

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 290**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006** **E 11159629 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2537533**

54 Título: **Bioconjugados antitumorales de ácido hialurónico o sus derivados obtenidos por conjugación química indirecta**

30 Prioridad:

03.08.2005 IT PD20050242

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

20.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RENIER, DAVIDE y
BETTELLA, FABIO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 633 290 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

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.

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:

- 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.

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.

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.

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.

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.

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:

• 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 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).

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.

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).

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).

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).

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.).

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. Además, Ouchi T. et al. En el artículo "Design of polysaccharide-5- fluorouracil conjugates exhibiting antitumor activities" (ACS Symposium Series, American Chemical Society / Oxford University Press, US 469, 15 de agosto de 1991, páginas 71-83) divulga conjugados de ácido hialurónico a 5-fluoroacil a través de un espaciador molecular que forma un enlace amida con el grupo carboxílico de HA. También el documento EP0506976 divulga conjugados de ácido hialurónico a 5-fluoroacil o arabinósido de citosina a través de un enlace amida con el grupo carboxílico de HA. El documento WO2004/035629 divulga conjugados de ácido hialurónico y/o sus derivados a taxol a través de un espaciador molecular que forma un enlace éster o amida con el grupo carboxílico de HA y/o su derivado.

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).

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 tales como, por ejemplo, productos análogos de pirimidina, 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.

5 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.

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.

10 Descripción detallada de la invención

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.

15 En particular, son objeto de la presente conjugados químico-farmacéuticos 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, 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 un alcaloide seleccionado de vincristina, vinblastina y el metabolito activo de irinotecan SN38; en donde el grado de sustitución en el carboxilo de ácido hialurónico y/o uno de sus derivados varía entre 1 y 20%; siendo dichos derivados del ácido hialurónico seleccionados de

- HA salificado con bases orgánicas y/o inorgánicas que tienen un peso molecular de 50-730 KDa o un peso molecular alto de 750-1230 KDa;

25 - 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 longitud del alcohol utilizado, del 1 al 75%;

- amidas de HA con aminas de las series alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación que varía entre 1 y 10%;

- derivados O-sulfatados de HA hasta el 4º grado de sulfatación;

- ésteres internos de HA con un porcentaje de esterificación interno que varía entre 0.5 y 10% y preferentemente 5%;

30 - desacetilatos de HA derivados de la desacetilación de la fracción de N-acetil-glucosamina con un porcentaje de desacetilación preferiblemente que varía entre 0.1 a 30%;

- derivados percarboxilados de HA obtenidos de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación que varía entre 0.1 a 100%.

35 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.

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,

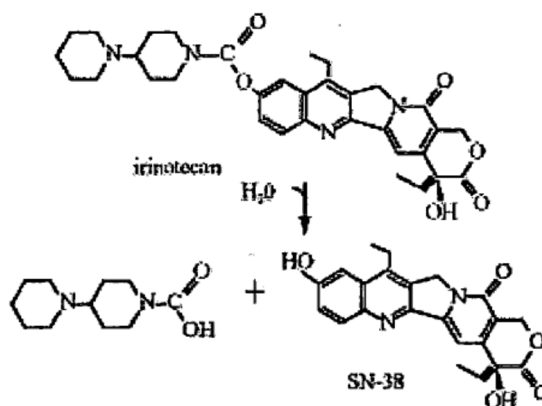
• características mecánicas y reológicas,

45 • 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).

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.

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 varias 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 de 1 a 20%.

5 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);

10 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);

4. Los derivados O-sulfatados de HA hasta el 4º grado de sulfatación (EP 0702699 B1);

15 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);

20 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 categoría:

25 ■ antimetabolitos: tales como, por ejemplo, productos análogos de ácido fólico (entre los cuales metotrexato), productos análogos de pirimidina (entre los cuales fluorouracilo y 1-β-D-Arabino-furanosilcitosina: Ara-C).

Un producto análogo de pirimidina tal como fluorouracilo y Ara-C es particularmente adecuado para los propósitos de la presente invención.

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:

30 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 carbodiimidas). En una segunda fase, por contacto directo con una sal de tetra-alquilamonio (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;

35 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);

40 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).

45 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 (sin límites) 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.

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

Ejemplo 1: 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%

- 10 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 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 filamentosos obtenido se disuelve en agua, se dializa y se liofiliza.
- 15

Ejemplo 2: 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

- 20 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.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Conjugados químico-farmacéuticos de ácido hialurónico y/o sus derivados obtenidos a través de un enlace 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 espaciador no es una hidrazida o un polipéptido, siendo el fármaco seleccionado de antimetabolitos, el grado de sustitución en el carboxilo del ácido hialurónico y/o uno de sus derivados que varía entre 1 y 20%; siendo dichos derivados del ácido hialurónico seleccionados 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;
2. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fármaco es un antimetabolito que consiste de un producto análogo de pirimidina tal como fluorouracilo y Ara-C.
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.
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 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.
7. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el espaciador está representado por ácidos carboxílicos con un número de átomos de carbono que varían de 2 a 10.
8. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el espaciador es ácido bromopropiónico.
9. Los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el espaciador es ácido bromobutírico.
10. Composiciones farmacéuticas que tienen uno o más de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, como principio activo.
11. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 10, para administración oral, intravenosa, intraarterial, intratecal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarticular, tópica, transdérmica o para administración directa en el sitio de la neoplasia.
12. Conjugado químico-farmacéutico de acuerdo con la reivindicación 1 transformado en biomateriales tridimensionales procesados en forma de hidrogeles, nano y microesferas, fibras hiladas tejidas o no tejidas.
13. Uso de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 para la preparación de composiciones farmacéuticas para ser utilizadas en el campo oncológico.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 para el tratamiento sistémico o 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.
- 5 15. Un proceso para la preparación de los conjugados químico-farmacéuticos de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 por la conjugación indirecta de ácido hialurónico o uno de sus derivados y un 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):
- 10 - 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 carbodiimidas;
- 15 - III a) en una segunda fase, por contacto directo con una sal de tetra-alquilamonio (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;
- 20 - I 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.