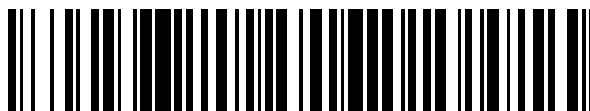


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 179**

51 Int. Cl.:

A61K 47/58	(2007.01)
A61K 47/69	(2007.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/32	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2004 PCT/JP2004/000993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2004 WO04103409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004 E 04707295 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 1627645**

54 Título: **Agente antitumoral y proceso para producir el mismo**

30 Prioridad:

26.05.2003 JP 2003147852

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**MAEDA, HIROSHI (100.0%)
21-24, KOTO 3-CHOME
KUMAMOTO-SHI, KUMAMOTO 862-090, JP**

72 Inventor/es:

**MAEDA, HIROSHI y
GREISH, KHALED**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 642 179 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

Agente antitumoral y proceso para producir el mismo

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un grupo de agentes antitumorales poliméricos, que forman complejos de micelas de alto peso molecular, que tienen capacidad de marcaje como diana de tumores y retención a largo plazo en el tumor, exhibiendo de esta manera tratamiento de cáncer altamente eficaz con efectos secundarios ampliamente reducidos a los órganos y tejidos normales.

10

De forma más precisa, la presente invención se refiere a agentes antitumorales poliméricos de alto peso molecular, que forman complejos de micelas de alto peso molecular por unión molecular o interacción de agentes antitumorales de bajo peso molecular, tales como antraciclina o derivado de platino con copolímero de estireno-ácido maleico (en lo sucesivo en el presente documento denominado SMA, por sus siglas en inglés).

15

La presente invención también se refiere al método para fabricar los mismos.

20

Antecedentes de la tecnología

Desde el descubrimiento de la doxorubicina (adriamicina...Fórmula (1)) en 1969 por Di Marco y su colaborador (Cancer Chemotherapy Reports, Parte 1, 53, 33-41, 1969), la clase de los agentes antitumorales de antraciclina se expandió ampliamente. En 1979 se descubrió la pirarrubicina (THP-adriamicina...Fórmula (2)) por Umezawa et al durante una búsqueda de nuevos antibióticos de antraciclina. Entre los compuestos 4'-O-sustituídos, la THP-adriamicina tiene menos toxicidad que otros agentes antitumorales de antraciclina (Gan To Kagaku Ryoho, 15, 2819-27, 1988).

25

Los antibióticos de antraciclina se conocen por su potente efecto citotóxico que se sabe que implica múltiples mecanismos de muerte celular. La generación del radical oxígeno por el grupo quinona en su molécula promueve su propiedad intercalante del ADN y los mecanismos inhibitorios de la topoisomerasa. Todos estos efectos dan lugar a potente muerte de las células cancerígenas. La pirarrubicina, siendo relativamente un nuevo miembro de este grupo, tiene su acción única inhibitoria de la síntesis de ADN y ARN, más activa que la doxorubicina, con cardiotoxicidad reducida.

30

35

Desafortunadamente el efecto citotóxico de estos agentes antitumorales de bajo peso molecular, tales como antraciclina o cis-platino, como muchos otros, carecen de especificidad por las células cancerígenas lo que da lugar a graves efectos secundarios particularmente hacia las células rápidamente en división tales como las células de la médula ósea y las células del tracto gastrointestinal. Además, afectan crónicamente a tejidos de división más lenta o más estables tales como los tejidos cardíaco y hepático. Estos efectos secundarios son los principales factores que limitan la escala de dosis de tales fármacos potentes.

40

Para eliminar tales efectos secundarios de estos agentes antitumorales, la distribución tisular del fármaco juega un papel crucial. Los presentes inventores descubrieron que el peso molecular de los fármacos es clave para la cuestión, es decir los fármacos de bajos pesos moleculares, por ejemplo, un tamaño molecular menor de 10 kDa, se distribuyen rápidamente en diversos tejidos orgánicos normales o en tejidos tumorales indiscriminadamente a través de difusión simple y se eliminan al final en la bilis por el hígado y/o en la orina a través de la excreción renal. En el caso de la doxorubicina y la pirarrubicina con un peso molecular de 543,5 y 627,6, respectivamente, su distribución en los órganos normales, es decir los tejidos cardíaco o de la médula ósea, limitan el uso eficaz a una dosis alta de estos fármacos de bajo peso molecular para la erradicación tumoral completa.

50

Problemas a resolverse

Esta situación de toxicidad y efectividad llega a ser un gran contraste entre los fármacos de alto peso molecular frente a los fármacos de bajo peso molecular. Es decir los fármacos macromoleculares de tamaño por encima de 40 kDa, donde tales fármacos se acumulan y se mantienen más en el tejido tumoral durante un largo tiempo debido al único fenómeno del tejido tumoral, que descubrieron los presentes inventores hace algún tiempo: es decir efecto de permeabilidad y retención potenciados (EPR, por sus siglas en inglés) de los fármacos macromoleculares o lipídicos en los tumores sólidos (Cancer Res., 44, 2115-2121, 1984; ibid, 46, 6387-92, 1986; Anticancer Res., 13, 1287-1292, 1993).

55

60

El fenómeno EPR se atribuye a las alteraciones anatómicas y fisiopatológicas en los tejidos tumorales, tales como la densidad vascular aumentada por la angiogénesis, la carencia de capa de músculo liso en los vasos de tumores sólidos y la recuperación linfática dañada. Los cambios fisiopatológicos en el tumor sólido están provocados por la producción extensa de mediadores vasculares tales como la bradiquinina, óxido nítrico, prostaglandinas, metaloproteinasas de la matriz (MMP), VEGF / VPF y otros que resultan en la potenciación del efecto EPR que no se

65

ven en los tejidos normales (por ejemplo Cancer Res., 58, 159-165, 1995; J. Control. Release, 74, 47-61, 2001; Advan. Enzyme Regul., 41, 189-207, 2001).

5 Anteriormente, los presentes inventores habían desarrollado el primer fármaco conjugado SMA polimérico [poli(estireno-co-anhídrido maleico semi n-butilato)] unido covalentemente al agente antitumoral proteico, neocarzinostatina (NCS), que se denomina SMANCS (Patente japonesa (JP) N.º 1.549.302, JP 1.545.131, JP 2.556.865 y Patente U.S. 2.556.865). Este fue el primer fármaco polimérico antitumoral en el mundo.

10 El SMA confiere características farmacológicas únicas características cuando se compara con los fármacos parentales de bajo peso molecular. Concretamente, los conjugados SMA podrían ser capaces de unirse rápidamente de forma no covalente a la albúmina y por lo tanto conferirían tropismo tumoral por el efecto EPR en virtud del aumento del peso molecular, por lo tanto tienen excelente capacidad de marcaje del tumor como diana.

15 En segundo lugar, tiene inmunopotenciación (Oda T. et al., Proc. Soc. Exp Biol. Med., 181,9-17, 1986; Masuda E y H Maeda, Cancer Res., 56, 1868-1873, 1996). Greish Khaled et al, (Drug Delivery Systems, vol. 18, n.º 3, 10 de mayo de 2003, página 254) desvela micelas de complejo SMA-antraciclina (pirarrubicina o doxorubicina), donde la antraciclina se une a SMA a través de un enlace covalente.

20 Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención se dirigen a un método para mejorar la capacidad de marcaje selectivo como diana de tumores sólidos de los agentes antitumorales tales como antraciclinas que afectan adversamente a las células normales, reduciendo en consecuencia los efectos secundarios. Cuando se intentó que el polímero de SMA se fijara a los agentes antitumorales, se obtuvo un único agente antitumoral polimérico; estos fármacos formaban complejos micelares de tal manera que se comportan como un polímero e indican el efecto EPR más extensamente, dando como resultado un efecto antitumoral mejorado y menores efectos secundarios y además mejor estabilidad a temperatura ambiente, al contrario que SMANCS que se prepara por polimerización basado en el mero enlace covalente de SMA y NCS.

30 Los fármacos distintos de la antraciclina, tales como el cis-platino, forman complejos micelares poliméricos combinándolos con SMA, estos agentes antitumorales poliméricos obtenidos de esta manera también tienen capacidad de marcaje como diana de tumores.

35 Brevemente, la presente invención se refiere a un agente antitumoral polimérico, que forma un complejo micelar polimérico combinando el agente antitumoral de bajo peso molecular con SMA, de acuerdo con las reivindicaciones. Más preferentemente, la presente invención se refiere a un agente antitumoral polimérico, que forma un complejo micelar polimérico combinando SMA y agentes antitumorales de antraciclinas, tales como pirarrubicina, doxorubicina o cis-platino.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un cromatograma en gel que indica el aumento del tamaño molecular de la pirarrubicina después de su unión con SMA.

45 La Figura 2 muestra el cambio de la intensidad de fluorescencia a la misma concentración molar que el complejo SMA-pirarrubicina contra pirarrubicina libre sola.

La Figura 3 muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia del complejo SMA-pirarrubicina en H₂O y en SDS al 10 % (dodecil sulfato sódico).

La Figura 4 muestra la liberación dependiente de tiempo de la pirarrubicina del complejo SMA-pirarrubicina *in vitro* en medio acuoso a diferentes pH y en etanol.

50 La Figura 5 muestra el efecto citotóxico *in vitro* de la pirarrubicina y la doxorubicina libres y sus complejos micelares SMA contra la línea celular de cáncer de colon humano SW 480 después de 3 días de cultivo.

La Figura 6 muestra el efecto antitumoral *in vivo* de SMA-pirarrubicina y SMA-doxorubicina en ratones ddY que llevan sarcoma de ratón S-180 a dosis variables;

55 La Figura 7 muestra la supervivencia de animales tratados con el complejo SMA-pirarrubicina y pirarrubicina libre.

La Figura 8 muestra el efecto de supresión del crecimiento de SMA-pirarrubicina en ratones ddY que llevan sarcoma de ratón S-180.

60 La Figura 9 es un cromatograma en gel que indica el aumento del tamaño molecular del cis-platino después de la formación de la micela. La Figura 10 indica la citotoxicidad del complejo micelar SMA-cis-platino a la célula tumoral mamaria de humano después de tres días de cultivo celular, en comparación con aquella del cis-platino libre.

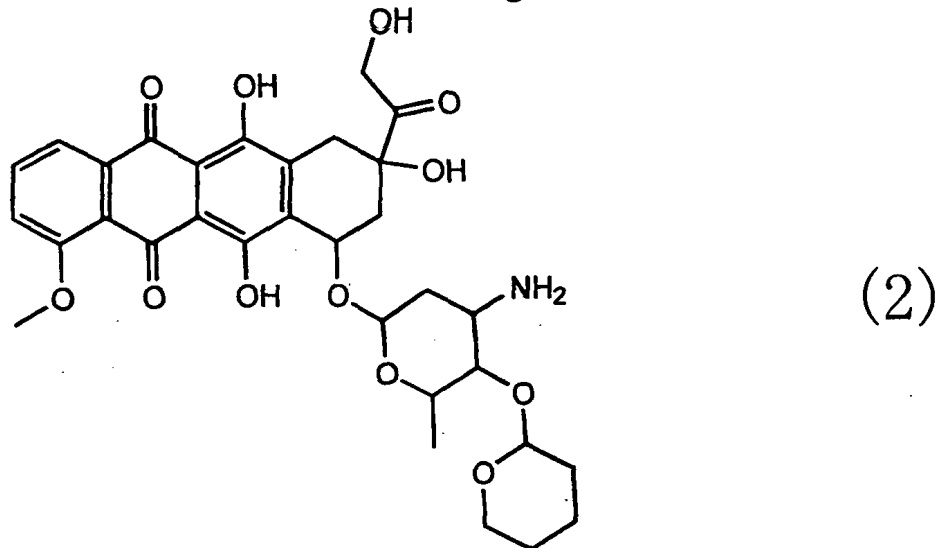
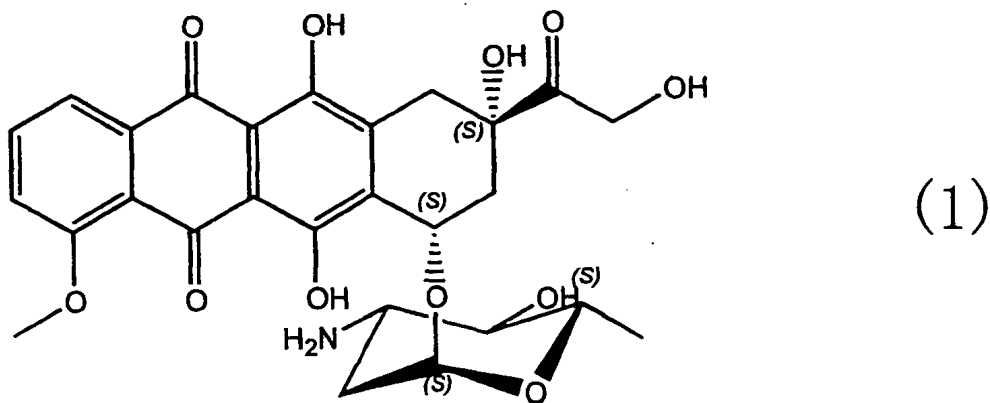
La Figura 11 es un cromatograma en gel que indica el aumento del tamaño molecular del taxol después de que formara complejo micelar con SMA. En la figura, "A" es el complejo micelar SMA-taxol, "B" es taxol libre; "C" es SMA libre.

65 La Figura 12 indica el cambio en la intensidad de fluorescencia del taxol libre, el SMA libre y el complejo micelar SMA-taxol en solución acuosa y solución de DSS al 10 %.

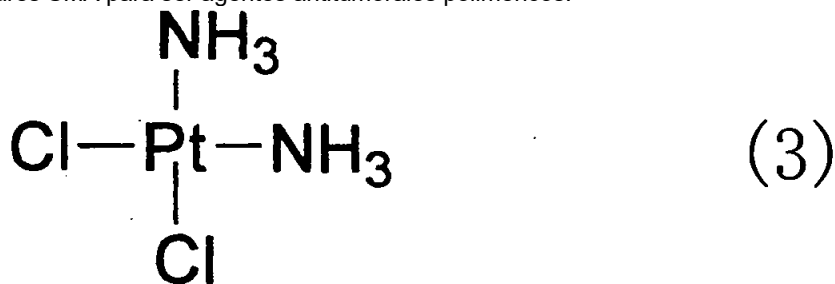
Realización más preferible para llevar a cabo la invención

5 Aunque el agente antitumoral de bajo peso molecular usado en la presente invención no se restringe siempre que forme complejo micelar polimérico con SMA, de acuerdo con las reivindicaciones, se prefieren agentes antitumorales de antraciclinas. Los antitumorales de antraciclinas son antibióticos que tienen la estructura glucósido de 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftasenquinona de los cuales la estructura se ilustra en la Fórmula (1) y (2).

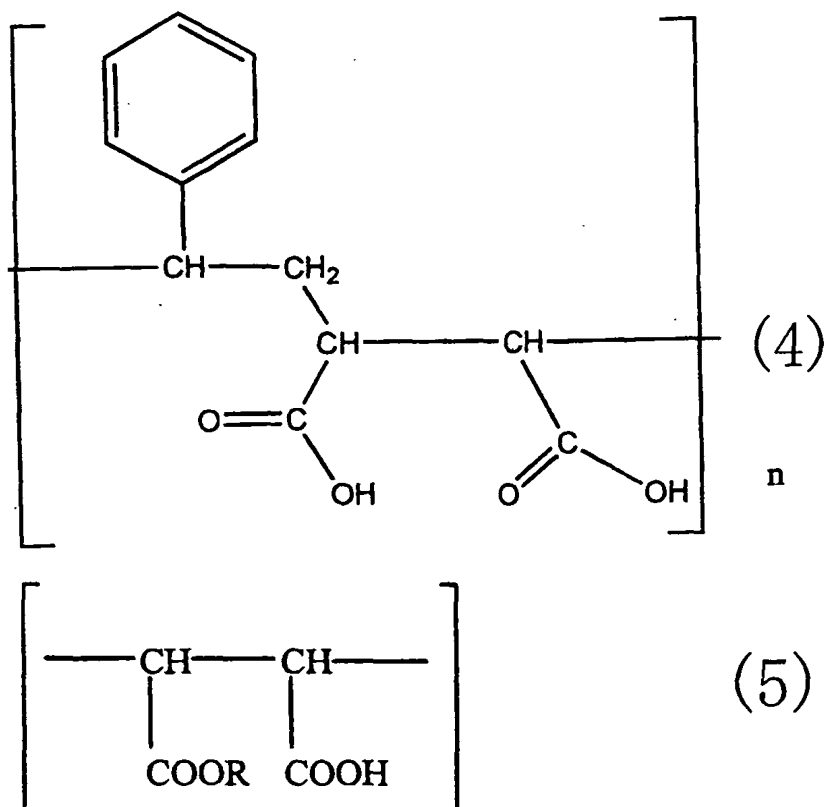
10 Los ejemplos de Antraciclinas pueden ser pirarrubicina, doxorubicina, epirubicina, daunorubicina o acrabicina. Entre ellos, la doxorubicina (Fórmula (1)) y la pirarrubicina (Fórmula (2)), son los más preferidos.



15 El cis diamina dicloro platino ilustrado por la Fórmula (3), es un agente antitumoral denominado cis-platino. Un quelato de metal pesado tal, así como los alcaloides tales como camptotecina, taxol y similares también pueden formar complejos micelares SMA para ser agentes antitumorales poliméricos.



20 El SMA que es el agente polimerizante en la presente invención se obtiene por copolimerización de estireno con ácido maleico. Ya que el SMA es un copolímero que tiene estireno y ácido maleico como ingrediente indispensable, tiene básicamente la unidad monomérica de estireno mostrada por la fórmula (4), pero la unidad monomérica de ácido maleico puede ser parcialmente semi ésteres de alquilo o de acilo o anhídrido maleico como se muestra por la fórmula (5) (Maeda H. et al., J. Med.Chem, 28, 455-61, 1980).



5 (R en la fórmula (5) es un resto alquilo o acilo de 1~4 carbonos). En la presente invención, puede usarse favorablemente copolímero de estireno semi esterizado con alquilo-ácido maleico, del que una parte de R es un resto butilo.

10 Aunque el SMA puede tener diversos intervalos de peso molecular, el tamaño más preferible de SMA usado como agente de polimerización en la presente invención es de trímero (aproximadamente 660 Da) a por encima de 40 kDa.

15 Aunque se han desarrollado muchos complejos o conjugados de doxorrubicina, no se ha informado el uso de SMA como el nuevo vehículo polimérico o formador de micelas. Como se ejemplifica por SMANCS, el SMA sería ventajoso sobre los polímeros existentes, debido a las siguientes razones.

- 20 (1) El término de descomposición medio en la concentración en plasma puede extenderse ampliamente anionizando por polianión.
- (2) El complejo se vuelve lipófilo debido a la lipofilidad del estireno de manera que pueden prepararse fármacos oleaginosos/por vía oral.
- (3) Pueden ser fármacos hidrófilos así como fármacos lipófilos.
- (4) Puede unirse a la albúmina de tal manera que se comporte como un polímero de peso molecular de poco menos de diez kiloDaltons a unos pocos cientos de kiloDaltons de tal manera que el efecto EPR aumente
- 25 adicionalmente.
- (5) es anfífilo de tal manera que tiene alta capacidad de formación de micelas.
- (6) Tiene capacidad de activación inmune.
- (7) Este complejo micelar tiene gran capacidad de carga de fármaco.
- (8) Puede producirse a través de un proceso sencillo.
- 30 (9) Puede mejorar la estabilidad.

El SMA, también tiene múltiples grupos carboxílicos funcionales (por ejemplo ~14 grupos por cadena de 7 unidades de repetición), que pueden utilizarse para reaccionar para reticular con grupos amino o hidroxilo de múltiples compuestos. Otra ventaja añadida de los fármacos poliméricos de SMA-antraciclina de la presente invención se

35 refiere a sus características linfótropas adquiridas que los vuelven ventajosos contra la metástasis linfática. Concretamente, se observó alta distribución en los linfáticos (H. Maeda et al, Gann, 73, 278-284, 1982).

Este copolímero de estireno y ácido maleico tiene propiedades biológicas favorables tales como capacidad de rápidamente hacer enlaces no covalentes con la albúmina (Kobayashi et al., J. Bioactiv. Compat. Polymer, 3, 319-

333, 1988), tropismo tumoral (Maeda H., Matsumura Y., Cancer Res., 46, 6387-6392, 1986) e inmunopotenciación (Oda T. et al., Proc. Soc. Ex.Biol. Med., 181, 9-17, 1986).

5 Además de sus propiedades fisicoquímicas como siendo de naturaleza anfífila, el SMA facilitó la toma celular altamente potenciada debido a la existencia de estireno y ácido maleico (Oda T. et al, J. Nat. Cancer Inst., 79, 1205-1211, 1987).

10 En la reacción del SMA con fármacos de bajo peso molecular, pueden usarse diversos derivados de SMA, tales como la forma bicarboxi maleilo así como la forma anhidro, o semi ésteres de alquilo o acilo de anhídrido maleico. La reacción puede llevarse a cabo también después de hidrólisis o alcoholólisis. El método de preparación de complejos micelares de alto peso molecular por la reacción de SMA con fármacos de bajo peso molecular se explica tomando el caso del agente antitumoral antraciclina.

15 El SMA hidrolizado en solución acuosa alcalina y el agente antitumoral se disuelven en solución acuosa, se añade carbodiimida hidrosoluble a la mezcla, se deja reaccionar a pH de 7 o menor, preferentemente a un pH de 2-5, en agitación. Por la reacción de sustracción entre el grupo amino de la antraciclina y el radical carboxilo del SMA, se logra un enlace amida, un enlace éster o un enlace no covalente, tal como un enlace iónico o un enlace de hidrógeno.

20 Un enlace no covalente, tal como un enlace iónico o un enlace de hidrógeno también puede lograrse por la reacción en presencia de aminoácidos o poliamina en la mezcla a pH 7 o menor pH, preferentemente a un pH de 2-5, en agitación.

25 Se usan L-arginina, L-ornitina o lisina como aminoácido, entre ellos es más preferible la L-arginina. La espamina y la espamidina son las más preferibles entre la poliamina.

30 Después el pH se eleva por encima de 8 preferentemente 10-12 para desprotonar grupos amino libres. Finalmente el pH se ajusta a 6-8 usando HCl 0,1 M. Se sigue con la recuperación del polímero por ultrafiltración y/o cromatografía en columna. Durante este procedimiento las micelas de SMA atrapan fármacos de bajo peso molecular, procederán cambios conformacionales acompañantes e interacción molecular, produciendo de esta manera la forma micelar.

35 Como se describe anteriormente, el agente antitumoral polimérico en la presente invención no requiere ningún aditivo, tales como tensoactivos, para la formación de micelas. En presencia de poliamina, el agente antitumoral y el SMA solos se usan para la formación micelar estable del complejo micelar SMA-agente antitumoral. El proceso de reacción de condensación por deshidratación no se necesita para formar complejos micelares. Esta es una de las ventajas de la presente invención.

40 El complejo micelar polimérico de la presente invención puede formarse por la reacción de fármacos de bajo peso molecular y SMA (hidrolizado), de tal manera que el fármaco se atrapa en la micela. En algunos casos, el fármaco se une a través de reticulado por enlace covalente con SMA, por enlace iónico o bien por enlace no iónico directamente. Sin embargo no es necesario estar unido químicamente (unión covalente en la estructura amida).

45 El complejo micelar de SMA obtenido de esta manera tiene propiedades farmacológicas únicas en comparación con los agentes antitumorales de bajo peso molecular parentales. Primeramente, tiene capacidad de transporte selectivo a los tejidos tumorales y capacidad de liberación a largo plazo verificados por el efecto EPR, por lo tanto, se consigue alta concentración terapéutica en los tejidos tumorales con alta durabilidad. Además, asegura las funciones fisiológicas de los órganos y tejidos críticos normales, tales como el tejido cardíaco, la médula ósea o el riñón. No existe en agentes antitumorales de bajo peso molecular parentales. También se confirmó la mayor seguridad en modelos animales como se describe en el presente documento.

50 El complejo SMA-micela de acuerdo con la presente invención tiene la capacidad de unirse a las proteínas plasmáticas, tales como la albúmina, la fibrina o la lipoproteína, predominantemente, forma enlaces no covalentes rápidamente con la albúmina. Tras la inyección iv (inyección intravenosa) del fármaco de la presente invención, el tiempo de retención en la sangre circulada se prolonga remarcablemente.

55 La adición de naturaleza hidrófoba da un amplio intervalo de posibilidades de formulación, por ejemplo, la formulación acuosa para iv y la formulación oleaginoso, especialmente la formación de lipodol para la administración intra arterial u oral y pueden aplicarse diversos métodos de administración diferentes. La carga negativa permitiría una vida media *in vivo* prolongada en comparación con los polímeros positivamente cargados que habitualmente tienen una vida media *in vivo* muy corta.

60 El peso molecular aparente del complejo micelar en la presente invención puede ser mayor que 10 kDa, preferentemente mayor que 50 kDa para el fin de la invención. El peso molecular aparente se define como el complejo a través de afinidad mutua inter molecular, determinado por el método de tamiz molecular, el método de ultrafiltración, el método de ultracentrifugación o el método de dispersión de luz en la solución.

Tras la reacción de ambos constituyentes, es decir SMA y bien pirarrubicina o doxorubicina, se espera que se sometan a una reacción de reticulado y a cambios conformacionales que resulten en un peso molecular aparente >10 kDa. El aumento adicional en el peso molecular aparente puede observarse después de la inyección iv debido al enlace no covalente a la albúmina. El aumento en el tamaño molecular aparente resultará en un área bajo la curva (AUC) de concentración en plasma más amplia. Esto significa la duración prolongada de la acción sin eliminación y da lugar al efecto EPR observado, la alta acumulación de fármaco en los tejidos tumorales, es decir varias veces el nivel en plasma y mucho más que el tejido normal así como periodo prolongado de la acción del fármaco. En consecuencia, esto resulta en el aumento del efecto antitumoral a la vez que los efectos secundarios sistémicos muy reducidos.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Preparación de complejos micelares de SMA pirarrubicina

(1) Se disolvieron 10 mg/ml de SMA en 10 ml de agua y el pH se ajustó a 12 y se calentó a 50 °C durante 4 horas para obtener SMA hidrolizado.

(2) Se añadió pirarrubicina a una concentración final de 10 mg/ml en H₂O (10 ml) y se mezcló con una barra magnética en un vaso de precipitados de 100 ml a temperatura ambiente.

(3) El pH de la mezcla se reajustó a 5 en agitación con adición gota a gota de HCl 0,01 M. Etil-dimetilaminopropil carbodiimida (EDAC), (Sigma Chemical, St.Louis, MO,

EE.UU.), se añadió después a 10 mg/ml (10 ml de volumen total/final) en 10 alícuotas, cada adición con intervalos de 2 minutos y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Se formarán precipitados coloreados que pueden recogerse por centrifugación o filtración. El rendimiento basado en pirarrubicina es el 99 %. (4) Los precipitados se lavaron con agua ácida fría (pH menor de 5,0) 2 veces y después se disolvieron en H₂O ajustando el pH a 10, después bajándolo a pH 7. Se siguió con diálisis con tubo Visking y ultrafiltración con membrana de corte de 10 kDa ((Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.) para concentrar a volumen 1/10. Este último proceso se repitió 3 veces; cada vez con un volumen 10-x contra agua destilada. Después el contenido (5 ml) se sometió a cromatografía de filtración en gel usando una columna Sephadex G-50 Fine (3 x 52 cm) seguido de liofilización. El rendimiento después de la liofilización fue 140 mg: ~aproximadamente el 70 %; en peso basado en SMA y pirarrubicina, el 80 % basado en el peso de pirarrubicina.

[Ejemplo 2]

Determinación de las características fisicoquímicas y bioquímicas de la invención;

(1) Cromatografía en gel

La cromatografía por filtración de gel usando Sephadex G-50 Fino (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) se llevó a cabo para demostrar el cambio en el peso molecular después de la reacción de complejación con SMA. El tamaño de columna usado fue $\Phi 3 \times 52$ cm, con tampón bicarbonato de hidrógeno sódico 0,25 M (pH 8,24) como fase móvil. Cada volumen de fracción fue 6,5 ml. Como se muestra en la Figura 1, el tamaño molecular del complejo SMA mostró un tamaño mucho más grande en comparación con tanto la pirarrubicina libre como el SMA libre.

(2) Espectro de fluorescencia

Los compuestos de antraciclina libres o sin unir mostraron un espectro de emisión de fluorescencia intenso con picos tanto en 550 nm como en 590 nm cuando se excitaron a 480 nm. Esta fluorescencia se inactiva en gran medida cuando las moléculas están en vecindad de estrecha interacción con polímeros grandes tales como en micelas, o cápsulas lipídicas en el caso del liposoma debido a la transferencia de energía a los restos aromáticos en la micela, el liposoma o el medio lipídico, dando como resultado la inactivación eficaz o la fluorescencia suprimida. Como se muestra en la Figura 2 el espectro de fluorescencia del complejo SMA pirarrubicina se inactivó en gran medida cuando se compara con la forma libre. Por lo tanto, el espectro de fluorescencia (intensidad) inactivado podría usarse para probar el encierro de la pirarrubicina en la micela, o el contacto muy cercano con el resto aromático del SMA.

La intensidad de fluorescencia inactivada por la unión con SMA se regeneró cuando las micelas se expusieron a dodecil sulfato sódico (SDS) al 10 % como se muestra en la Figura 4. Estos fenómenos apoyan la formación del complejo micelar de SMA a través de enlaces no covalentes. Debido a que el SDS rompería la asociación hidrófoba de la micela entre la antraciclina y el resto estirénico del SMA. Concretamente, la intensidad de fluorescencia de los conjugados/complejos SMA-pirarrubicina o SMA-doxorrubicina se vuelven comparables a aquellas de la pirarrubicina libre o la doxorubicina libre tras la rotura de las micelas por exposición en solución de SDS como se muestra en la Figura 3.

De manera similar, la exposición de las micelas a etanol, que rompe la unión no covalente de las micelas SMA-fármaco, hizo la fluorescencia tan intensa como los fármacos libres, similar a la exposición a la solución de SDS.

(3) Liberación del fármaco libre de la bolsa de diálisis: prueba de la naturaleza macromolecular aparente del complejo SMA-fármaco.

Es de importancia que los fármacos poliméricos de gran peso molecular que tienen un peso molecular aparente mayor de 10.000, preferentemente más de 50 kDa tal como las micelas de SMA-antraciclina, ejerzan el efecto

EPR de búsqueda tumoral y de esta manera en última instancia liberan el fármaco libre. Para verificar que los complejos de fármaco de la presente invención liberan el fármaco libre de la micela o el conjugado polimérico *in vitro*, 20 mg de conjugados SMA-doxorrubicina o SMA-pirarrubicina se disolvieron en 5 ml de H₂O y se colocaron en bolsas de diálisis selladas (P.M de corte 1.000; Spectrapor, Spectrum Laboratories Inc. CA. EE.UU.). La bolsa de diálisis se sumergió en 25 ml de H₂O con pH ajustado bien a 7,4 para simular la sangre en circulación o bien pH 5,5 para el tejido tumoral, usando NaOH 0,01 M y HCl 0,01 M y se incubaron a 37 °C durante varios días en oscuridad. En esta configuración el fármaco libre, bien doxorrubicina o pirarrubicina en sí mismas, se extravasó del tubo de diálisis en unas pocas horas. La pirarrubicina o doxorrubicina liberadas fuera de la bolsa de diálisis se recogieron en un tiempo pre-determinado y la cantidad se cuantificó por absorbancia a 480 nm. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, la velocidad de liberación en tal condición fue muy lenta; aproximadamente un 3 % al día con una liberación relativamente mayor a pH más bajo para ambos compuestos indicando la estabilidad de la micela de conjugado en circulación. Cuando la solución externa se reemplazó por etanol la velocidad de liberación aumentó tremendamente indicando la rotura de la interacción hidrófoba en el complejo entre las antraciclina y el resto hidrófobo de estireno del SMA. Uno puede contemplar que este ambiente hidrófobo sería más cercano al endosoma después de la internalización de la micela polimérica en el citoplasma de una célula cancerígena por endocitosis. Por lo tanto, la alta velocidad de liberación de fármaco se llevaría aproximadamente por el medio lipófilo más ácido de los tejidos malignos después de la internalización endocitótica.

(4) Análisis elemental

Los análisis elementales del complejo SMA-pirarrubicina después de la purificación (precipitación fraccional, ultrafiltración y cromatografía en columna) para H, C, N y O en la micela probaron el porcentaje de la composición de los 2 constituyentes principales de la micela (SMA y bien doxorrubicina o pirarrubicina). Los resultados están de acuerdo con los datos del espectrofotómetro que miden la absorbancia a 480 nm.

25 [Ejemplo 3] Citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* del complejo micelar de SMA-(doxorubicina o pirarrubicina) se determinó por el método que usa bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (ensayo MTT) tanto con células SW480 de cáncer de colon humano como con células HeLa de cáncer cervical humano. Se pusieron en placa en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, EE.UU.) a una densidad celular de 3000 células/pocillo. Las células se cultivaron durante toda la noche en medio de Eagle modificado de Dulbecco con suero bovino fetal al 10 % en aire al 95 % y CO₂ al 5 %. Las células SW480 y HeLa se incubaron después en presencia de doxorubicina nativa, pirarrubicina o sus complejos SMA durante 72 horas. La citotoxicidad se cuantificó después como la fracción de células supervivientes con respecto a los controles sin tratar con fármaco (Figura 5).

Como se muestra en la Figura 5, SMA-pirarrubicina exhibieron efectos citotóxicos casi similares *in vitro* a aquellas líneas celulares cuando se comparan con pirarrubicina libre (es decir, 85-100 %). La actividad citotóxica de las micelas SMA-doxorrubicina fueron considerablemente menores que la de la doxorubicina libre (aproximadamente el 40 %) que puede atribuirse a la mayor propiedad hidrófoba de la doxorubicina que tiene menor velocidad de liberación, retrasando de esta manera la liberación de fármaco libre disponible para las células en el medio de cultivo. En conclusión los complejos poliméricos de SMA-antraciclina tienen actividad potencial comparable a los fármacos parentales libres, o en caso de la doxorubicina, la actividad fue menor que el fármaco libre como se ve en la Doxorubicina.

45 [Ejemplo 4] Actividades antitumorales *in vivo*

Se usaron ratones ddY machos de 6 semanas de edad. Se implantaron células de sarcoma S180 (2 x 10⁶ células por ratón) s.c. en la piel dorsal. Los días 7-10 después de la inoculación del tumor cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 5-7 mm, pero no eran evidentes áreas necróticas, se iniciaron los tratamientos por la concentración deseada de doxorubicina, pirarrubicina o sus complejos de SMA. Los fármacos se disolvieron en agua destilada y se administraron iv a la vena de la cola de los ratones de acuerdo con horarios predeterminados (Véase la Figura 7). El crecimiento de los tumores se monitorizó cada 2 días midiendo el volumen tumoral. Como se muestra en la Figura 7, la supresión del crecimiento tumoral del complejo SMA-pirarrubicina fue más activa que del complejo SMA-doxorrubicina.

La tasa de supervivencia de los ratones que recibieron SMA-pirarrubicina y pirarrubicina libre se muestra en la Figura 7.

Es digno de mención que los ratones recibieron dosis de 20 o 40 mg/kg de peso corporal de pirarrubicina libre equivalente de complejo SMA durante 4 días consecutivos, todos los tumores retrocedieron completamente. Obviamente todos los animales tratados sobrevivieron al 100 % durante más de 6 meses. Todos los animales que recibieron 20 mg/kg de peso corporal de pirarrubicina o doxorubicina libres, como dosis equivalente usada para el complejo, murieron en 1 semana debido a la toxicidad (Figura 7). La erradicación completa del tumor en todos los animales obtenida con esta invención no tiene precedentes con la mayoría, si no todos, los distintos agentes antitumorales.

[Ejemplo 5] Modelo de tumor sinérgico en ratones

Similar al Ejemplo 4 anterior, se realizó otro experimento usando modelo de ratón inmunológicamente singénico/tumor. El tumor usado fue el adenocarcinoma de colon 38 originado del cáncer de colon. El tejido tumoral de células tumorales de colon 38 en bloque de aproximadamente 30 mg/sitio se implantó bilateralmente en la piel dorsal de ratones C57 BL. Después de 14 días cuando el tumor sólido es palpable con tamaño de ~

100 mm de diámetro, se iniciaron los tratamientos de fármaco usando complejo equivalente de pirarrubicina 50 mg/kg en una única dosis administrada i.v. Los resultados mostraron que el 100 % de los animales alcanzaron la recuperación total después de 2 semanas de tratamiento, demostrando además la potencialidad prometedora de aquellos agentes. Los resultados se muestran en la Figura 8.

[Ejemplo 6] Efecto secundario potencial de los complejos micelares de SMA-Pirarrubicina y SMA-Doxorrubicina.

Se usaron ratones que llevan S-180 con tumores de aproximadamente 5-7 mm de diámetro para este estudio. Se realizó el análisis de sangre completa semanalmente durante 4 semanas antes y después de 1, 2 y 3 semanas de inyecciones iv bien de doxorrubicina, pirarrubicina o bien sus complejos micelares con SMA como se describe anteriormente. La bioquímica de sangre incluyendo, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), deshidrogenasa láctica (LDH) y creatina fosfoquinasa (CPK) se midieron a 36 h después de la administración i.v. de bien fármacos libres o complejos micelares SMA.

Al mismo tiempo, los tejidos de corazón, bazo, hígado y riñón se tiñeron con hematoxilina-eosina (tinción H&E) para la determinación de la toxicidad tisular citológica. Los fármacos micelares no mostraron toxicidad hasta 100 mg/kg de peso corporal cuando se administraron en inyecciones de 4 veces (25 mg/kg x 4) durante una semana, o 70 mg/kg cuando se administraron como una única dosis. El recuento sanguíneo, las funciones cardíacas y hepáticas en los animales que recibieron los fármacos micelares de complejos no mostraron diferencia significativa de cualquier animal control tratado con fármacos.

La Tabla 1 muestra un ejemplo de recuento de sangre completa de animales durante 3 semanas después de la administración de fármaco, recibiendo i.v. 10 mg/kg de pirarrubicina libre frente a animales que reciben 20 mg/kg de complejo SMA-pirarrubicina (20 mg/kg de equivalente pirarrubicina libre), en comparación con control sin fármaco en ratones. Nótese la seguridad remarcable de los fármacos de la presente invención que los hace altamente prometedores para las pruebas clínicas.

[Tabla 1]

	Toxicidad hematológica de la pirarrubicina libre y el complejo SMA-pirarrubicina						
	Control	Pirarrubicina libre 10 mg/kg			Complejo SMA-pirarrubicina equivalente como 20 mg/kg de pirarrubicina		
		1 semana	2 semanas	3 semanas	1 semana	2 semanas	3 semanas
Leucocito (/mm ³)	8012 ±565	2533 ±108	5000	4500	6016,7 ±576,8	5900 ±754,7	6366,6 ±675
Hemoglobina (g/dl)	14,9 ±0,46	11,1 ±0,9	12,1	15,7	15 ±0,9	14,1 ±0,56	15,9 ±0,12
Eritrocito (x 10.000/mm ³)	898 ±35	490,6 ±144	876	916	973 ±57,8	861 ±27,4	837,5 ±39,3
Trombocito (x 1,00/mm ³)	132,9 ±5,4	67,7 ±0,9	130	143	141,3 ±5,6	130,3 ±3,8	120 ±11,5
Tasa de supervivencia (%)	100	100	25	25	100	100	100

±: Desviación estándar

[Ejemplo 7] Cambio en el peso molecular del cis-platino

El complejo SMA-cis-platino se preparó con SMA y cis-platino del mismo modo que en el ejemplo 1 y se determinó el cambio de su peso molecular.

(1) Cromatografía en gel

Sephadex G-50 Fino (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) se usó para la cromatografía en gel en la siguiente condición:

- Fase móvil; solución tampón bicarbonato sódico 0,25 M (pH 8,24)
- Tamaño de columna; 45 x 1,5 cm
- Volumen de cada fracción; 4 ml

Se determinó el peso molecular antes y después de la formación del complejo SMA-cis-platino.

El resultado se muestra en la Figura 9, que indica un aumento en el peso molecular a través de la formación de complejo SMA-micela.

5

(2) Determinación de la permeabilidad de membrana a través de la membrana del tamiz molecular

La permeabilidad del complejo SMA cis-platino y el cis-platino libre se determinó con una membrana de tamiz molecular de máximo 3 kDa.

10

El resultado se muestra en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Concentración de cis-platino libre después de la ultrafiltración a través de membrana de máximo 3 kDa		
	Cis-platino libre	Complejo SMA cis-platino
% Permeado a través de la membrana de 3 kDa	100	1,4
% No permeado a través de la membrana de 3 kDa	0	98,6

La concentración de cis-platino libre se determinó con el método colorimétrico de o-fenilendiamina a 720 nm

15

[EJEMPLO 8] Citotoxicidad del complejo micelar de SMA cis-platino y cis-platino libre

Se incubaron células de cáncer mamario humano en solución de complejo micelar SMA-cisplatino (25 y 50 µg/ml) en un tubo de ensayo durante 72 horas del mismo modo que el ejemplo 3.

20

La citotoxicidad se expresó como una relación de células que sobrevivieron junto con aquellas de sin fármaco y cis-platino libre en la Figura 10. El complejo micelar SMA cis-platino indicó su toxicidad contra las células tumorales anteriormente descritas en el mismo grado que el cis-platino libre.

25 [Ejemplo 9] Complejo micelar SMA-taxol

(1) Formación de micela SMA-taxol

Se examinó la evidencia de la formación micelar de SMA-taxol haciendo reaccionar las siguientes mezclas en la misma condición que en la formación de micelas SMA-pirarrubicina.

30

- (a) SMA + Taxol solo
- (b) SMA + Taxol + EDAC

35 Este procedimiento (a) no mostró formación de micela incluso después de 24 h, es decir, (Opaco/turbio) indicado el estado insoluble. En el procedimiento (b) se volvió transparente en 6-12 h, se sugiere la formación de micelas.

La preparación hecha en el procedimiento (b), no pasó a través de la membrana de ultrafiltración (UF-10, corte 10 kDa).

40

(2) Cromatografía en gel

La cromatografía por filtración en gel usando Sephadex G-50 se llevó a cabo para demostrar el cambio en el peso molecular después de la reacción de complejación con SMA, del mismo modo que el Ejemplo 2.

45

La condición de filtración en gel es la misma que el Ejemplo 2, excepto que, el tamaño de columna usado fue 52x1,5 cm, con tampón bicarbonato de hidrógeno sódico 0,2 M (pH 8,1) como fase móvil. La micela SMA-taxol eluyó a un volumen vacío indicando el tamaño más grande que 10 kDa. El resultado se muestra en la Figura 11. La sustancia de peso molecular patrón en la parte superior de la Figura 11 es BSA (albúmina de suero bovino) (67,5 kDa) y rojo fenol (354 kDa).

50

Esto se validó además por cromatografía en columna G-150.

(3) Espectro de fluorescencia

55

El análisis del espectro de fluorescencia se sometió a complejo micelar SMA-taxol del mismo modo que el Ejemplo 2-(2). Como se muestra en la Figura 12 (a), el taxol libre tiene un pico a 525 nm en el espectro de fluorescencia, pero el complejo micelar SMA-taxol carece del pico en la Figura 12 (c). Sin embargo cuando la micela se transfirió a dodecil sulfato sódico al 15 %, el espectro apareció de nuevo (Figura 12 (c) línea punteada). Esto indica que la unión

entre SMA y taxol es no covalente pero forma complejos micelares. La intensidad de fluorescencia del propio SMA en solución de SDS es casi la misma que en solución acuosa. Esto sugiere que el SDS cambió la unión de SMA-taxol.

5 **Aplicabilidad Industrial**

10 El agente antitumoral de acuerdo con la presente invención, tomando ventaja del efecto EPR, puede mejorar el efecto del tratamiento del cáncer y reducir los efectos secundarios a los órganos y tejidos normales en un gran grado, formando complejos de micelas de alto peso molecular de SMA y un agente antitumoral de bajo peso molecular que en sí mismo tiene fuerte efecto antitumoral pero poco marcaje como diana selectiva de las células tumorales.

15 En la presente invención, pueden formarse complejos micelares estables a partir de SMA, agentes antitumorales y poliaminas. El complejo se comporta como si fuera un polímero de 10 kDa o de mayor peso molecular en el cuerpo humano. Además cuando se une a la albúmina a través de enlace no covalente, indica un aumento aparente en el peso molecular, de tal manera que puede concentrarse en las células tumorales. Como resultado la presente invención permite un efecto antitumoral diez veces más fuerte que el agente antitumoral de bajo peso molecular contra diversos cánceres con mínimos efectos secundarios, de tal manera que es un fármaco terapéutico prometedor para el cáncer sólido.

20

REIVINDICACIONES

1. Un agente anti-tumoral polimérico, que comprende un copolímero de estireno ácido maleico (SMA) y un agente anti-tumoral, **caracterizado por que** el peso molecular del agente anti-tumoral es menos de 10 kDa, de tal manera que el agente anti-tumoral polimérico forma un complejo micelar polimérico, en el que el agente anti-tumoral se une al SMA a través de un enlace no covalente y el agente anti-tumoral se atrapa en la micela.
2. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente anti-tumoral de bajo peso molecular es una antraciclina.
3. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación 2, donde la antraciclina es doxorubicina o pirarubicina.
4. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente anti-tumoral es cis-platino o un alcaloide.
5. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, donde el peso molecular del agente anti-tumoral polimérico es mayor que 10 kDa.
6. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, donde la unidad de monómero de ácido maleico es parcialmente un semi éster de alquilo o acilo o es anhídrido maleico.
7. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación 6, donde la unidad de monómero de ácido maleico está semi esterizada con un resto alquilo o acilo de 1 a 4 átomos de carbono.
8. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde el copolímero de estireno ácido maleico (SMA) está semi esterizado con alquilo, donde una parte de los grupos alquilo es butilo.
9. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con la reivindicación una de las reivindicaciones 1 a 8, donde el peso molecular del copolímero de estireno ácido maleico (SMA) es de 660 Da a 40 kDa o más.
10. Un método de preparación para el agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:
- disolver un copolímero de estireno ácido maleico y un agente anti-tumoral en agua en presencia de carbodiimida hidrosoluble, aminoácidos o poliamina a un pH de 7 o menor, para obtener una solución acuosa; después
 - aumentar el pH a más de 8 para desprotonar los grupos amino libres; seguido de
 - neutralización; y finalmente
 - recuperar una fracción polimérica por un proceso de separación polimérico.
11. El método de la reivindicación 10, donde la disolución se lleva a cabo a pH 2-5, preferentemente en agitación.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, donde el aumento de pH se lleva a cabo hasta pH 10-12.
13. El método de una de las reivindicaciones 10 a 12, donde la recuperación se lleva a cabo usando ultra-filtración y/o cromatografía en columna.
14. El agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de tratamiento de cáncer.
15. Uso del agente anti-tumoral polimérico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Figura 1

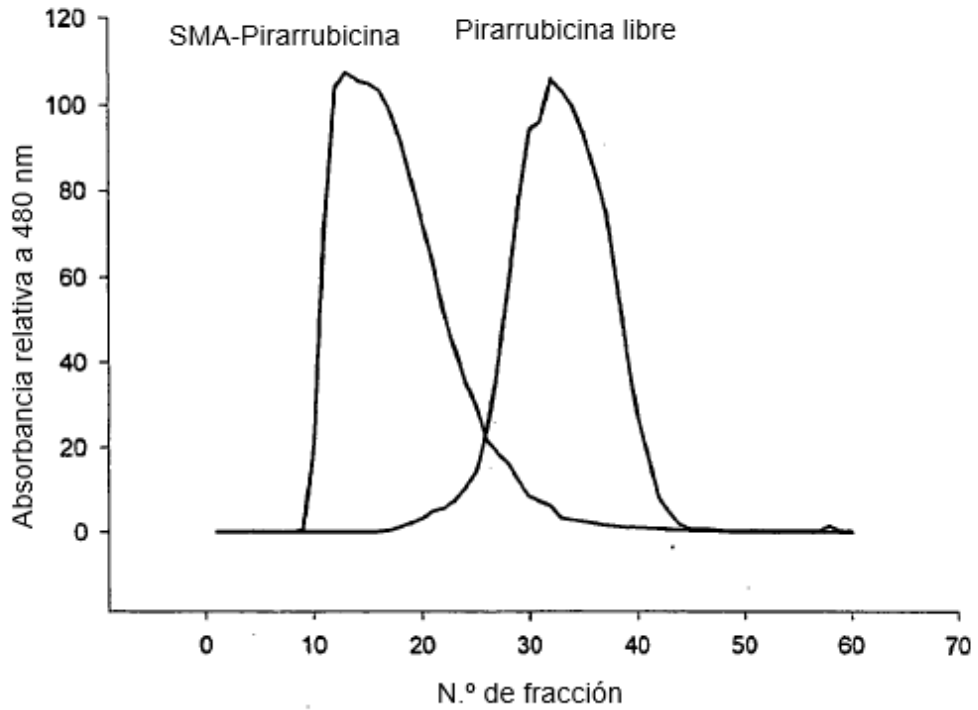


Figura 2

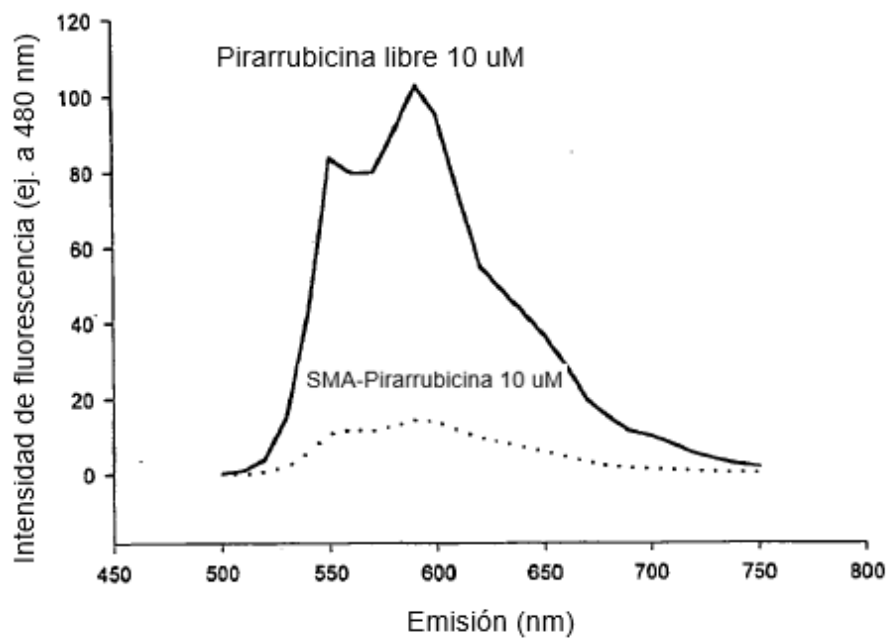


Figura 3

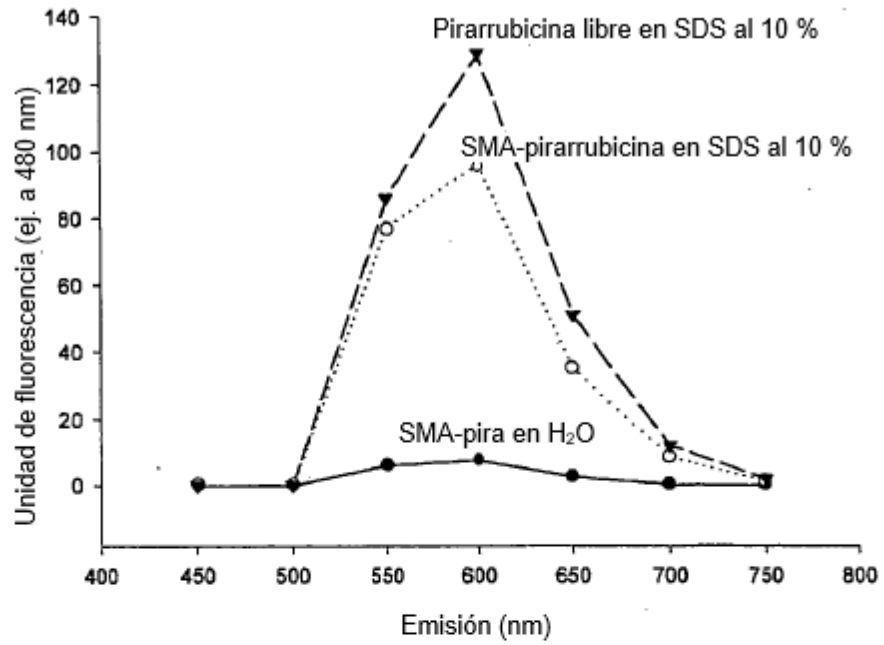


Figura 4

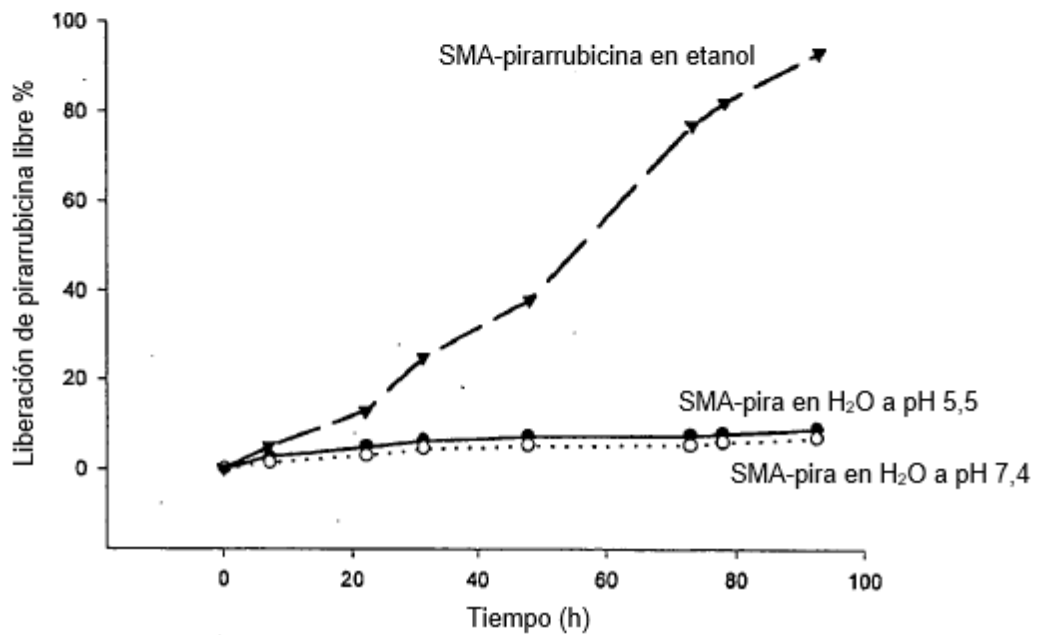


Figura 5

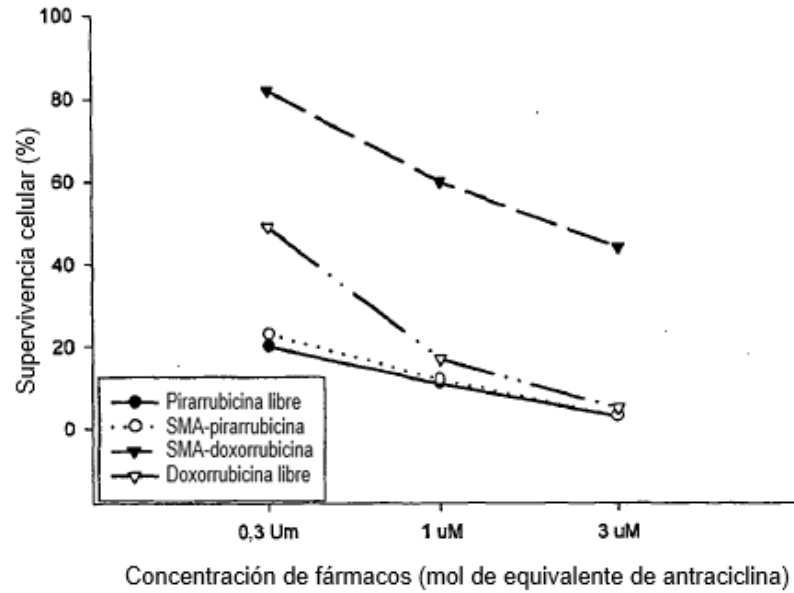


Figura 6

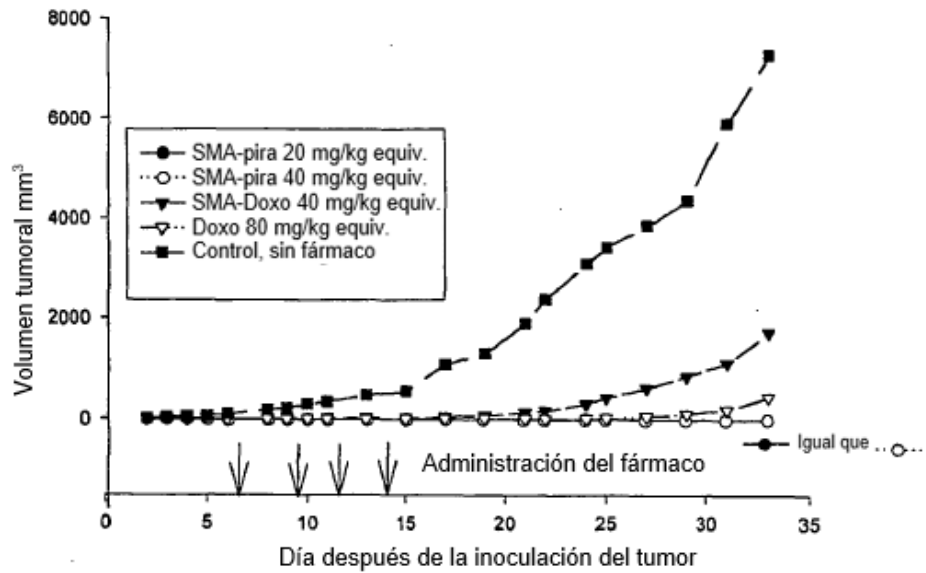


Figura 7

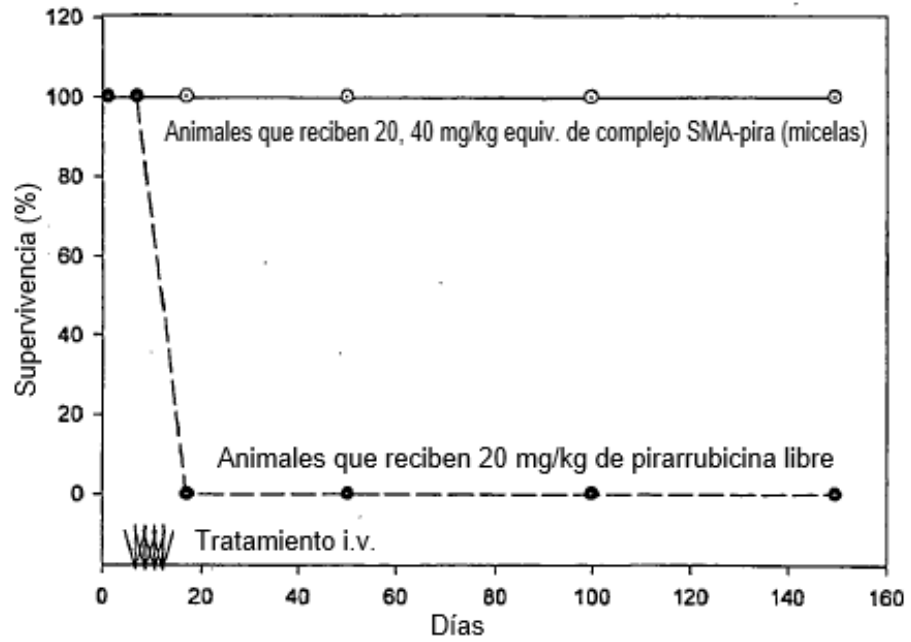


Figura 8

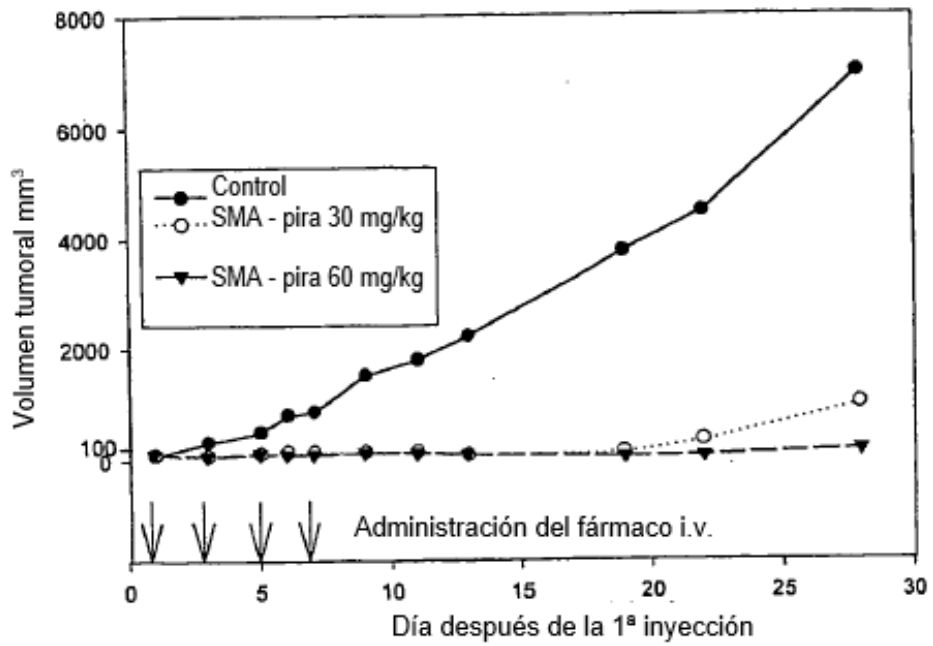


Figura 9

第9圖

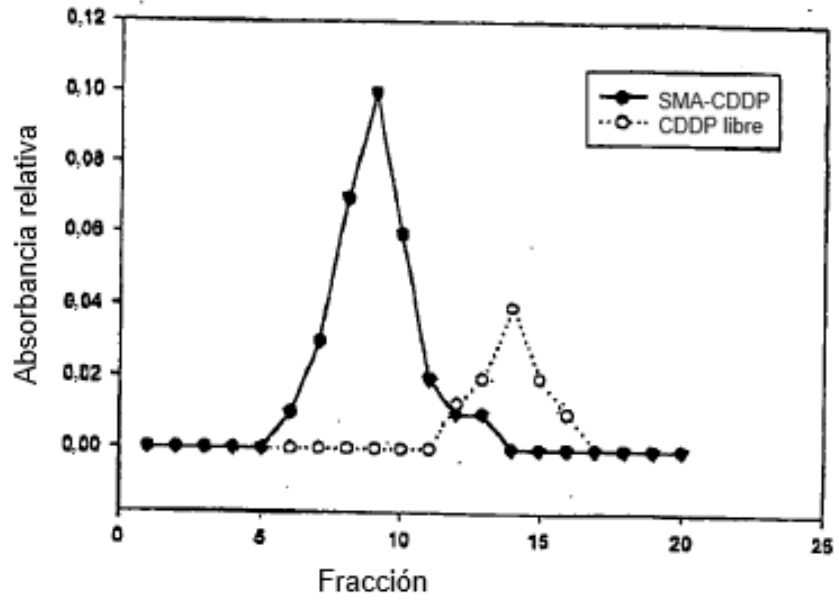


Figura 10

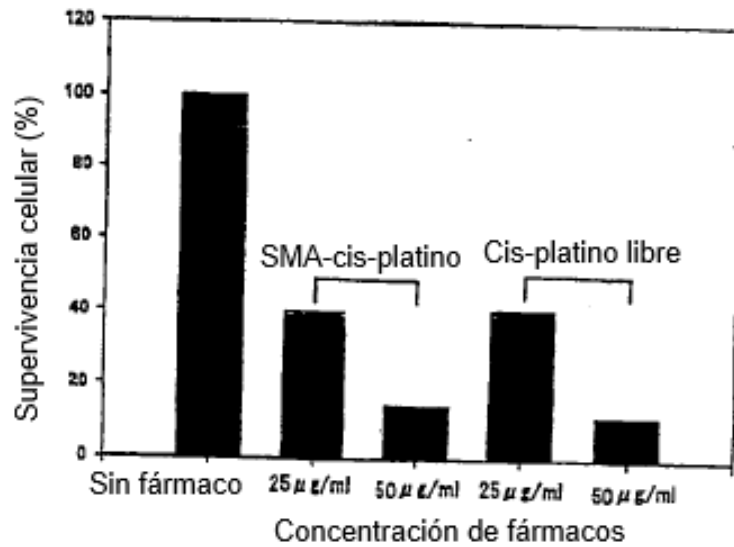


Figura 11

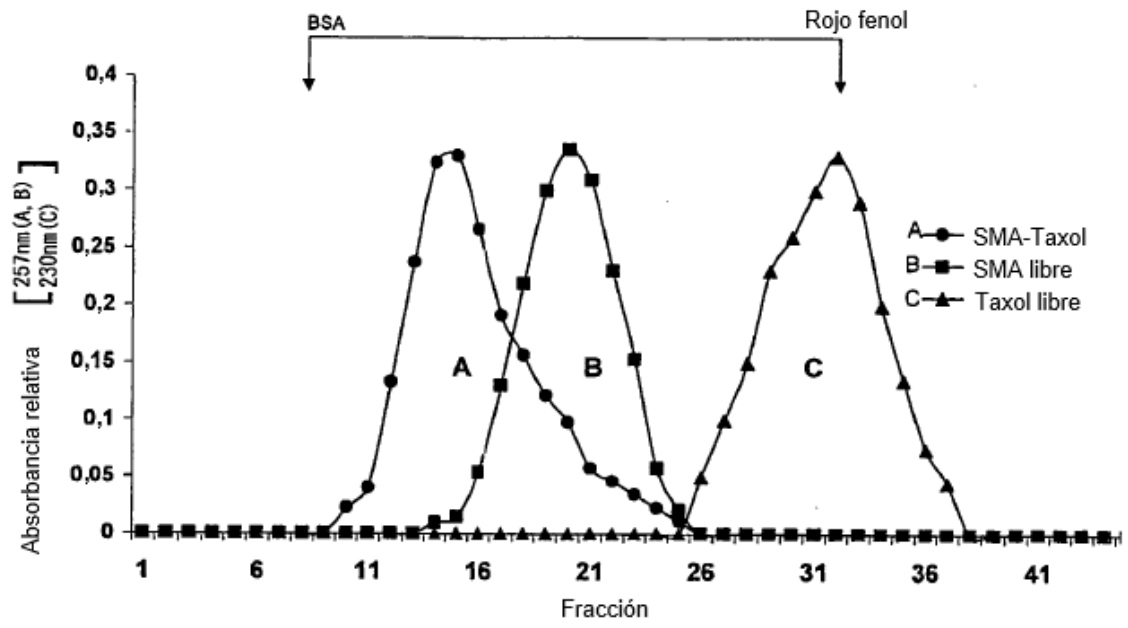


Figura 12

