

CONJUGADOS POLIMÉRICOS Y SU UTILIZACIÓN COMO NANOMEDICINAS ANTICANCERÍGENAS

*Silvia Tamborero y María J. Vicent**
Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia.
E-mail: mjvicent@cipf.es

Independientemente del descubrimiento de nuevos fármacos para dianas farmacológicas bien establecidas, el compromiso de la ciencia con la sociedad demanda del desarrollo de análogos macromoleculares que mejoren las posibilidades terapéuticas de los fármacos existentes aportando una mayor actividad biológica y una mayor especificidad. Se postula, cada vez con más fuerza, que la aplicación de la nanotecnología a la medicina es la clave para conseguir las mejoras necesarias tanto en diagnóstico como en terapia anticancerígena 1 . Para poder distinguirlos de otros productos biotecnológicos como proteínas y anticuerpos, los nanofármacos han sido definidos como ...sistemas complejos de escala nanométrica constituidos al menos por dos componentes, siendo uno de ellos el agente bioactivo... 2 . Con varios conjugados polímero-proteína en el mercado y más de 11 conjugados polímero-fármaco en fase clínica, los polímeros terapéuticos pueden ser considerados como una de las primeras nanomedicinas poliméricas 3 . Es importante mencionar que aunque este artículo se centra en el uso de conjugados poliméricos como anticancerígenos, su aplicación clínica es mucho más amplia habiendo sido descritos como posibles inmunomoduladores, agentes antiviricos o fármacos para reconstitución enzimática entre otros 3 .

Introducción

Estadísticas proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud' (OMS) (<http://www.who.int>) nos revelan que cada 4 segundos muere una persona de cáncer, cada 11 segundos una de SIDA y cada 86 segundos una de Alzheimer. Es por tanto obvia para éstas y otras enfermedades degenerativas, crónicas o quimioresistentes la urgente necesidad de mejores tratamientos. Actualmente, el desarrollo de nuevas terapias se aborda desde dos aproximaciones diferentes. Por un lado, la investigación en genómica y proteómica está posibilitando la identificación de nuevas dianas moleculares específicas de tumor 4 . En teoría, una estructura química distintiva que ajuste de forma perfecta con una única diana farmacológica debería aportar eficacia terapéutica sin toxicidad. Sin embargo, en la práctica está siendo realmente difícil encontrar o sintetizar tal fármaco perfecto , en particular fármacos con aplicación en tratamientos de tumores sólidos comunes tales como el cáncer de mama, próstata, pulmón o gastrointestinal. Aún sin un marcado éxito, cabe mencionar que la investigación en esta línea se está llevando a cabo principalmente mediante el cribado (screening) de productos naturales, síntesis de compuestos de bajo peso molecular (M w) vía química médica tradicional o utilizando química combinatoria 5 y con la identificación de macromoléculas naturales, incluyendo anticuerpos 6 , proteínas 7 y oligonucleótidos 8-10 con inherente actividad biológica. El limitado progreso conseguido siguiendo esta estrategia se atribuye principalmente al uso de modelos preclínicos poco predictivos 11 , a la falta de especificidad del fármaco en clínica, y por supuesto al problema de resistencia adquirida.

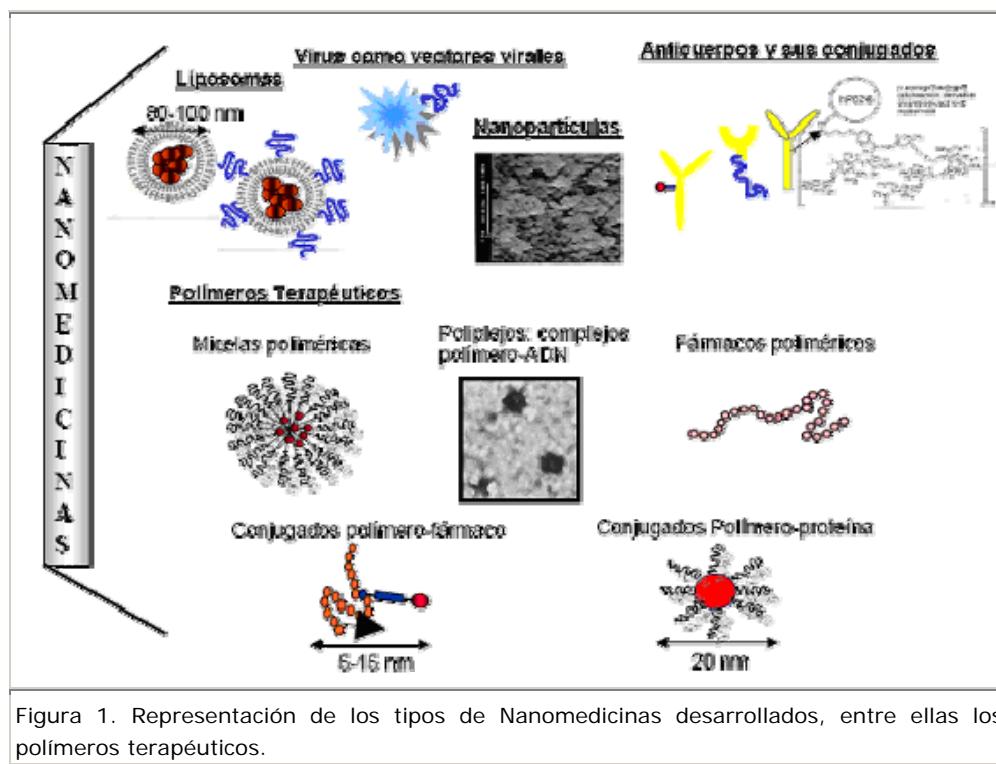
La segunda aproximación, en muchos sentidos complementaria a la anterior, es el diseño de sistemas innovadores de transporte 12,13 desarrollados para guiar el agente bioactivo de forma más precisa a la célula tumoral. La conversión de nuevos agentes terapéuticos en fármacos se retrasa frecuentemente por la falta de tecnologías o sistemas adecuados para el transporte específico 14 necesarios para dirigir la terapia propuesta al compartimento intracelular correcto de la célula dañada (drug targeting), y, además, una vez allí, ser capaz de liberar el agente bioactivo a una concentración efectiva durante un período de tiempo apropiado (controlled release). Como ya se ha mencionado anteriormente, un transporte inadecuado es uno de los factores más importantes que limita la posibilidad de utilizar medicinas moleculares a su completo potencial terapéutico. Por ejemplo, desde 1989

hasta enero de 2004 se han llevado a cabo más de 900 ensayos clínicos basados en terapia génica con cáncer como diana, 15 sin embargo todavía no existe ningún fármaco derivado de ellos que haya sido aprobado para uso clínico rutinario.

Nanomedicinas como Terapia

Nanociencia y Nanotecnología son la base de técnicas innovadoras para el transporte de fármacos con beneficios potenciales para el paciente y nuevos mercados para la industria; el desarrollo de sistemas de transporte y liberación controlada de moléculas con actividad terapéutica es en la actualidad tema de debate estratégico en las grandes firmas farmacéuticas. En la última década, se ha observado un crecimiento exponencial tanto en el desarrollo como en la aprobación por autoridades reguladoras de nanosistemas terapéuticos híbridos y de transporte de fármacos con aplicación en clínica 3,16-20 . La mayoría son terapias anticancerígenas, en ellos se encuentran por ejemplo: liposomas (como DaunoXome ® o Doxil®/Caelyx ®) 17,21 , anticuerpos monoclonales (Herceptin ® , Avastin) e inmunoconjungados (Mylotarg ® , Tositumomab ® , Zevalin ®) 6,22-24 , nanoparticulas (Abraxane , conteniendo paclitaxel) 19,25 o polímeros terapéuticos como fármacos poliméricos (Copaxone ®) 3 o conjugados polímero-proteína (Oncaspar ® , Neulasta ®) 3 . Estas nanoconstrucciones a menudo multicomponentes pueden ser definidas como las primeras nanomedicinas con demostrado beneficio clínico.

En realidad este concepto no es completamente nuevo, los inmunoconjungados, liposomas, nanopartículas o los conjugados poliméricos ya se conocían en los años 70. Sin embargo, estaban considerados como tecnologías individuales y competitivas, sólo una de ellas podía llegar a ser la panacea en aplicaciones de transporte específico. Pero todas y cada una de ellas ofrece ventajas y desventajas 21 . Los anticuerpos poseen un gran potencial para la especificidad selectiva, sin embargo son inmunogénicos. Los liposomas tienen alta capacidad de carga, pero pueden tanto liberar el fármaco demasiado rápido o retenerlo fuertemente, además los liposomas son capturados fácilmente por el retículo endoplasmático al igual que ocurre con las nanopartículas después de una administración intravenosa (i.v.). Por lo tanto, un sistema de transporte ideal surge a menudo de la fusión de dos o más tecnologías.



Polímeros Terapéuticos como terapia anticancerígena

Aunque el papel de los polímeros como biomateriales (excipientes en formulaciones farmacéuticas, prótesis, lentes de contacto, etc.) está muy bien establecido, hemos tenido que esperar hasta esta última década para conseguir la aceptación clínica de terapias poliméricas de administración parenteral.

Desde un punto de vista industrial, los polímeros terapéuticos son considerados como nuevas entidades químicas y no como simples sistemas convencionales de transporte de fármacos. Los sistemas de transporte tradicionales simplemente atrapan, solubilizan o liberan de forma controlada el agente bioactivo sin utilizar una conjugación química. Ejemplos de este tipo de reservoirs poliméricos son Zoladex® para cáncer de próstata 26, o Gliadel® con aplicación en tumores cerebrales 27. El término polímeros terapéuticos 3 engloba cinco grupos de nanoconstrucciones híbridas que utilizan polímeros hidrosolubles, tanto de forma bioactiva como formando parte funcional inerte de un complejo multicomponente, en este caso se une de forma covalente un agente terapéutico al polímero. Estas nanoconstrucciones incluyen: fármacos poliméricos con actividad inherente 28,29, micelas poliméricas 30, poliplejos con aplicación como vectores no virales en transporte génico 31,32, conjugados polímero-fármaco 33,34 y conjugados polímero-proteína 17,34. Al ser todos ellos macromoléculas, deben ser administrados a pacientes de forma parenteral (subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.) de ahí su óptima aplicación en tumores metastáticos.

Hasta la fecha, únicamente polímeros lineales, tanto naturales (ácido poliglutámico (PGA) o polisacáridos (como el dextrano) como sintéticos (principalmente poli(etilenglicol) (PEG) y N-(2-hidroxipropilmetacrilamida) (HPMA)), han logrado llegar a fase clínica 34, sin embargo los grandes avances experimentados y la versatilidad ofrecida por la química de polímeros están permitiendo el desarrollo de estructuras poliméricas con arquitecturas biomiméticas mucho más controladas, incluyendo entre éstas los dendrímeros y polímeros dendronizados 3,35,36.

Conjugados Poliméricos

Dentro de los conjugados poliméricos se distinguen dos grupos: conjugados polímero-proteína y conjugados polímero-fármaco 37. Aunque los conjugados polímero-proteína y polímero-fármaco posean una gran similitud, el objetivo o razón biológica perseguida en cada caso es diferente y por tanto también lo son los parámetros a tener en cuenta para su construcción. Mientras que en los conjugados polímero-proteína se busca el favorecer una mayor estabilidad en suero y una disminución en inmunogenicidad, en los conjugados polímero-fármaco se quiere incidir en la farmacocinética del mecanismo de internalización celular, mejorando la especificidad celular del fármaco de bajo peso molecular (M_w), su mecanismo de internalización y liberación óptima al alcanzar la diana molecular propuesta.

Importancia de la unión polímero-agente terapéutico.

El enlace o unión covalente del agente activo al polímero, ya sea mediante espaciador o sin él, debe ser estable durante el transporte pero capaz de degradarse y liberar el fármaco de forma específica a un ritmo óptimo y una vez llegue a la diana molecular establecida; todo esto sin modificar las propiedades activas del bioactivo y asegurándonos que la química utilizada en la unión no va a generar toxicidad ó inmunogenicidad. La selección del tipo de unión así como de su química es tan importante como la adecuada selección del polímero.

En los conjugados polímero-proteína actualmente en clínica, por lo general no se busca una liberación intracelular de la proteína sino un mayor tiempo de circulación en sangre o como ya se ha mencionado un efecto protector tanto a procesos de degradación proteolítica como a inmunogenicidad, por este motivo se utilizan en algunos conjugados enlaces no

biodegradables (por ejemplo, Oncaspar® , Neulasta TM o PEG-Asys®) 37 . Por el contrario, si se pretende un transporte intracelular de la proteína el diseño del conjugado varía considerablemente. En este caso es indispensable un transporte endosomotrópico 3 (liberación a través del endosoma) para evitar posible degradación lisosomal de la proteína; polímeros endosomolíticos y enlaces biodegradables son indispensables en este caso 38 .

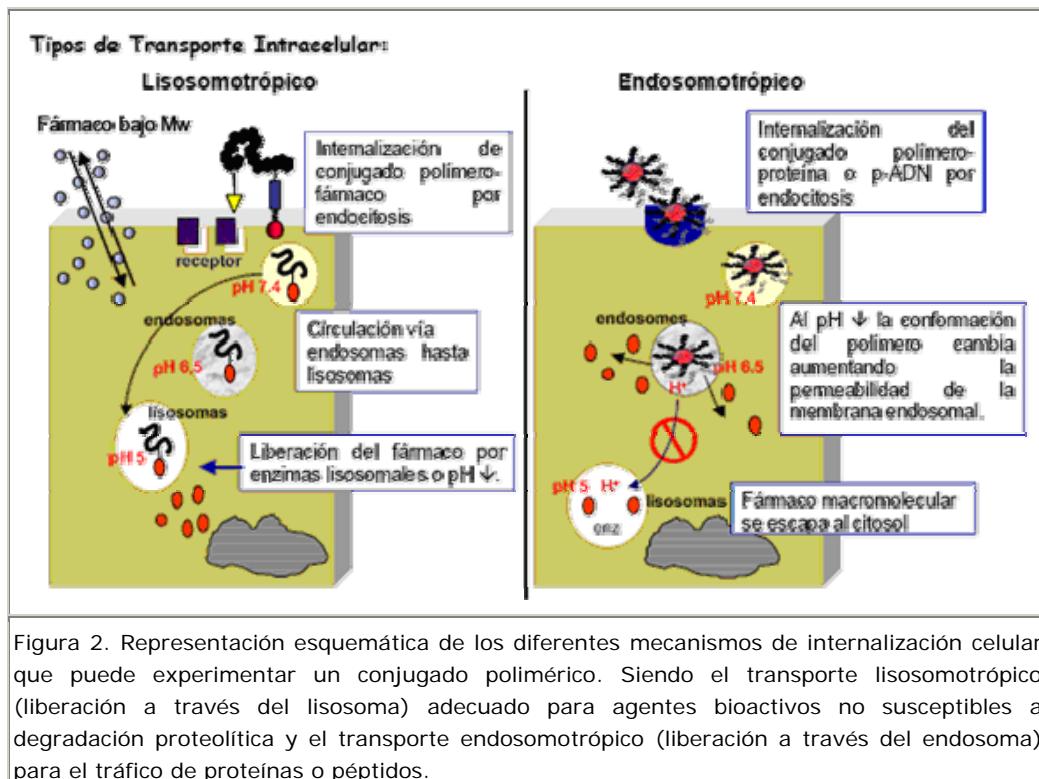


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de internalización celular que puede experimentar un conjugado polimérico. Siendo el transporte lisosomotrópico (liberación a través del lisosoma) adecuado para agentes bioactivos no susceptibles a degradación proteolítica y el transporte endosomotrópico (liberación a través del endosoma) para el tráfico de proteínas o péptidos.

En los conjugados polímero-fármaco se busca principalmente un transporte intracelular lisosomotrópico, en este caso después de que el conjugado es internalizado por endocitosis pasa a través del endosoma al lisosoma donde la presencia de enzimas proteolíticas o el pH ácido activan la degradación del portador polimérico y/o enlace biodegradable y consecuentemente el fármaco es liberado por difusión al citosol 3 . Por este motivo, los enlaces utilizados son o lábiles a pH ácido como acetal, éster, hidrazona y cis-acetonil 39 o proteolizables por enzimas lisosomales como catepsina B 21

Conjugados polímero-proteína.

Actualmente los conjugados polímero-proteína son considerados como terapia oncológica de uso rutinario en clínica; el diseño de SMANCS 40 y el éxito de la técnica de PEGilación 32 han sido los responsables de este hecho.

SMANCS: un conjugado proteico de administración local

SMANCS, comercializado con el nombre de Zinostatin Stimulamer® (<http://www.yamanouchi.com>), es el primer conjugado polímero-proteína que llegó al mercado. Fue diseñado por Maeda y colaboradores con la intención de conseguir un conjugado de la proteína antitumoral neocarzinostatin (NCS) adecuado para administración local en pacientes con carcinoma hepatocelular, utilizando la arteria femoral para acceder al tumor vía arteria hepática 40,41 . La conjugación aumenta considerablemente la hidrofobicidad de NCS y por tanto su solubilidad lipídica, lo que permitió llevar a cabo la administración de SMANCS en el agente de contraste Lipiodol aumentando así el tiempo de vida media en plasma, permitiendo la visualización del tumor y mejorando el grado de

especificidad tumoral. Estudios preclínicos con SMANCS mostraron una increíble proporción tumor/sangre >2500 41 . Además, un gran número de pacientes con hepatocarcinomas tratados con SMANCS consiguieron una clara reducción del tamaño del tumor (95% de los casos) y una disminución en los niveles de α -fetoproteína (86%) 40

Tabla 1. Conjugados anticancerígenos polímero-proteína y polímero-fármaco en clínica

| Comuesto | Nombre | Estado | Observaciones |
|--|--|----------------------|---|
| Conjugados Polímero-Proteína | | | |
| SMANCS | Zinostatin Stimulamer [®] | Mercado | Cáncer de hepatocelular |
| PEG-L-asparaginasa | Oncaspar [®] | Mercado | Leucemia linfoblástica aguda |
| PEG-GCSF | Neulasta [™] | Mercado | Prevención de neutropenia asociada a quimioterapia |
| PEG-interferón α 2a | PEG-Asys [®] | Mercado Fase I/II | Hepatitis B & C melanoma, leucemia mielógena crónica y carcinoma renal |
| PEG-interferón α 2b | PEG-Intron [™] | Mercado Fase I/II | Hepatitis C melanoma, mieloma múltiple y carcinoma renal |
| PEG-arginina desiminasa | ADI-PEG20 | Fase I | Cáncer de hepatocelular |
| PEG-glutaminasa combinada con un antimetabolito | PEG-PGA y DON | Fase I/II | Varios |
| glutamino 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) | | | |
| PEG-D-aminoácido oxidasa (DAO) combinado con el substrato DAO, D-prolina | PEG-DAO y DAO, (DAO) combinado con el D-prolina | Predínica | |
| Conjugados Polímero-Fármaco | | | |
| Polyglutamato-paclitaxel | CT-2103; XYOTAX [™] | Fase III | Varios, particularmente NSCLC; cáncer de ovario |
| Polyglutamato-camptotecina | CT-2106 | Fase I | Varios |
| HPMA copolímero-doxorubicina | PK1; FCE28068 | Fase II | Varios, particularmente cáncer de pulmón y mama |
| HPMA copolímero-doxorubicina-galactosamina | PK2; FCE28069 | Fase I/II | Particularmente carcinoma hepatocelular |
| HPMA copolímero paclitaxel | PNU166945 | Fase I [¶] | Varios |
| HPMA copolímero-camptotecina | NAG-CPT | Fase I [¶] | Varios |
| HPMA copolímero-carboplatino platino | AP5280 | Fase I/II | Varios |
| HPMA copolímero-DACH-platino | AP5346 | Fase I/II | Varios |
| Dexbrano-doxorubicina | AD-70, DOX-OXD | Fase I [¶] | Varios |
| Dexbrano modificado-camptotecina | DE-310 | Fase I [¶] | Varios |
| PEG-camptotecina | PROTHECAN [™] | Fase II | Varios |

[¶] Los estudio en fase clínica de estos conjugados han sido abandonados debido principalmente a un alto grado de toxicidad no específica durante el tratamiento.

SMANCS: polí(estreno-co-anhídrido maleico)-neocarcinostatin/G-CSF: factor estimulador de colonos de granulocitos; HPMA: N-(2-hidroxipropil)metacrilamida; PEG: polí(etilenglicol); NSCLC: cáncer de pulmón de célula no pequeña; DACH: diaminociclohexano

PEGuilación: mejorando el potencial terapéutico de proteínas

La PEGuilación o conjugación de proteínas a polietilenglicol (PEG), tal como la describieron Davis y Abuchowski en los años 70-42, es en la actualidad la estrategia que mejores resultados ofrece con terapia proteica en clínica. Esta técnica se utiliza para aumentar la solubilidad y estabilidad de la proteína, reducir su inmunogenicidad y prolongar su tiempo de vida medio en plasma. Consecuentemente, la frecuencia de dosis con estos agentes terapéuticos macromoleculares es mucho menor que la requerida con proteína libre, mejorando de este modo la calidad de vida del paciente 8,17,43. Desde que el primer enzima PEGuilado, PEG adenosina deaminasa (ADAGEN TM), salió al mercado en 1990 un gran número de conjugados PEG-proteína han pasado a ser considerados como terapia de uso clínico rutinario (Tabla 1).

PEG-L-asparaginasa (Oncaspar ®) (<http://www.enzon.com>) fue el primer conjugado anticancerígeno PEG-proteína en conseguir la aprobación de la FDA en 1994. Este conjugado se utiliza en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL) 44,45. El enzima nativo induce reacciones de hipersensibilidad 46 y tiene un tiempo de vida media en plasma ($t_{1/2}$) relativamente corto (8-30 horas), debido a esto es necesario administrar una dosis diariamente durante 4 semanas. Sin embargo, el conjugado polimérico tiene un $t_{1/2}$ de ~14 días, con lo que disminuye considerablemente la frecuencia de dosis a tomar por el paciente (1h de infusión cada 2 semanas). Además, y de forma consistente, la PEGuilación de este enzima disminuye las reacciones de hipersensibilidad (únicamente observadas en <8% de pacientes después de administrar el conjugado) 47,48. Actualmente, otras enzimas PEGuiladas anticancerígenas están siendo estudiadas clínicamente, como es el caso del conjugado PEG-arginina deiminasa recombinante (rhArg). El conjugado PEG-rhArg se está evaluando como tratamiento potencial para carcinoma hepatocelular tanto como un agente único, eliminando arginina, como en combinación con 5-fluorouracil (5-FU) 49,50. También se encuentra en fase clínica un tratamiento basado en la combinación de glutaminasa PEGuilada (PEG-glut) y el antimetabolito de la glutamina 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON). Esta combinación está fundamentada en la hipótesis de que DON es un agente antitumoral más efectivo cuando los niveles de glutamina son bajos. 51.

Citoquinas PEGuiladas: Varias citoquinas o agentes modificadores de la respuesta biológica (tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) 52,53, el interferón alfa (IFN α) 54,55 o la interleukina 2 (IL2) 56-58 también se han conjugado de forma satisfactoria a PEG. PEG-G-CSF (Neulasta TM) (<http://www.amgen.com>) ya se encuentra en el mercado y es utilizado para prevenir neutropenia severa inducida por quimioterapia. La administración s.c. de una dosis de PEG-G-CSF (100 m g kg $^{-1}$) el segundo día de cada ciclo de quimioterapia, da un soporte de neutrófilos equivalente al obtenido con una dosis de G-CSF (5 m g kg $^{-1}$ día $^{-1}$) diaria durante todos los días del ciclo quimioterapéutico 59.

Los conjugados PEG-interferón α - PEGASYS ® 54 (<http://www.roche.com>) y PEG-Intron TM 55 (<http://www.schering-plough.com>)- han demostrado clínicamente una actividad antivírica superior a IFN α libre y están aprobados para el tratamiento de hepatitis C 60. Además, actualmente están siendo evaluados como agentes anticancerígenos. La eficacia de IFN α en el tratamiento tanto de melanoma como de carcinoma renal está bien establecida, sin embargo la administración de la proteína presenta problemas tales como toxicidad y un corto $t_{1/2}$ (2.3 horas), lo que hace necesaria una frecuencia de administración de 3 veces por semana. En un estudio en fase clínica I/II, IFN α -2b PEGuilado fue dado una vez por semana de forma s.c. durante 12 semanas a pacientes con tumores sólidos en estado avanzado (carcinoma renal primario (RCC)). El conjugado fue activo y bien tolerado (dosis máxima tolerada (MTD) de 6 m g kg $^{-1}$ semana $^{-1}$) 55. Los interferones PEGuilados en combinación con agentes antiangiogénicos o inmunomoduladores también están siendo evaluados en clínica como terapia potencial en otras enfermedades (por ejem. glioma o melanoma metastático), sin embargo los resultados no son muy esperanzadores 61,62.

Conjugados polímero-fármaco.

El concepto de conjugado polímero-fármaco surgió paralelamente al nacimiento de los conjugados polímero-proteína y fue el resultado de la combinación del trabajo visionario de dos investigadores a mediados de los años 70: De Duve con el transporte lisosomotrópico de fármacos⁶³ y Ringsdorf con una química de polímeros idealizada para la conjugación de fármacos⁶⁴. Aunque todavía no existe ningún conjugado polímero-fármaco de uso clínico rutinario, los importantes resultados clínicos obtenidos en la actualidad sugieren que la esperada aprobación por la FDA ocurra en un período no mayor a dos años. Es importante mencionar que casi la totalidad de los conjugados polímero-fármaco en fase clínica (once en este momento) basan su especificidad en el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos en el tejido tumoral, el llamado efecto EPR⁶⁵ (Enhanced Permeability and Retention Effect) descrito por Maeda⁶⁴. Este fenómeno es consecuencia de la combinación de dos factores, la hiperpermeabilidad de los vasos angiogénicos tumorales (permitiendo extravasación del polímero), y de la falta de drenaje linfático en el tejido tumoral que provoca, subsecuentemente, la retención de la macromolécula. La especificidad ('targeting') tumoral debido al efecto EPR depende de la concentración en plasma del polímero circulante⁶⁵, de este modo, portadores poliméricos no-biodegradables tales como el copolímero HPMA⁶⁶ o polietilenglicol (PEG)⁴² (con $M_w < 40.000$ g/mol para asegurar una eliminación renal efectiva), tienen un perfil farmacocinético desfavorecido en términos de una óptima especificidad tumoral.

Por otro lado, la introducción de un residuo dirigente (anticuerpo^{67,68}, péptido o proteína^{69,70}, sacárido⁷¹, etc.) en la estructura del conjugado polimérico nos ofrece la posibilidad de conseguir además de la inherente especificidad pasiva ya descrita, una especificidad tumoral activa adicional²¹. Sin embargo, aunque se han llevado a cabo numerosos estudios preclínicos siguiendo este concepto de especificidad activa, solamente uno de los conjugados evaluados ha sido capaz de ser transferido a clínica: el conjugado polimérico HPMA-doxorubicina-galactosamina (PK2, FCE28069) dirigido al receptor de asialoglicoproteínas en hepatocitos y por tanto con aplicación en hepatocarcinoma celular⁷¹.

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto la elección del portador polimérico⁷² como la del enlace polímero-fármaco son puntos clave en el diseño de este tipo de macromoléculas. Por un lado, el polímero no debe ser ni tóxico ni inmunogénico y además poseer una apropiada capacidad de carga, por el otro, el enlace debe ser estable en plasma y capaz de biodegradarse a la velocidad adecuada cuando el conjugado llegue a la diana molecular establecida. Una toxicidad elevada derivada de una inapropiada velocidad de degradación del enlace y como consecuencia una ausencia de beneficio clínico, ha provocado la retirada de los estudios en fase clínica de dos conjugados: HPMA-paclitaxel⁷³ y HPMA-camtotecina⁷⁴.

Al principio se pensaba que los polímeros naturales debían ser los más seguros, sin embargo, después del amplio estudio llevado a cabo con varios conjugados del polisacárido dextrano confirmaron que esto no era cierto. La evaluación en fase clínica I de los conjugado dextrano-doxorubicina (AD-70)⁷⁵ y dextrano carboximetilado-camtotecina (DE-310)⁷⁶ mostró una inesperada toxicidad debido al alto grado de inmunogenicidad provocado la modificación de la cadena polimérica principal del dextrano. Además, los conjugados de dextrano presentan una falta de especificidad tumoral debido a su internalización preferente en el retículo endoplasmático. La mayoría de conjugados en fase clínica poseen como portador polimérico el copolímero HPMA o PGA; PEG también ha sido estudiado como plataforma (PEG-CPT; PROTHECAN[®])⁷⁷ pero la baja capacidad de carga lo hace poco apropiado para el diseño de este tipo de macromoléculas⁷⁸.

HPMA copolímero-doxorubicina (PK1, FCE28068), desarrollado por Kopecek y Duncan, fue el primer conjugado anticancerígeno en ser evaluado clínicamente en 1994 79 . En primer lugar, quedó demostrado que HPMA es un portador polimérico biocompatible, no tóxico y no inmunogénico incluso a dosis elevadas (20g/m²), hecho que lo establece como una plataforma adecuada para el diseño de este tipo de sistemas. Por otro lado, estudios en fase I demostraron que la toxicidad presentada por PK1 (8 wt% doxorubicina) es hasta cinco veces menor que la producida por doxorubicina libre (MTD 320 mg/m² vs. 60 mg/m²). Además, un dato adicional muy importante a su favor, es la actividad antitumoral que presenta PK1 en tumores quimioresistentes (debido a su diferente mecanismo de internalización). Estudios en fase II demuestran de nuevo actividad en pacientes con cáncer de mama y de pulmón de célula no pequeña (NSCLC).

Después de la evaluación clínica de PK1 y PK2 (con introducción adicional de galactosamina como residuo dirigente), cuatro conjugados más con HPMA como plataforma han sido estudiados (Tabla 1). Los más recientes son dos platinatos, AP5280 80,81 y AP5346 80,82 . Estos conjugados han mostrado resultados muy prometedores en varios tipos de tumores (con MTD de 4500 mg Pt m⁻² para AP5280 y 1280 mg Pt m⁻² para AP5346) por lo que están iniciando en estos momentos la fase II. Cabe mencionar, el conjugado HPMA-doxorubicina-inmunoglobulina (Hulg) sintetizado de forma personalizada dependiendo de las necesidades de cada paciente, siendo evaluado clínicamente en seis casos 83 . Aunque es difícil analizar los datos obtenidos de forma objetiva, siguiendo las directrices marcadas por una buena práctica en clínica (GCP), es necesario resaltar que se observaron efectos antitumorales en algunos casos. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que los conjugados HPMA copolímero-doxorubicina pueden ser inmunoestimulativos, ya que, el conjugado no parece inducir anticuerpos anti-Ig, y da lugar a un aumento en los niveles de células CD16 + 56 y CD4 + en sangre junto con una activación de células NK y LAK.

Es importante mencionar, como remarca final que demuestra el potencial de estos conjugados como anticancerígenos, la obtención de la aprobación de la FDA para llevar a cabo un seguimiento acelerado ('fast-track FDA aproval') con XYOTAX TM en junio de 2004. XYOTAX TM es un conjugado ácido poli-L-glutámico-placlitaxel (PGA-paclitaxel, CT-2103) desarrollado por Cell Therapeutics Inc, (<http://www.cticseattle.com>). Este hecho fue posible debido a los sorprendentes resultados obtenidos en fase III con pacientes de NSCLC en fase PS-2, donde ninguno de los tratamientos existentes en clínica había sido efectivo 84 . En la actualidad, es el conjugado más avanzado en clínica dando muy buenos resultados en algunos tipos de tumor determinados. Al contrario que el conjugado HPMA-paclitaxel, XYOTAX TM contiene una carga de fármaco mucho más elevada (37 wt% vs 5 wt%). Además, PGA es un polímero biodegradable en presencia de enzimas lisosomales (catepsina B), factor muy importante ya que este tipo de conjugados siguen un mecanismo de transporte intracelular lisosomotrópico (Figura 2). XYOTAX TM tanto como tratamiento único o combinado con otros fármacos o radioterapia puede prolongar la vida de pacientes con NSCLC en fase PS-2 y también de pacientes en estado avanzado (III/IV) de cáncer de ovario cuando se administra como tratamiento de 1^a línea en combinación con carboplatino (98% de respuestas positivas) 87-89 . Curiosamente, se han detectado diferencias en la respuesta al tratamiento dependiendo del género del paciente, con un mayor éxito de XYOTAX YM en mujeres pre-menopáusicas 90 . La hipótesis que se maneja en la actualidad es la existencia de una correlación entre los niveles de estrógenos y la actividad del conjugado, ya que se ha visto que los estrógenos son capaces de aumentar la expresión de catepsina B 91 .

Futuras Oportunidades, Retos y Conclusiones

Con los primeros conjugados polímero-proteína antitumorales en el mercado, y el número creciente de conjugados polímero-fármaco en fase clínica con una clara posibilidad de alcanzar el mercado en los próximos años, los conjugados poliméricos anticancerígenos se establecen como terapia anticancerígena efectiva. Sin embargo, todavía existen muchos retos a solucionar y oportunidades que nos permitan desarrollar todavía más esta tecnología.

En primer lugar se requiere del desarrollo de mejores portadores poliméricos, biodegradables con alto peso molecular para así poder explotar en mayor medida el efecto EPR e idealmente, que además posean una arquitectura definida. Muchos grupos han dirigido su investigación hacia el desarrollo de este tipo de sistemas. Los dendrímeros o polímeros dendronizados con una arquitectura 3D definida y una alta densidad de grupos funcionales en la superficie se presentan como opciones muy atractivas para la inmovilización tanto de fármacos anticancerígenos, residuos directores o agentes de contraste o imagen 36 . Otras arquitecturas interesantes bajo evaluación son: polímeros hiperramificados 92 , polímeros estrella 93 y derivados híbridos de peptidos o glicosacáridos 94 .

La conjugación de fármacos dirigidos a nuevas dianas moleculares también está siendo un campo de exploración con aplicaciones muy interesantes. Ejemplos de esta aproximación son: HPMA-TNP470, el primer conjugado polimérico antiangiogénico 95 y CPT-PEG-LHRH, 96 dirigido a modular apoptosis celular.

La utilización de terapia de combinación en tratamiento antitumoral, está demostrando ser una estrategia con un gran potencial para el desarrollo de conjugados de 2^a generación con características mejoradas. Esto queda patente ya en la actualidad con casos clínicos, como los explicados para XYOTAX TM , donde la combinación tanto con radioterapia como con otros fármacos ha dado resultados increíbles en pacientes. Recientemente, nosotros hemos desarrollado un conjugado HPMA-doxorubicina-aminoglutetimida con el objetivo de obtener una terapia de combinación polimérica para cáncer de mama 97 . Este conjugado de combinación mostró en un modelo in vitro con células MCF-7 y MCF-7ca una actividad citotóxica mucho mayor a la obtenida con los conjugados monofármaco o con una mezcla simple de ambos. Estudios mecanísticos sugieren que la liberación simultánea de ambos fármacos podría potenciar el efecto pro-apoptótico del conjugado. 98 Estos resultados potencian la utilidad de esta estrategia de combinación para mejorar en un futuro los tratamientos disponibles actualmente para el tratamiento de tumores sólidos.

Con unas bases bien establecidas y claras posibilidades para futuras mejoras, los conjugados poliméricos pueden ser reconocidos como una nanoterapia anticancerígena efectiva.

Referencias

1. Ferrari M. 2005. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Rev. Cancer* Vol 5: 161-171.
2. European Science Foundation Forward Look on Nanomedicine. 2005. <http://www.esf.org>
3. Duncan R. 2003. The Dawning Era of Polymer Therapeutics. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 2: 347-360.
4. Atkins J. H. & Gershell L. J. 2002. Selective anticancer drugs. *Nature Rev. Cancer* Vol 1: 645-646.
5. Triggle D J. 2004. Drug development in the 21(st) century: Medicines, man and receptors. *Med. Chem. Res.* Vol 13: 238-248
6. Brekke OH, Sandlie I. 2003. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 2: 52-62.
7. Nagle T., Berg C., Nassr R., Pang K. 2003. The further evolution of biotech. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 2: 75-79.
8. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* Vol 11: 50-55
9. Burton EA, Fink DJ, Glorioso JC. 2005. Replication-defective genomic HSV gene therapy vectors: Design, production and CNS applications. *Current Opin. in Mol. Therapeutics.* Vol 7: 326-336. A
10. Novina C D, Sharp PA. 2004. The RNAi revolution. *Nature* Vol 430: 161-164.
11. Kamb A. 2005. What's wrong with our cancer models? *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 4: 161-165.
12. Huang P S & Oliff A. 2001. Drug-targeting strategies in cancer therapy, *Current Opin. Genetics Develop.* Vol 11: 104-110.
13. Moses M A, Brem H & Langer R. 2003. Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer. *Cancer Cell* Vol 4: 337-341.
14. Jain RK. 1998. The next frontier of molecular medicine: Delivery of therapeutics. *Nature Med.* Vol 4: 655-657.
15. Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. *J Gene Med* Vol 6: 597-602.
16. Allen TM. 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 2: 750-763.
17. Harris JM & Chess R B. 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 2: 214-221.
18. Torchilin VP. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 4: 145-160.
19. Brigger I, Dubernet C, & Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis *Adv. Drug Del. Rev.* Vol 54: 631-651.
20. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* Vol 19: 311-330.
21. Duncan R. 2005. Targeting and intracellular delivery of drugs. In: *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Ed. RA Meyers Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KgaA. pp 163-204.
22. Harries M & Smith I. 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine-Related Cancer* Vol 9: 75-85.
23. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P & Novotny W. 2004. Case history: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Rev. Drug Discov.* Vol 3: 391-400.
24. Milenic DE, Brady ED, & Brechbiel MW. 2004. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nature Rev. Drug Disc.* Vol 3: 488-498.
25. O'Shaughnessy JA, et al. 2004. Weekly nanoparticle albumin paclitaxel (Abraxane) results in long-term disease control in patients with taxane-refractory metastatic breast cancer. *Proc. San Antonio Breast Cancer Symposium* 1070.
26. Tsukagoshi, S. 2002. A new LH-RH agonist for treatment of prostate cancer, 3-month controlled-release formulation of goserelin acetate (Zoladex LA 10.8 mg depot). Outline of pre-clinical and clinical studies. *Gan To Kagaku Ryoho* 29, 1675-1687.
27. Westphal M, et al. 2003. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncol.* Vol 5: 79-88.

28. Donaruma LG. 1974. Synthetic biologically active polymers. *Progr. Polym. Sci.* Vol 4: 1-25.
29. Seymour LW. 1991. Synthetic polymers with intrinsic anticancer activity. *J Bioact. Comp. Polymers.* Vol 6: 178-216.
30. Yokoyama M. et al. 1990. Polymeric micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *J. Cont Rel.* Vol 11: 269-278.
31. Pack DW, Hoffman AS, Pun S & Stayton PS. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov.* Vol 4: 581-593.
32. Wagner E & Kloeckner J. 2005. Gene delivery using polymer therapeutics *Adv. Polymer Sci.* Springer-Verlag GmbH, 192 published online awaiting full ref.
33. Duncan R. 1992. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs.* Vol 3: 175-210.
34. Duncan R. 2003. Polymer-anticancer drug conjugates. in *Handbook of Anticancer Drug Development* (eds. Budman, D., Calvert, H. & Rowinsky, E.) (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 239-260.
35. Duncan R. & Izzo L. 2005. Dendrimer biocompatibility and toxicity For: *Advanced Drug Delivery Reviews Special Issue on Dendrimers* Vol 57, Ed A T Florence pp 2215-2237
36. Lee CC, Mackey JA, Fréchet JMJ & Szoka FC. 2005. Designing dendrimers for biologica applications. *Nat. Biotechnol.* Vol 23: 1517-1526.
37. Vicent MJ & Duncan R. 2005. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol.* Vol 24: 39-47
38. Ferruti P, Marchisio MA, Duncan R. 2002. Poly(amido-amine)s: Biomedical applications *Macromol. Rapid Comm.* Vol 23: 332-355.
39. Ulbrich K, Subr V. 2004. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* Vol 23: 1023-1050.
40. Maeda H & Konno T. 1997. Metamorphosis of neocarzinostatin to SMANCS: Chemistry, biology, pharmacology, and clinical effect of the first prototype anticancer polymer therapeutic. In *Neocarzinostatin: The Past, Present, and Future of an Anticancer Drug* (eds. Maeda, H., Edo, K. & Ishida, N.) Springer Verlag, Berlin, pp 227-267.
41. Konno T & Maeda H. 1987. Targeting chemotherapy of hepatocellular carcinoma: arterial administration of SMANCS/lipiodol. In: *Neoplasma of the liver* Okada K, Ishak KG (Eds) New York : 343-52.
42. Davis F F. 2002. The origin of pegnology. *Adv. Drug Del. Rev.* Vol 54: 457-458.
43. Veronese FM, Harris JM (Eds.). 2002. Peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (no. 4) whole issue.
44. Fuertges F & Abuchowski A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *J. Cont. Rel.* Vol 11: 139-148.
45. Graham M L. 2003. Pegasparagase: A review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Vol 55: 1293-1302.
46. Ho DH, et al. 1986. Clinical pharmacology of polyethylene glycol-asparaginase. *Drug Metab. Disposit.* Vol 14: 349-352.
47. Kurtzberg J, Moore JO, Scuderi D & Franklin A. 1988. A phase II study of polyethylene glycol (PEG) conjugated L-asparaginase in patients with refractory acute leukaemias. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* Vol 29: 213.
48. Abshire TC, Pollock BH, Billett AL et al. 2000. Weekly polyethylene glycol conjugated L-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* Vol 96: 1709-1711.
49. Cheng PN. et al. 2005. Pegylated Recombinant human Arginase (rhArg-peg 5000Mw) has in vitro and in vivo anti-proliferative Potential and Apoptotic activities in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 96, abstract 3179.
50. Delman KA et al. 2005. Phase I/II trial of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG20) in unresectable hepatocellular carcinoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 96, abstract 4139.
51. Unge, C. et al. 2005. Phase I dose escalating study of PEG-PGA and DON: A new amino acid depleting anti cancer drug approach. *Proc. of the Amer. Soc. Clin. Oncol.*, abstract 3130.
52. Tanaka H, Satake-Ishikawa R, Ishikawa M. et al. 1991. Pharmacokinetics of recombined human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats. *Cancer Res.* 51, 3710-3714.

53. Molineux G. 2004. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr. Pharm. Des.* Vol 10: 1235-1244.
54. Wang Y-S. et al. 2002. Structural and biological characterisation of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv. Drug Del. Rev.* Vol 54: 547-570.
55. Bukowski R, et al. 2002. Pegylated interferon alfa-2b treatment for patients with solid tumors: a phase I/II study. *J. Clin. Oncol.* Vol 20: 3841-3849.
56. Katre NV, Knauf MJ & Laird WJ. 1987. Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 84: 1487-1491.
57. Goodson RJ & Katre NV. 1990. Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. *Biotechnology* Vol 8: 343-346.
58. Zimmerman RJ, Aukerman SL, Katre NV et al. 1989. Schedule dependency of the antitumour activity and toxicity of polyethylene glycol-modified interleukin-2 in murine tumour models. *Cancer Res.* Vol 49: 6521-6528.
59. Holmes F A, et al. 2002. Comparable efficacy and safety profiles of once-per-cycle pegfilgrastim and daily injection filgrastim in chemotherapy-induced neutropenia: a multicenter dose-finding study in women with breast cancer. *Ann. Oncol.* Vol 13: 903-909.
60. Reddy KR, Modi MW & Pedder S. 2002. Use of peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C. *Adv. Drug Del. Rev.* Vol 54: 571-586.
61. Flaherty L, Heilbrun L, Marsack C. & Vaishampayan UN. 2005. Phase II trial of pegylated interferon (Peg-Intron) and thalidomide (Thal) in pretreated metastatic malignant melanoma. *Proc. Am. Soc Clinical Oncol.* 7562.
62. Groves MD. et al. 2005. A phase II study of temozolomide plus pegylated interferon alfa-2b for recurrent anaplastic glioma and glioblastoma multiforme. *Proc. Am. Soc Clinical Oncol.* 1519.
63. De Duve C. et al. 1974. Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* Vol 23: 2495-531.
64. Ringsdorf H. 1975. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polymer Sci. Polymer Symp.* Vol 51: 135-153.
65. Seymour LW. et al. 1995. Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier. *Eur. J. Cancer* Vol 31: 766-770.
66. Duncan R. 2005. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates. In: *Polymeric Drug Delivery Systems* (Ed. Kwon, G.S.) Marcel Dekker, Inc., New York , pp 1-92.
67. Rihova B. et al. 2003. Drug-HPMA-Hulg conjugates effective against human solid cancer. *Adv. Expt Med.Biol.* Vol 519: 125-143.
68. Shiah J-G. et al. 2001. Combination chemotherapy and photodynamic therapy of targetable N-2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-doxorubicin/mesochlorin e6-OV-TL16 antibodyimmunoconjugates. *J. Control. Rel.* Vol 74: 249-253.
69. O'Hare KB. et al. 1993. Polymeric drug-carriers containing doxorubicin and melanocyte-stimulating hormone: in vitro and in vivo evaluation against murine melanoma. *J. Drug Target.* Vol 1: 217-229.
70. Wan KW, Vicent MJ, Duncan R. 2003. Targeting endothelial cells using HPMA copolymer doxorubicin RGD conjugates. *Proc. Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* Vol 30: 491-492
71. Seymour LW, et al. 2002. Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer bound doxorubicin. *J. Clin.Oncol.* Vol 20: 1668-1676.
72. Brocchini S & Duncan R. 1999. Pendent drugs, release from polymers. in *Encyclopediad of Controlled Drug Delivery* (ed. Mathiowitz, E.) (John Wiley & Sons, New York , pp 786-816.
73. Meerum Terwogt J M, et al. 2001. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anti-Cancer Drugs* 12, 315-323.
74. Schoemaker NE, et al. 2002. A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water soluble polymer conjugate of camptothecin. *Brit. J. Cancer* Vol 87: 608-614.
75. Danauser-Reidl S, et al. 1993. Phase-I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin (AD-70, DOX-OXD). *Invest. New Drugs* Vol 11: 187-195.
76. Kumazawa E & Ochi Y. 2004. DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: potent antitumor activities in various murine tumor models. *Cancer Sci.* Vol 95: 168-175.

77. Rowinsky EK, et al. 2003. A phase I and pharmacokinetic study of pegylated camptothecin as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid malignancies. *J. Clin. Oncol.* Vol 21: 148-157.
78. Greenwald RB, et al. 2003. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Del. Rev.* Vol 55: 217-250.
79. Vasey P, et al. 1999. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PKI (HPMA copolymer doxorubicin) first member of a new class of chemotherapeutics agents: drug-polymer conjugates. *Clin. Cancer Res.* Vol 5: 83-94.
80. Gianasi E, et al. 2002. HPMA copolymers platinates containing dicarboxylato ligands. preparation, characterisation and in vitro and in vivo evaluation. *J. Drug Targeting* Vol 10: 549-556.
81. Rademaker-Lakhai JM, et al. 2004. A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* Vol 10: 3386-3395.
82. Rice JR, and Howell SB. 2004. AP-5346 polymer-delivered platinum complex. *Drug Future* Vol 29: 561-565.
83. Rihova B, et al. 2003. Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data. *J. Cont. Rel.* Vol 91:1-16.
84. Singer JW, et al. 2005. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103) [XYOTAXTM]: an intracellularly targeted taxane. *Anti-Cancer Drugs* Vol 16: 243-254.
85. Singer JW, et al. 2003. Poly-(L)-glutamic acid-paclitaxel (CT-2103) [XYOTAX], a biodegradable polymeric drug conjugate: characterization, preclinical pharmacology, and preliminary clinical data. *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol 519: 81-99.
86. Shaffer SA, et al. 2002. Proteolysis of Xyotax TM by lysosomal cathepsin B; metabolic profiling in tumor cells using LC-MS. *Eur. J. Cancer* 38 (Suppl), 428.
87. Langer CJ. 2004. CT-2103: A novel macromolecular taxane with potential advantages compared with conventional taxanes. *Clin Lung Cancer.* Vol 6: (Suppl 2), S85-88.
88. Langer CJ, et al. 2005. Paclitaxel poliglumex (PPX)/carboplatin vs paclitaxel/carboplatin for the treatment of PS2 patients with chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A phase III study. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* Vol 96: abstract LBA7011.
89. Cell Therapeutics. 2005. Improving Outcomes in PS2 Patients: Results of the XYOTAX TM Phase III STELLAR Trials. 11th World Congress on Lung Cancer, Barcelona , Spain July.
90. Socinski, M. 2005. XYOTAX in NSCLC and other solid tumors. Emerging evidence on biological sex differences: is gender-specific therapy warranted? *Chemotherapy Foundation XXIII Symposium Innovative Cancer Therapy for Tomorrow*, Mount Sinai November.
91. Kremer M, Judd J., Rifkin B, et al. 1995. Estrogen modulation of osteoclast lysosomal-enzyme secretion. *J. Cellular Biochem.* Vol 57: 271-279 .
92. Gao C et al. 2003. Water-soluble degradable hyperbranched polyesters: novel candidates for drug delivery? *Biomacromolecules* Vol 4: 704-712.
93. Jelinkova M, et al. 2003. Star-like vs. classic macromolecular prodrugs: two different antibody-targeted HPMA copolymers of doxorubicin studied in vitro and in vivo as potential anticancer drugs. *Pharm. Res.* Vol 20: 1558-1564
94. Shaunik S, et al. 2004. Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat. Biotechnol.* Vol 22: 977-984.
95. Satchi-Fainaro R, et al. 2004. Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470. *Nature Med.* Vol 10: 225-261.
96. Dharap SS, et al. 2005. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* Vol 102: 12962-12967.
97. Vicent MJ, Greco F., Nicholson RI & Duncan R. 2005. Polymer-drug conjugates as a novel combination therapy for the treatment of hormone-dependent cancers. *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol 44: 2-6.
98. Greco F, Vicent MJ, Penning NA, et al. 2005. HPMA-copolymeraminoglutethimide conjugates inhibit aromatase in MCF-7 cell lines. *J. Drug Targeting.* Vol 13: 459-70.