezcla se deja bajo agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion de TBA. El etanol se añade subsecuentemente gota a gota, y el producto filamentososo obtenido se disuelve en agua, se dializa y se liofiliza.

Ejemplo de referencia

10 5: Preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con un MW de 200 kDa y 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara- C) con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente 180

15 Se disuelven 100 mg de Ara-C, 80 mg de EDC y 69 mg de ácido 4-bromo-butírico en 10 ml de agua. se hace reaccionar toda la mezcla durante aproximadamente 1 hora y al final se elimina el solvente por evaporación bajo presión reducida en un rotavapor. El producto se purifica por medio de separación cromatográfica de columna. El intermediario así obtenido se disuelve en una solución a 20 mg/ml de 1.10 g de HATBA en DMSO y se hacen reaccionar durante 7 días a temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de una solución saturada de NaCl con el fin de recuperar el producto, permitiendo así que la salificación con sodio de los carboxilos de ácido hialurónico. El polímero es precipitado mediante la adición de etanol gota a gota, y después de filtrar y redissolver en agua, se dializa para eliminar los residuos de solvente y sal y finalmente se liofiliza.

Ejemplo de referencia

20 6: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con un peso molecular de 120 kDa y 17β-extradiol con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente el 20%

25 Se disuelven 140 mg de 17β-extradiol se disuelven en 50 ml de DMSO y 380 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), se añaden 262 mg de ácido 4-bromobutírico a la solución. El producto se recupera por precipitación y se purifica por cromatografía en una columna de sílica. El intermediario así obtenido se seca a temperatura ambiente bajo un alto vacío. Se disuelven 0.80 g de sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HATBA) en 40 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a temperatura ambiente. El intermediario se añade a la solución y toda la mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente. Después de 7 días de reacción, la solución se diluye con 5 ml de agua y 5 ml de una solución saturada de cloruro de sodio. Toda la mezcla se deja en agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion TBA. El etanol se añade entonces gota a gota y el producto filamentososo obtenido se disuelve en agua, se dializa y, al final, se liofiliza.

30

Ejemplo de referencia

7: Preparación del éster parcial entre el ácido hialurónico 200 kDa y SN38 y auto-entrecruzamiento de derivado de HA

35 Se disuelven 200 mg de SN38 se disuelven en 50 ml de DMSO y 375 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), se añaden 330 mg de ácido 4-bromobutírico a la solución. El desarrollo de la solución se monitoriza por medio de cromatografía de TLC (fase estacionaria de sílica con indicador de fluorescencia y cloroformo-acetonitrilo 60:40 eluyente). El producto se recupera mediante precipitación y se purifica mediante cromatografía en columna de sílica utilizando cloroformo: metanol 99:1 como eluyente. El intermediario así obtenido se seca a temperatura ambiente bajo alto vacío. Se disuelven 0.84 g de sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HATBA) en 43 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a temperatura ambiente. Después de dejar la solución a reaccionar durante 7 días, se añaden 34 mg de trietilamina a la solución de reacción y toda la mezcla se agita durante 30'.

40

Se añade gota a gota lentamente una solución de 87 mg de yoduro de 2-cloro-1-metil-piridina en 10 ml de DMSO durante un período de 45' y la mezcla se mantiene a 30° durante 15 h.

45 Se añade entonces una solución que consiste de 15 ml de agua y 0.5 g de cloruro de sodio y la mezcla resultante se vierte lentamente en 300 ml de acetona bajo agitación continua. Se forma un precipitado que se filtra y lava tres veces con 25 ml de acetona-agua 5: 1 y tres veces con acetona (50 ml). El producto se seca bajo un alto vacío a 38°C.

Ejemplo de referencia

8: preparación de un derivado de amida de ácido hialurónico de 220 kDa con doxorubicina con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente 5% (Figura 2)

5 Se disuelven 2.00 g de HATBA en 100 ml de DMSO con un bajo contenido de agua. La solución es insuflada con ácido clorhídrico gaseoso hasta que, al eliminar una parte alícuota de la solución y diluyendo con agua 1:10, el pH demuestra estar entre 4.5 y 5. Se añade subsecuentemente carbonildiimidazol (55 mg) a la solución y la mezcla completa se deja bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Al final, se añaden 1,4 g de doxorubicina a la solución y la mezcla se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de una solución saturada de NaCl para recuperar el producto, permitiendo así la salificación con sodio de los carboxilos de ácido hialurónico. El polímero se precipita mediante la adición de etanol gota a gota y, después de filtrarlo y redisolución en agua, se dializa para eliminar los residuos de solvente y sal y finalmente se liofiliza.

Ejemplo de referencia

9: Preparación del éster parcial entre el ácido hialurónico y doxorubicina y el auto-entrecruzamiento con condensación Ugi.

15 Se disuelven 500 mg de polímero obtenido de acuerdo con el ejemplo 8 en 5 ml de agua destilada. El pH de la solución se redujo hasta aproximadamente 4 mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado. Se añaden 15 mg de diclorhidrato de etil éster lisina, se añaden a la solución 250 µl de solución acuosa de formaldehído en 40% y 250 ml de ciclohexilisocianida. Después de 15' de reacción, el gel se pone en diálisis en una solución básica de carbonato de sodio durante aproximadamente 24 h, y al final se dializa frente a agua hasta una conductividad de la solución de menos de 40 µs. El polímero se recupera por liofilización.

20 Ejemplo de referencia

10: preparación de un derivado de éster de ácido hialurónico con un MW de 200 kDa y doxorubicina con un grado de sustitución en el carboxilo de aproximadamente el 10%

25 Se disuelven 325 mg de clorhidrato de doxorubicina en 50 ml de NMP, después de añadir 0.3 ml de Et₃N, se agregan subsecuentemente a la solución 420 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y 280 mg de ácido 4-bromobutírico. El desarrollo de la solución se monitoriza por medio de cromatografía de TLC (fase estacionaria de sílica con indicador de fluorescencia y eluyente diclorometano-metanol 80:20). El producto se purifica por cromatografía en una columna usando cloroformo:metanol 99:1 como eluyente.

30 El intermediario así obtenido se seca a temperatura ambiente bajo alto vacío. Se disuelven 0.75 g de sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico (HATBA) en 40 ml de N-metil-2-pirrolidona (NMP) a temperatura ambiente. Se añade el intermediario a la solución y toda la mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente. Después de 7 días de reacción, la solución se diluye con 5 ml de agua y 5 ml de cloruro de sodio saturado. Toda la mezcla se deja bajo agitación durante 1 hora para permitir el intercambio del sodio con el ion de TBA. El etanol se añade subsecuentemente gota a gota, y el producto filamentoso obtenido se disuelve en agua, se dializa y, al final, se liofiliza.

Experimentación in vitro:

35 Evaluación de la actividad antiproliferativa del conjugado de éster de HA/SN38 que tiene un grado de sustitución igual a 10% y 150, en la línea celular de adenocarcinoma cólico HT29

40 Las alícuotas de los derivados obtenidos a partir de los ejemplos 1 y 2 se caracterizan por medio de una prueba de citotoxicidad in vitro en una línea de células tumorales cólicas llamadas HT29. La comparación se efectuó con SN38 disuelto en DMSO. Los derivados de HA se solubilizan en una solución glucosada al 5% a una concentración de 5 mg/ml. La prueba es efectuada mediante el depósito en una placa con 96 cavidades, 3000 células por cavidad; después de 24 horas de incubación a 37°C, las células se ponen en contacto con las soluciones y después de 48 horas adicionales se determina la vitalidad celular por medio de un ensayo colorimétrico MTT (Dezinot F. et al., J. Immunol Methods, 1986, 22(89):271-277).

45 Las curvas de proliferación que se refieren a los dos conjugados de éster de HA se muestran en las gráficas (a la izquierda la actividad citotóxica del derivado al 15%, a la derecha al 10%), véase la figura 4. Mediante la comparación de los datos de EC₅₀ con SN38 en dimetilsulfóxido (DMSO) se obtienen los siguientes resultados:

Compuesto	EC ₅₀ (nM)
HA-SN38 15%	5.2
HA-SN38 10%	8.5
SN38 in DMSO	5.0

5 Los resultados in vitro confirman que los nuevos derivados de HA/SN38 muestran la misma actividad citotóxica del metabolito activo SN38 que, como se ha descrito anteriormente, tiene de 100 a 1000 veces la actividad de su profármaco comercial, Irinotecan. La experimentación efectuada por lo tanto afirma una eficacia mucho mayor del nuevo derivado con respecto al fármaco de referencia utilizado actualmente en la práctica clínica.

Para demostrar lo que se indica anteriormente con respecto a la eficacia de los nuevos conjugados (objeto de la presente invención) como fármacos antineoplásicos capaces de superar la resistencia farmacológica adquirida por células neoplásicas ya no sensibles al fármaco en sí mismo, se efectuaron los siguientes experimentos in vitro:

10 Prueba de citotoxicidad en células DHD/K12 de la doxorubicina, un fármaco de quimioterapia en comparación con su conjugado de amida con HA

La línea celular utilizada deriva de las tasas de la cepa BDIX tratada con 1,2-dimetilhidrazina. Estas células expresan, de hecho, los mismos antígenos tumorales como el adenocarcinoma de colon-recto humano y, por esta razón, se utilizan como modelo de estudio preclínico in vitro para el mismo tipo de tumor.

15 La línea celular anterior también ha adquirido resistencia al tratamiento con quimioterapia (esto se llama "Resistencia a Múltiples Fármacos": MDR).

20 Con el fin de evaluar el grado de vitalidad celular se utilizó el Ensayo de Vitalidad Celular LIVE/DEAD (Molecular Probes), que permite que las células metabólicamente activas sean distinguidas de las células muertas: estas últimas emite fluorescencia verde en un nivel nuclear mientras que las células vivas emiten fluorescencia roja localizada en la membrana celular y en el citoplasma. Después de la coloración, las células se analizaron usando un microscopio confocal y el porcentaje de células vivas/muertas se evaluó contando un mínimo de 500 células vivas o muertas por muestra.

25 El conjugado de amida de doxorubicina con HA (Hydox) se utilizó para la experimentación, que tiene un grado de sustitución de 5% obtenido de acuerdo con el ejemplo 8, en comparación con el fármaco como tal, a diferentes concentraciones. Figura 3: después de 48 horas de tratamiento, los resultados de la prueba de LIVE/DEAD representados gráficamente en la figura 3, indican claramente cómo el conjugado Hydox es capaz de ejercer, de una manera dependiente de la dosis, un efecto citotóxico en las células que han adquirido una cierta resistencia a la quimioterapia, mucho mayor que la doxorubicina no conjugado correspondiente, que se utiliza bajo las mismas concentraciones. Hydox, de hecho, también demuestra ser activo en concentraciones bajas como 0.25 μ M, mientras que el fármaco de referencia a esta dosificación no tiene ningún efecto citotóxico. En la duplicación de la concentración, el conjugado en cuestión tiene 35% más de citotoxicidad, permitiendo por lo tanto el uso de dosificaciones más bajas de fármacos con menores efectos colaterales en las células que ya no responden a los tratamientos quimioterapéuticos clásicos debido a la resistencia adquirida a los fármacos antineoplásicos anteriores.

30

Reivindicaciones

- 5 1. Conjugados químico-farmacéuticos de ácido hialurónico y/o sus derivados obtenidos a través de un enlazamiento indirecto entre el polisacárido y un fármaco con una acción antitumoral, a través de un espaciador molecular que forma un enlace éster con el grupo carboxílico de HA y/o su derivado, con la condición de que dicho separador no es una hidrazida o un polipéptido, siendo el fármaco una nitrosourea, y el derivado de ácido hialurónico siendo seleccionado de
- HA salificado con bases orgánicas y/o inorgánicas que tiene un peso molecular de 50-730 KDa o un alto peso molecular de 750-1230 KDa;
 - ésteres de HA con alcoholes de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que varía dependiendo del tipo y la longitud del alcohol utilizado, de 1 a 75%;
 - amidas de HA con aminas de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía desde 1 a 10%;
 - derivados O-sulfatados de HA hasta el 4º grado de sulfatación;
 - ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación interna que va desde 0.5 a 10% y preferiblemente 5%;
- 15 - desacetilatos de HA que se derivan de la desacetilación de la fracción de N-acetil-glucosamina con un porcentaje de desacetilación que varía preferiblemente de 0.1 a 30%;
- derivados percarboxilados de HA obtenidos a partir de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que oscila de 0.1 a 100%.
- 20 2. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grado de sustitución en el carboxilo del ácido hialurónico y/o uno de sus derivados varía de 1 a 100%.
3. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico y/o uno de sus derivados tiene un peso molecular que varía de 400 a 3×10^6 Da.
4. Los compuestos químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el ácido hialurónico tiene preferiblemente un peso molecular que varía de 5,000 a 1×10^6 Da.
- 25 5. Los compuestos químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el ácido hialurónico tiene preferiblemente un peso molecular que varía de 30.000 a $0,5 \times 10^6$ Da.
6. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es una sal con bases orgánicas y/o inorgánicas.
- 30 7. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es un éster de ácido hialurónico con alcoholes de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de esterificación no superior a 75%.
8. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es una amida del ácido hialurónico con aminas de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía desde 1 a 10%.
- 35 9. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es un derivado O-sulfatado de ácido hialurónico hasta el cuarto grado de sulfatación.
10. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es un éster interno con un porcentaje de esterificación que varía de 0.5 a 10%.
- 40 11. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico se obtiene por desacetilación de la fracción de N-acetilglucosamina, con un porcentaje de desacetilación que varía de 0.1 a 30%.

12. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de ácido hialurónico es un derivado percarboxilado obtenido por la oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetilglucosamina, con un grado de percarboxilación que varía de 0.1 a 100%.
- 5 13. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el espaciador consiste de una cadena alifática, aralifática, alicíclica, heterocíclica, lineal o ramificada que contiene opcionalmente heteroátomos, que tienen grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amina, epoxi, cloruros de ácidos, tioles, nitrilos, halógenos, anhídridos, isocianatos, e isotiocianatos.
14. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el espaciador está representado por ácidos carboxílicos con un número de átomos de carbono que varían de 2 a 10.
- 10 15. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el separador es ácido bromopropiónico.
16. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el separador es ácido bromobutírico.
- 15 17. Las composiciones farmacéuticas que tienen uno o más de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, como principio activo.
18. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 17 para la administración directa en el sitio de la neoplasia.
19. Biomateriales tridimensionales procesados en forma de hidrogeles, nano y microesferas, fibras hiladas tejidas o no tejidas obtenidas mediante la transformación de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 20. Uso de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones 1-16 para la preparación de composiciones farmacéuticas para ser utilizadas en el campo oncológico.
21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 para el tratamiento local de los tumores del páncreas, mama, colon-recto, pulmón y el sistema respiratorio *in toto*, cabeza-cuello, hígado, estómago, testículos, ovario, endometrio, próstata, vejiga, cerebro, leucemia, linfomas, melanoma, sarcoma de Kaposi, osteosarcoma, neuroblastoma y cáncer de piel.
- 25 22. Biomateriales tridimensionales de acuerdo con la reivindicación 19 para uso en un método para el tratamiento local de los tumores del páncreas, mama, colon-recto, pulmón y el sistema respiratorio *in toto*, cabeza-cuello, hígado, estómago, testículos, ovario, endometrio, próstata, vejiga, cerebro, leucemia, linfomas, melanoma, sarcoma de Kaposi, osteosarcoma, neuroblastoma y cáncer de piel.
- 30 23. Un proceso para la preparación de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones 1-16 por la conjugación indirecta de ácido hialurónico o uno de sus derivados y nitrosourea como el fármaco que tiene una actividad antitumoral por medio de un espaciador que forma un enlace éster con el grupo carboxilo del ácido hialurónico de acuerdo con los siguientes procedimientos alternativos a), b) o c):
- 35 - I a) un grupo funcional del espaciador adecuadamente seleccionado que contiene también un segundo grupo saliente capaz de reaccionar con la función carboxilo del HA, reacciona con un grupo funcional que pertenece a la molécula antitumoral seleccionada;
- II a) la reacción puede requerir posiblemente la activación de una de las funciones involucradas por medio de un agente de activación tal como carbodiimidias;
- 40 - III a) en una segunda fase, por contacto directo con una sal de tetraalquilamonio (preferiblemente tetrabutil amonio) de HA en un ambiente anhidro, el compuesto que consiste del fármaco modificado reacciona dando lugar a una sustitución nucleofílica del grupo saliente en el carboxilo del HA, dando lugar a la formación de un enlace éster entre HA y el espaciador;
- I b) el grupo carboxilo del ácido hialurónico está enlazado por unión nucleofílica a un espaciador adecuado que se enlaza subsecuentemente a una función de la molécula antitumoral;

- l c) el grupo carboxilo de HA se activa con un agente de activación y se hace reaccionar con una función hidroxilo del espaciador adecuadamente seleccionado, previamente o subsecuentemente enlazado al fármaco.

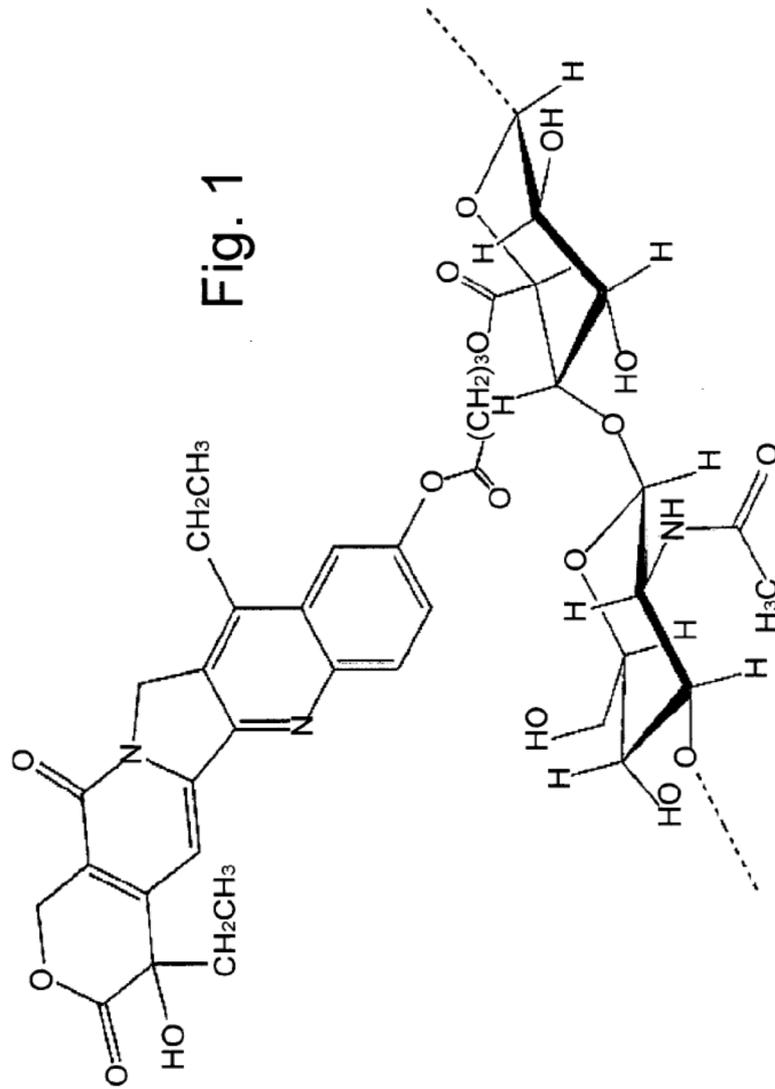
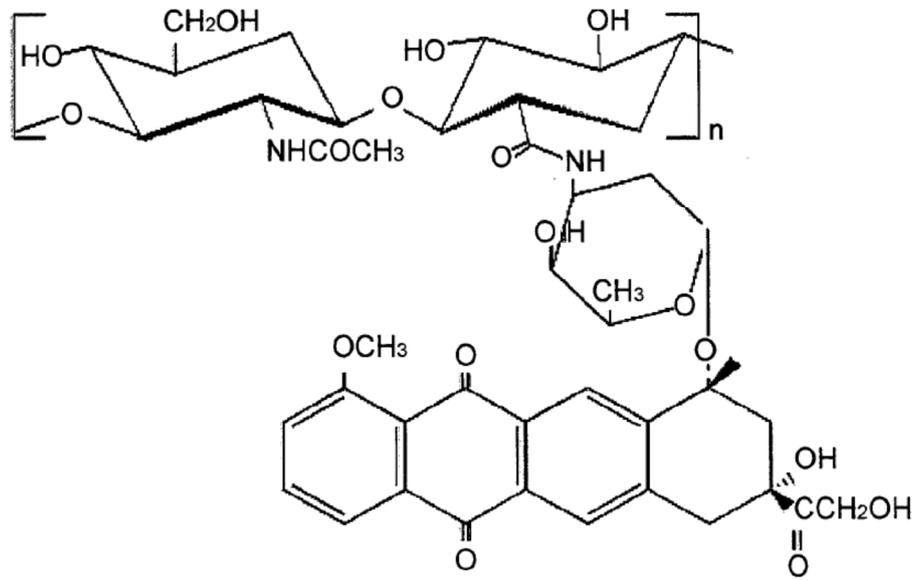


Fig. 2



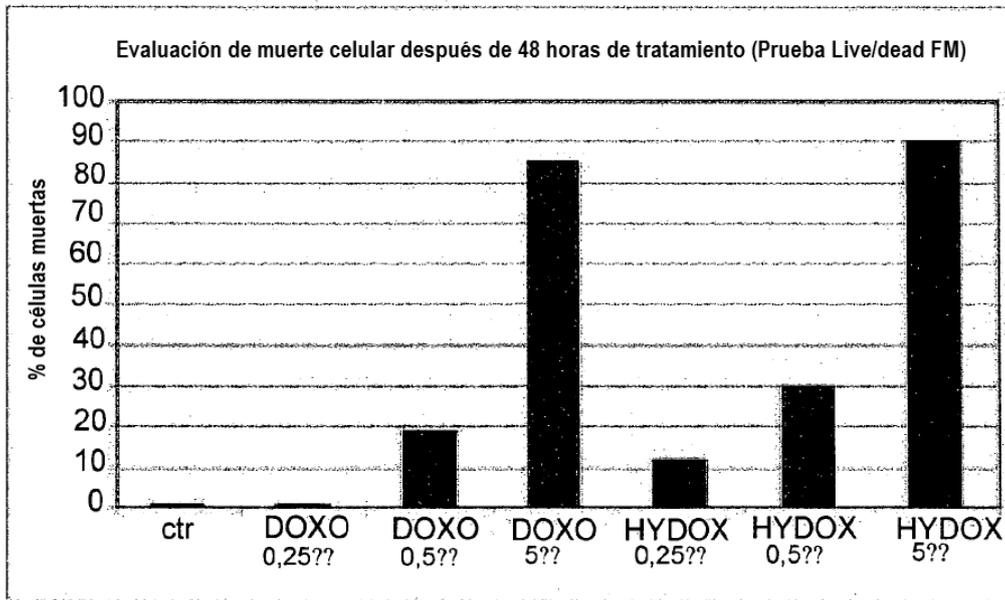


Fig. 3

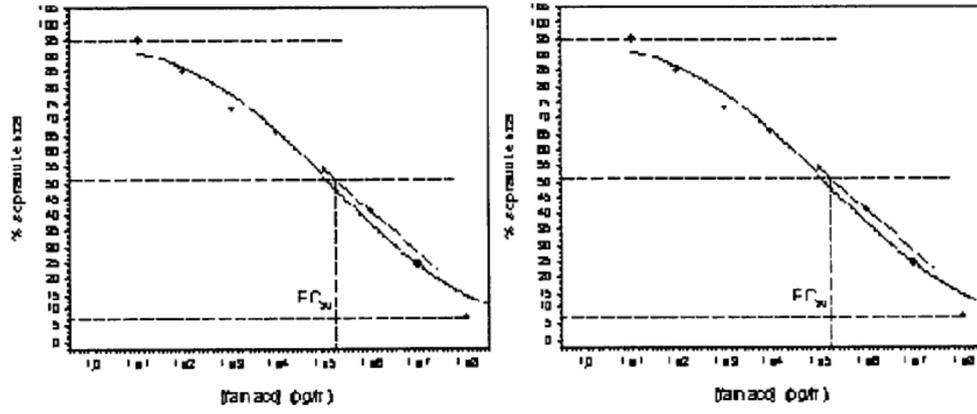


Fig. 4