



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 708**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/24** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

**C07D 315/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05733719 .8**

96 Fecha de presentación : **22.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1740599**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54

Título: **Derivados de antraciclina.**

30

Prioridad: **22.04.2004 SE 0401066**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.06.2011**

73

Titular/es: **NUCLISOME AB.**  
**C/O Öhrlings Pricewaterhousecoopers AB.**  
**Box 179**  
**751 04 Uppsala, SE**

72

Inventor/es: **Edwards, Katarin;**  
**Sjöberg, Stefan;**  
**Carlsson, Jörgen y**  
**Gedda, Lars**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 708 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

Derivados de antraciclina

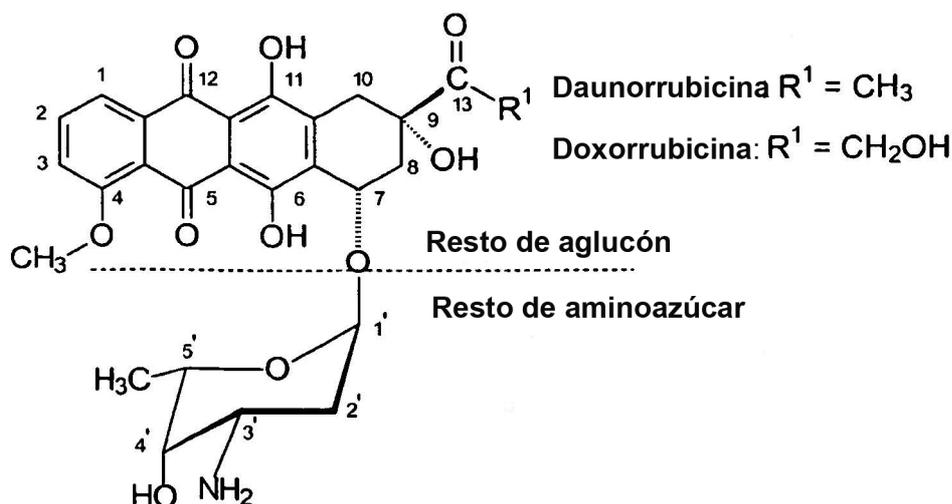
**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de antraciclina y a su uso en la terapia contra el cáncer y el diagnóstico del cáncer.

**Antecedentes**

10 La doxorubicina ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ; PM: 543,53), cuya abreviatura es DOX, también conocida, entre otros nombres, como adriamicina o adriablastina, es un antibiótico y un agente antineoplásico de la familia de las antraciclinas (véase la estructura que figura más abajo). La DOX fue aislada inicialmente de la bacteria acuática *Streptomyces peucetius* var. *Coesi*, y desde principios de los setenta, las antraciclinas, en concreto, la doxorubicina y la daunorrubicina, y los agentes de alquilación (ciclofosfamida, melfalán, etc.) son los agentes quimioterapéuticos más versátiles y más frecuentemente usados hoy en el campo clínico [1]. Las antraciclinas son moléculas anfipáticas constituidas por un heterociclo de aglucón hidrófobo con un grupo funcional de quinona–hidroquinona y un resto de aminoazúcar hidrófilo [2, 3].

15 Estructura química de la daunorrubicina y la doxorubicina



30 La doxorubicina se usa ampliamente en el tratamiento de los sarcomas óseos y de tejidos blandos, y en los carcinomas de pulmón, mama, tiroides, vejiga, ovario, testículos, cabeza y cuello [1, 4]. La doxorubicina también se usa contra las leucemias y los linfomas, pero la daunorrubicina es el principal tratamiento contra las leucemias agudas. Los índices de respuesta globales para la doxorubicina son del 45% para el cáncer de tiroides, 41% para los linfomas, 33% para los carcinomas de vejiga, 26% para los sarcomas, 25% para los carcinomas de ovario, 24% para las leucemias [5].

35 La doxorubicina tiene múltiples mecanismos de acción, pero la mayor parte de la actividad antitumoral de la doxorubicina y de otras antraciclinas procede de su capacidad para intercalarse con el ADN, lo que produce un bloqueo de la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Las antraciclinas también inhiben la topoisomerasa II y afectan a la reparación del ADN [1, 5]. Debido a su grupo funcional de quinona–hidroquinona, se cree que las antraciclinas están implicadas en la generación de radicales libres, que conduce a dañar el ADN [2]. Las antraciclinas se unen específicamente a la cardiolipina, un fosfolípido encontrado a altas concentraciones en las mitocondrias cardiacas y las membranas de las células malignas, lo que puede explicar los efectos secundarios cardiopatóxicos de la doxorubicina [1]. Las antraciclinas tienen índices terapéuticos limitados, es decir, la dosis administrada tiene que reducirse a un intervalo, pues el fármaco no tiene efecto si la dosis es demasiado baja y puede provocar graves efectos secundarios si la dosis es demasiado elevada. La toxicidad limitante de la dosis aguda de la doxorubicina es la inhibición de la médula ósea, la leucopenia y la estomatitis, que se producen en el 80% de los pacientes tratados. Otros efectos secundarios incluyen alopecia (100%), náuseas y vómitos (20–55%), toxicidad cardíaca, es decir, arritmias supraventriculares, bloqueo cardíaco, taquicardia ventricular e incluso insuficiencia cardíaca congestiva en el 1–10% de los pacientes.

45

Los derivados de antraciclina ya han sido revelados con anterioridad por, p.ej.: Pribe (2003) "Chemico-Biological Interactions" 145:349-358, y en los documentos US-4 948 880, US-6 673 907 y WO00/56267. Estos derivados tienen un efecto citotóxico en el tratamiento del cáncer.

5 La terapia con radionucleidos desempeña un papel relativamente pequeño, aunque importante, en la terapia contra el cáncer, y actualmente cada vez está cobrando un mayor protagonismo. La terapia con radionucleidos emplea la radiación nuclear para erradicar las células malignas. La radiación puede ser generada por nucleidos estables, p.ej.,  $^{10}\text{B}$  y  $^{157}\text{Gd}$  tras la activación de neutrones, o por nucleidos radiactivos. El radionucleido terapéutico más comúnmente usado, especialmente, contra el cáncer de tiroides, es el emisor  $\beta$  de amplitud intermedia ( $800\ \mu\text{m}$ ),  $^{131}\text{I}$ , pero la administración de  $^{131}\text{I}$  provoca un considerable daño por radiación en el tejido sano [6]. Sin embargo, debido a estos efectos secundarios, el reconocimiento del potencial terapéutico de los emisores de electrones Auger de baja energía y poca amplitud, tales como  $^{125}\text{I}$ , es cada vez mayor. Para que éste sea eficaz en el tratamiento del cáncer,  $^{125}\text{I}$  debe ser administrado directa y selectivamente en los núcleos de las células tumorales, pues  $^{125}\text{I}$  no es tóxico, a no ser que esté a unos pocos nanómetros del ADN [7]. La terapia con  $^{125}\text{I}$  requiere, por tanto, un procedimiento de administración específicamente nuclear, que ya se ha conseguido anteriormente usando nucleósidos, oligonucleótidos, hormonas esteroideas y factores de crecimiento marcados con  $^{125}\text{I}$ , pero cuya mejora ha sido reconocida [7].

15 Murali D. y DeJesus. O, "Bioorganic & Medicinal Chemistry letters", 8 (1998) 3419-3422, describen un derivado de daunorrubicina radiomarcado que tiene mejores propiedades citotóxicas que la doxorubicina. En el artículo, no se presentan los resultados, y no se ha publicado una continuación de este trabajo.

20 La administración dirigida de fármacos a través de liposomas minimiza los efectos secundarios limitantes de la dosis de la quimioterapia convencional contra el cáncer, tales como la inhibición de la médula ósea, mucositis, toxicidad cardíaca, neurotoxicidad y nefrotoxicidad [1], mediante la encapsulación del agente citotóxico en las vesículas unidas a la membrana (liposomas) y el acoplamiento de anticuerpos con especificidad tumoral a las membranas de los liposomas (liposomas diana). Los liposomas diana de la sangre son elevados activa y selectivamente por las células tumorales que sobreexpresan el marcador de la superficie diana. Sin embargo, en lugar de lograr un avance, hasta el momento, esta estrategia no ha mejorado de manera importante la quimioterapia [8]. Así pues, existe una gran necesidad por agentes terapéuticos y estrategias de tratamiento más potentes.

### **Resumen de la invención**

30 La presente invención se refiere a agentes de diagnóstico y terapéuticos que poseen propiedades de intercalación con el ADN y a los que se pueden acoplar nucleidos. La presente invención se refiere además a sistemas de administración de fármacos para estos agentes de diagnóstico o terapéuticos y a procedimientos terapéuticos y de diagnóstico que usan dichos agentes o sistemas de administración de fármacos. La presente invención se dirige a los diagnósticos del cáncer y la terapia contra el cáncer. El objetivo de la presente invención consiste en administrar un nucleido específicamente en los núcleos de las células tumorales y combinar así los beneficios de la terapia con radionucleidos, la quimioterapia y la administración dirigida de fármacos liposomales en un enfoque de dirección de una o dos etapas que minimice los efectos secundarios citotóxicos en el tejido sano. Así pues, la presente invención proporciona una nueva estrategia terapéutica con fármacos nuevos que, posiblemente, son más potentes que los fármacos quimioterapéuticos conocidos hasta ahora.

40 Las antraciclinas son, por sí mismos, potentes fármacos anticancerígenos. En la presente solicitud, los inventores han sintetizado derivados de aminobencilo de la daunorrubicina (fármacos precursores) que tienen perfiles de citotoxicidad similares a las antraciclinas comercializadas con éxito, la doxorubicina y la daunorrubicina. Cuando los presentes inventores yodaron los fármacos precursores con  $^{125}\text{I}$ , obtuvieron agentes radioterapéuticos que eran más eficaces contra las células tumorales cultivadas. Para proteger el tejido sano y administrar el radionucleido selectivamente en las células cancerosas malignas, es posible encapsular los derivados de daunorrubicina acoplados a  $^{125}\text{I}$  en liposomas diana, que sirven con vehículos de administración del fármaco específicamente a las células tumorales.

45 Los resultados de los experimentos descritos en la presente memoria confirman que los agentes terapéuticos según la presente invención pueden ser encapsulados satisfactoriamente en liposomas diana, y que los fármacos se conservan bien en las condiciones de preparación y análisis experimentales. Tras una incubación con células tumorales, los agentes anteriormente mencionados alcanzan y se unen al núcleo de la célula con una afinidad similar a la de la doxorubicina. Una vez unidos al ADN, el agente radioterapéutico provoca la fragmentación del ADN, conduciendo a una inhibición del crecimiento de las células tumorales de varios órdenes de magnitud más que la provocada por la doxorubicina y la daunorrubicina, dos de los agentes quimioterapéuticos con mayor éxito en el campo clínico actual.

50 Ninguno de los fármacos precursores o de los fármacos radioterapéuticos según la presente invención ha sido descrito previamente en la técnica anterior.

55 Según un aspecto de la invención, se proporcionan derivados de antraciclina que sirven como moléculas precursoras de los agentes radioterapéuticos, y que, en lo sucesivo, serán denominados fármacos precursores. Los fármacos

precursores se intercalan con el ADN y poseen propiedades citostáticas. Por tanto, los fármacos precursores se pueden usar por sí mismos en una terapia contra el cáncer dirigida a células o a tejidos. Los derivados de antraciclina (fármacos precursores) se definen en la reivindicación 1.

5 Según otro aspecto más de la invención, se proporcionan fármacos radioterapéuticos que se pueden usar en una radioterapia dirigida a células o a tejidos. Los agentes radioterapéuticos son generados por sus precursores mediante la unión de los fármacos precursores con un nucleído o un grupo químico que contiene un nucleído. Tal nucleído puede ser un nucleído radiactivo, un nucleído estable o un nucleído que se puede activar mediante la exposición a neutrones o fotones, p.ej.,  $^{10}\text{B}$  (como parte de un derivado de un compuesto en jaula rico en boro, tal como los *closo*-carboranos *o*- $m$ - o  $p$ - $\text{C}_2\text{H}_{12}\text{B}_{10}$ ), y en lo sucesivo serán denominados nucleídos. Los fármacos radioterapéuticos se definen en las  
10 reivindicaciones 2-3.

Según otro aspecto más de la invención, el fármaco radioterapéutico también se puede usar como una herramienta de generación de imágenes para los diagnósticos del cáncer. El uso como una herramienta de generación de imágenes se define en la reivindicación 4.

15 Según otro aspecto más de la invención, el fármaco precursor o el fármaco radioterapéutico también se puede usar como un agente de dirección hacia el ADN, es decir, un agente que interactúa con el ADN según lo definido en la reivindicación 5.

Según otro aspecto más de la invención, también se proporcionan sistemas de administración de fármacos. Dicho sistema comprende preferiblemente un vehículo capaz de encapsular los fármacos precursores o los fármacos radioterapéuticos (que poseen propiedades de interacción con el ADN) y guiar los fármacos específicamente o de  
20 forma preferente a la población de células diana. Por consiguiente, los efectos dañinos de las células y los tejidos afectarán de forma preferente a las células y a los tejidos diana. Tales sistemas de administración de fármacos pueden implicar estrategias de dirección de una o varias etapas. Las propiedades de intercalación con el ADN de los fármacos precursores son la base de la etapa de dirección hacia el ADN que dirige sus efectos citotóxicos al núcleo, o cuando el nucleído está acoplado al fármaco precursor, localiza la radiactividad emitida desde el nucleído en el núcleo de la  
25 célula. La etapa de dirección que, en lo sucesivo, se denominará etapa de dirección hacia el ADN, aumenta así de manera espectacular el efecto terapéutico de los fármacos radioterapéuticos y reduce el daño provocado a las células y los tejidos sanos.

Para diferenciar entre el tejido sano y el maligno, los fármacos radioterapéuticos son dirigidos hacia las células o los tejidos cancerosos usando un sistema de administración de fármacos que presenta en su superficie un agente dirigido  
30 específicamente a las células tumorales como etapa de dirección hacia las células en una estrategia de dirección de dos etapas, que en lo sucesivo se denominará etapa de dirección hacia las células. El vehículo de los fármacos es capaz de encerrar o unirse al fármaco radioterapéutico y dirigir su transporte tras la administración sistémica hacia y, preferiblemente, a través de las membranas de las células diana. Por consiguiente, el efecto citotóxico y/o radiotóxico de los fármacos radioterapéuticos se ubicará en la población de células diana. El sistema de administración de  
35 fármacos se define en las reivindicaciones 6-14.

Según otro aspecto más de la invención, también se proporciona un procedimiento para diagnosticar o tratar el cáncer que comprende administrar dichos sistemas de administración de fármacos, que incluyen el fármaco precursor o el fármaco radioterapéutico, a un paciente en necesidad de los mismos. Además de su uso como tratamiento contra  
40 tumores sólidos, la invención también se prevé como un tratamiento contra células tumorales metastásicas en circulación sistémica tras la retirada del tumor primario. El tratamiento podría ser particularmente beneficioso contra el cáncer de mama diseminado, pero también contra los cánceres diseminados de ovario, de próstata y colorrectal.

Dichos procedimientos terapéuticos también se pueden usar en combinación con una posterior radiación del tumor cuando se conoce la ubicación del mismo. Se puede lograr una radioterapia local usando nucleídos estables y la activación mediante la radiación externa con neutrones o fotones.

45 La invención también podría ser un tratamiento eficaz contra los tumores multirresistentes (MDR) que sobreexpresan la P-glucoproteína (PGP), una bomba de descarga unida a la membrana para los xenobióticos. Los fármacos radioterapéuticos, en este caso, se dirigirían y dañarían por radiación la P-glucoproteína, cuya unión con las antraciclinas es conocida.

#### **Descripción de las figuras:**

50 **Figura 1:** Conservación de doxorubicina en tampón o medio y del Compuesto 1 en tampón a una temperatura de 37°C.

**Figura 2:** Imagen de microscopía de crío-transmisión de liposomas cargados con el Compuesto 1. Las esferas representan los liposomas y los puntos del interior de los liposomas representan el Compuesto 1 cristalino.

**Figura 3:** Autorradiografía del Compuesto 1 marcado con  $^{125}\text{I}$  tras 1 h de incubación a  $37^\circ\text{C}$  con células tumorales.

**Figura 4:** Unión del Compuesto  $1-^{125}\text{I}$  a ADN libre tras una incubación de 2,5 h sobre hielo.

**Figura 5:** Fragmentación de ADN tras la unión del Compuesto  $1-^{125}\text{I}$  en un gel de agarosa cargado con tapones que contienen ADN de células de glioma U-343MGaC12:6. En la figura, a) representa un marcador del peso molecular (*Scizosaccharomyces pombe*, patrón de ADN Megabase), b) ADN incubado con Compuesto  $1-^{125}\text{I}$ ; c) ADN incubado con Compuesto  $1-^{125}\text{I}$  y un exceso de doxorubicina; y d) controles con ADN incubado sin el Compuesto  $1-^{125}\text{I}$ .

**Figura 6:** Curvas de crecimiento de células tumorales tratadas con 0,5 ng/ml de doxorubicina, daunorrubicina, Compuesto 1 o Compuesto  $1-^{125}\text{I}$ .

### Descripción detallada de la invención

Los derivados de los fármacos descritos en la presente memoria están destinados a usarse como agentes terapéuticos contra el cáncer en forma de fármacos precursores o acoplados a un nucleído como potentes fármacos anticancerígenos radioterapéuticos o herramientas de generación de imágenes de diagnóstico.

Sin embargo, su utilidad podría verse comprometida por su indiscriminada citotoxicidad hacia el tejido sano. Este problema se minimizará mediante la encapsulación de los fármacos en liposomas, o vehículos de fármacos alternativos, y la dirección selectiva hacia las células tumorales mediante la unión de los agentes dirigidos a tumores específicos a la superficie de los liposomas o vehículos de fármacos alternativos. Por lo tanto, los fármacos precursores o fármacos radioterapéuticos están destinados a usarse en combinación con un sistema de administración dirigida de fármacos de dos etapas según lo revelado en la patente estadounidense n.º 6.562.316. Tal sistema de administración de fármacos comprende un vehículo acoplado a uno o varios agentes dirigidos a células para dirigir el sistema de administración de fármacos, en la etapa de dirección hacia las células, específicamente a una población de células o un tejido diana. En la etapa de dirección hacia el ADN, los nucleídos encapsulados serán dirigidos hacia el núcleo de la célula mediante su unión con una molécula con propiedades de intercalación con el ADN. Los fármacos precursores o los fármacos radioterapéuticos descritos en la presente memoria servirán como tales agentes dirigidos hacia el ADN que poseen propiedades de intercalación con el ADN.

El sistema de dirección de dos etapas descrito minimizará la citotoxicidad de los nucleídos, los fármacos precursores o los fármacos radioterapéuticos en el tejido sano. Otra ventaja más del sistema de dirección de dos etapas es que tiene el potencial de tratar células tumorales metastásicas y/o multirresistentes.

El vehículo de fármacos podría ser una molécula, un agregado o una partícula capaz de unirse o encerrar agentes farmacéuticamente activos, es decir, fármacos precursores o fármacos radioterapéuticos. Actualmente, los liposomas son los vehículos de fármacos preferidos, pero los vehículos poliméricos de fármacos, tales como los microgeles o las partículas de compuesto de lípido y polímero pueden ser igualmente adecuados o mejores para ciertas aplicaciones.

Los agentes de dirección para la etapa de dirección hacia las células de la estrategia de dirección de dos etapas se unen selectivamente y con alta afinidad a las células tumorales. Lo ideal es que las dianas con especificidad tumoral sean moléculas que existan exclusivamente en la superficie de las células tumorales. Sin embargo, todavía queda por descubrirse un marcador celular con especificidad hacia los tumores en general que esté presente en todas las células cancerosas, pero ausente en las células normales, y las diferencias entre las células tumorales y las células normales superan con mucho las similitudes. En cualquier caso, hay una serie de marcadores de la superficie celular sobreexpresados específicamente en ciertas células tumorales. Por ejemplo, los receptores del EGF (factor de crecimiento epidérmico) son sobreexpresados en células tumorales del cerebro, la vejiga, la mama y el pulmón con respecto a las células normales. Los receptores del EGF de los tumores pueden servir como diana para alcanzar una alta selectividad por radionucleídos o nucleídos estables conjugados con EGF. También se ha demostrado la eficacia de los anticuerpos monoclonales contra células tumorales diana para la dirección hacia tumores.

Por tanto, el agente para la etapa de dirección hacia las células se selecciona preferiblemente de un grupo que comprende ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y también puede comprender el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o una molécula que se una a un receptor del EGF mutado específico del tumor.

El sistema liposomal de administración de fármacos, el agente de dirección de la primera etapa y sus respectivas preparaciones se describen en la patente estadounidense n.º 6.562.316 anteriormente mencionada. La preparación de vehículos poliméricos o de vehículos de lípido y polímero no se revela en la presente patente, pero el experto en la técnica obtendrá fácilmente de la bibliografía protocolos de preparación relevantes.

### Fármacos precursores (agente de dirección hacia el ADN)

Los derivados de antraciclina (fármacos precursores) usados como agentes de dirección hacia el ADN deberían poseer propiedades de interacción o propiedades de unión electrostática con el ADN. Los intercaladores con el ADN son

particularmente adecuados como agentes de dirección hacia el ADN, pues la propia intercalación de la molécula con el ADN produce una actividad terapéutica.

En las reivindicaciones anexas, se encuentran los derivados de antraciclina específicos según la presente invención.

La presente invención se refiere a mezclas estereoisoméricas de dichos fármacos precursores (en los que se basan los fármacos radioterapéuticos), así como a estereoisómeros separados.

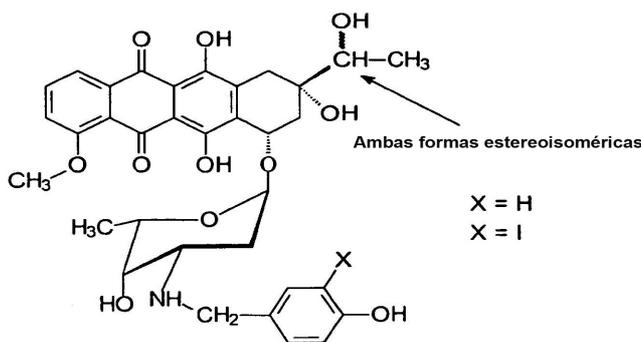
El agente para la etapa de dirección hacia el ADN debe:

- poseer una alta afinidad por el ADN nuclear,
- poseer propiedades que permitan una carga eficiente en el vehículo,
- mostrar una fuga (o liberación) mínima a pH fisiológico y fuerza iónica cuando están encerrados en (o unidos con) el vehículo.
- poseer propiedades que, tras liberarse del vehículo, permitan al agente alcanzar y unirse con el ADN nuclear.

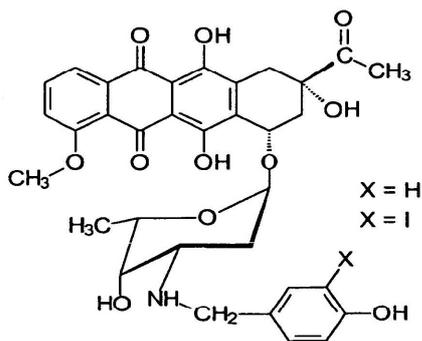
Los fármacos precursores y los fármacos radioterapéuticos según la presente invención presentan estas características.

A continuación se ofrecen ejemplos específicos de los fármacos precursores:

15

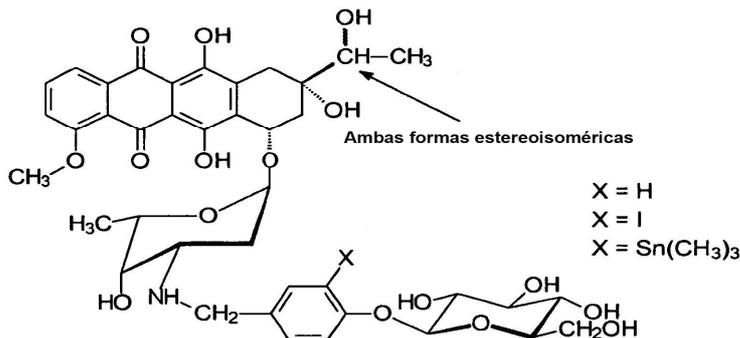


20



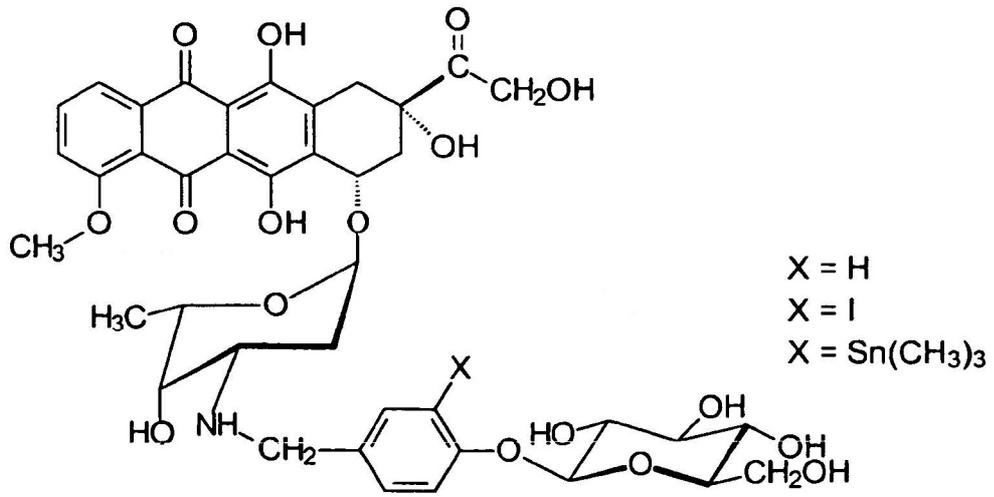
25

30



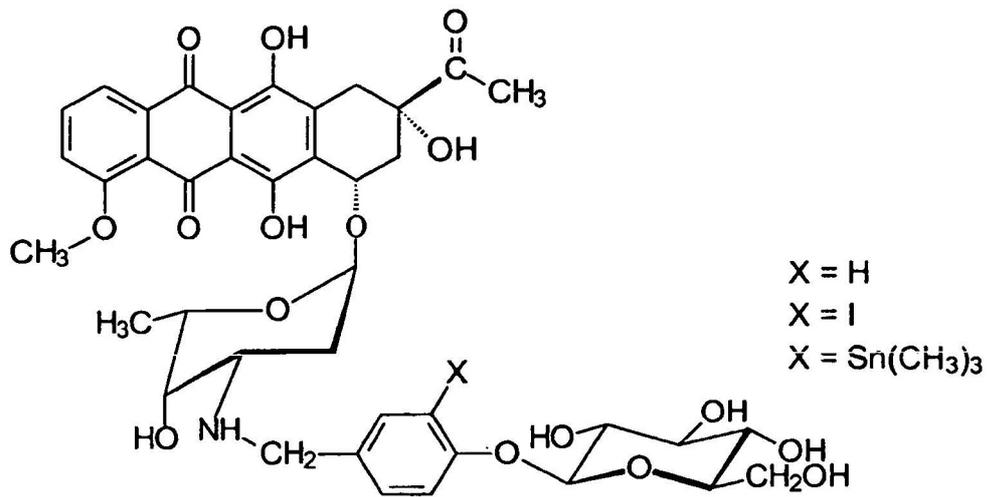
35

5



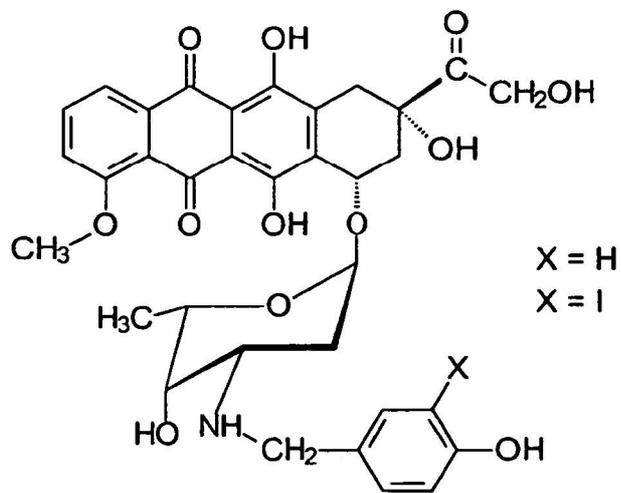
10

15



20

25



30

35

Síntesis de los fármacos precursores:

La síntesis de los fármacos precursores sigue procedimientos estándar y puede ser realizada por cualquier experto en la técnica. La síntesis de los fármacos precursores no forma parte de ningún determinado ámbito de protección.

Fármacos radioterapéuticos

5 Cuando se usan los fármacos radioterapéuticos según la presente invención, es decir, los fármacos precursores acoplados a un nucleido, se enviarán grandes cantidades de nucleidos a las células tumorales, y estos nucleidos alcanzarán y se unirán con el ADN nuclear. Cada desintegración de un nucleido dañará el ADN nuclear. Por lo tanto, los fármacos radioterapéuticos serán más potentes que sus fármacos precursores a la misma concentración. La cantidad de daño del ADN será al menos diez veces superior cuando el nucleido radiactivo se ubique dentro del núcleo celular en comparación con la situación en la que el nucleido radiactivo se encuentra fuera del núcleo celular. El envío de grandes cantidades de nucleidos radiactivos hacia las células tumorales puede, por tanto, aumentar la amplitud del tratamiento desde un tratamiento paliativo a curativo. Si se usan estrategias convencionales de dirección celular de una etapa (sin la intercalación con el ADN) sólo parecen posibles los tratamientos paliativos.

15 Cada radionucleido tiene un conjunto diferente de propiedades, tales como la vida media y el tipo de radiación emitida. La invención permite elegir selectivamente el nucleido apropiado para el tipo de cáncer o el problema clínico específico. La vida media física del radionucleido seleccionado tiene que coincidir con la vida media biológica del fármaco precursor. Es, por tanto, importante que las características de emisión del radionucleido coincidan con el tamaño y la ubicación del tumor en particular. Los emisores beta de alta energía, tales como el  $^{90}\text{Y}$ , pueden ser adecuados para el tratamiento de tumores de gran tamaño. Otros nucleidos, tales como el  $^{131}\text{I}$ , emiten partículas beta de baja energía y poseen, por consiguiente, una amplitud menor de la radiación que les hace más adecuados para los tumores pequeños, o incluso para las células tumorales individuales. Los emisores de electrones Auger, tales como  $^{125}\text{I}$  y  $^{123}\text{I}$ , emiten partículas que viajan sólo aproximadamente 1–2  $\mu\text{m}$  y, por tanto, tienen que estar ubicados dentro del núcleo de las células cancerosas para dañar el ADN. Las amplitudes de los emisores de partículas alfa son, comúnmente, de entre 50 y 70  $\mu\text{m}$ , y provocan la deposición local de una gran cantidad de energía.

25 Los radiohalógenos tienen una amplia selección de vidas medias físicas y de tipos de radiación emitida, lo que amplía su intervalo de aplicación. El emisor beta  $^{131}\text{I}$  es uno de los radionucleidos más comúnmente usados en la terapia con nucleidos. Los radiohalógenos emisores de positrones, tales como  $^{18}\text{F}$ ,  $^{76}\text{Br}$  y  $^{124}\text{I}$ , se pueden usar a efectos de diagnóstico en la tomografía por emisión de positrones (PET). Permiten la dosimetría de la radiación de los tejidos y la monitorización de los cambios producidos en el volumen tumoral mediante escáneres de PET.

30 El radiohalógeno  $^{211}\text{At}$  tiene una vida media relativamente corta (7,2 horas) y se desintegra mediante la emisión de partículas  $\alpha$ . Es sumamente citotóxico y, por tanto, podría ser un eficaz agente terapéutico si se administrara específicamente en la población de células diana.

35 Los emisores de electrones Auger matan eficazmente las células cuando se incorporan en el núcleo celular. El  $^{125}\text{I}$  (vida media de 60 días),  $^{123}\text{I}$  (vida media de 13,2 horas) y  $^{77}\text{Br}$  (vida media de 56 horas) se desintegran mediante la captura de electrones seguida por la emisión de electrones Auger. Los fármacos radioterapéuticos tratados en la presente solicitud de patente son especialmente adecuados para su acoplamiento a  $^{125}\text{I}$ . El  $^{125}\text{I}$  es relativamente barato, se puede obtener fácilmente a nivel comercial y su vida media relativamente larga es apropiada para aplicaciones *in vitro*. El  $^{123}\text{I}$  también podría ser un interesante candidato para un uso terapéutico, debido a su corta vida media física y, especialmente, a que también emite radiación y además de electrones Auger, lo que permite la generación de imágenes.

40 Los radionucleidos con poca amplitud de radiación, p.ej.:  $^{125}\text{I}$  (radiación de Auger) y  $^{211}\text{At}$  (partículas alfa) generan altas densidades locales de ionización y actualmente parecen ser los más adecuados para ser dirigidos hacia células individuales, provocando un daño mínimo a las células y los tejidos sanos circundantes.

45 Los fármacos radioterapéuticos pueden incluir nucleidos estables, que pueden ser activados por neutrones o fotones. El nucleido estable  $^{10}\text{B}$  no es citotóxico. Sin embargo, si se ubica selectivamente un compuesto enriquecido en  $^{10}\text{B}$  en células tumorales, después es posible radiar externamente las células con neutrones de baja energía no tóxicos. Estos neutrones son capturados por átomos de  $^{10}\text{B}$  que generan átomos de  $^{11}\text{B}$  en estado excitado, que se desintegran instantáneamente en dos partículas muy citotóxicas, partículas  $\alpha$  e iones  $^7\text{Li}^{3+}$ . La amplitud de estos iones en el tejido es de aproximadamente 9 y 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente, cantidades cercanas al diámetro de una célula.  $^{157}\text{Gd}$  también puede ser sometido a la activación por neutrones. Otras alternativas son isótopos de yodo o bromo estables, que pueden ser activados por fotones. Además, es posible combinar estos isótopos con radionucleidos emisores  $\beta$  de gran amplitud, es decir,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  o  $^{189}\text{Re}$ , que producen una radiación de fuego cruzado adecuada para los agregados de células tumorales de mayor tamaño. Estos nucleidos activados por neutrones o fotones pueden ser estabilizados, por ejemplo, usando carboranos cerrados, es decir, compuestos en jaula ricos en boro, tales como los *closo*-carboranos *o*-, *m*- o *p*- $\text{C}_2\text{H}_{12}\text{B}_{10}$ .

El nucleido radiactivo de los fármacos radioterapéuticos descritos en la presente solicitud de patente es preferiblemente  $^{123-125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{76-77}\text{Br}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  o  $^{189}\text{Re}$ , siendo el  $^{125}\text{I}$  el particularmente preferido; y el nucleido estable es preferiblemente  $^{10}\text{B}$  y  $^{157}\text{Gd}$ .

#### Radiomarcaje de fármacos precursores

- 5 Todos los fármacos precursores para radioyodación contienen un residuo aromático y son marcados con  $^{125}\text{I}$  usando procedimientos convencionales, tales como el procedimiento con cloramina T. El radiomarcaje se realizó bien mediante la sustitución electrofílica directa de un anillo aromático o mediante la sustitución de un grupo activador, tal como trialquilestanilo, p.ej., un grupo de trimetilestanilo o tributilestanilo, del anillo aromático. Estos procedimientos siguen procedimientos estándar y pueden ser realizados por cualquier experto en la técnica.

#### 10 Ejemplos

Para probar si los fármacos precursores o los fármacos radioterapéuticos según la presente invención podían ser usados en un sistema de administración de fármacos, se realizaron los siguientes experimentos.

#### Ejemplo 1. Conservación del fármaco en liposomas

##### *Preparación de los liposomas*

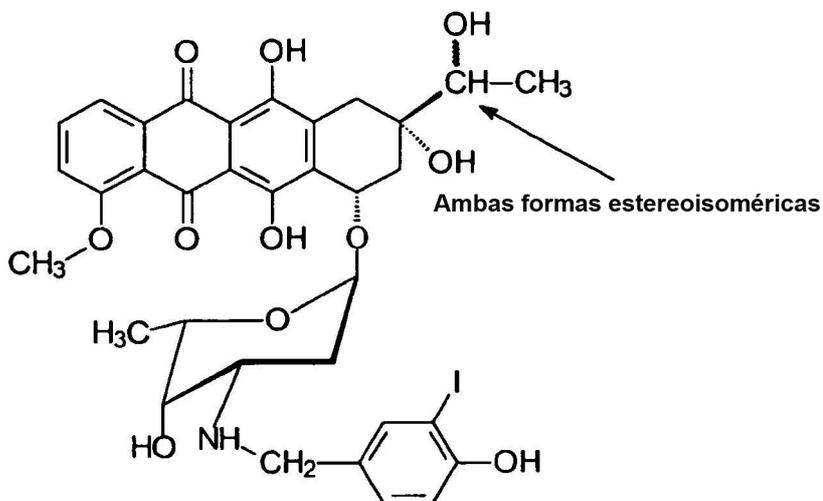
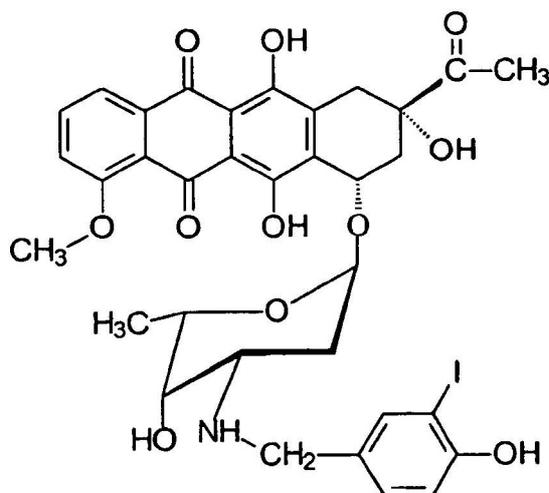
- 15 Los liposomas estaban compuestos por 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-colina (DSPC), colesterol y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidil-etanolamin-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) a una proporción molar de 57:40:3. Los liposomas se prepararon mediante el procedimiento de hidratación de película de lípidos [9]. En síntesis, se disolvieron colesterol y lípidos en cloroformo. Se evaporó el disolvente bajo una corriente suave de gas de nitrógeno y se secó la película de lípidos al vacío durante una noche. Se hidrató la película de lípidos con tampón de citrato 300mM (pH 4) durante 1 h con un mezclado intermedio con movimientos vorticiales a una concentración de lípidos de 20mM y una temperatura de 60°C. Se congelaron los liposomas repetidas veces en nitrógeno líquido y se descongelaron a una temperatura de 60°C cinco veces antes de la extrusión. Se extrudieron los liposomas diez veces a través de dos filtros apilados de membrana de policarbonato (Whatman Inc. Nucleopore, Newton, MA) con un tamaño de poro de 100 nm a temperatura ambiente usando un mini-extrusor Avanti (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL).

##### 25 *Encapsulación del fármaco*

- Se encapsularon en liposomas el Compuesto 1 (3'-N-(4-hidroxi-3-yodobencil)-13-(R/S)-dihidrodaunorrubicina, mezcla estereoisomérica) y el Compuesto 2 (3'-N-(4-hidroxi-3-yodobencil)daunorrubicina), cuyas estructuras se muestran más abajo, o doxorubicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) usando el protocolo de carga dirigido por un gradiente del pH de Mayer *et al.* El gradiente de pH a través de la membrana de los liposomas se generó intercambiando el tampón de citrato 300mM extravascular (pH 4) por solución salina (HBS) 150mM tamponada con N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) 20mM (pH 7,5) sobre una columna de Sefadex G-50. Se disolvió la doxorubicina en HBS a una concentración de 1mM. Se disolvió el Compuesto 1 a una concentración de 0,5mM en solución de sacarosa al 10% (p/v). El Compuesto 2 no se disolvió completamente a una concentración de 0,5mM en la solución de sacarosa al 10% (p/v), pero se disolvió al añadir los liposomas y encapsular el fármaco en los liposomas. Se añadió una solución precalentada de fármaco a los liposomas en una proporción molar de fármaco con respecto a los lípidos de 0,2. Se incubó la mezcla durante 15 min a una temperatura de 60°C con un mezclado intermitente usando un aparato de movimientos vorticiales dando como resultado una encapsulación del fármaco del 100%.

40

45

Estructuras químicas de los Compuestos 1 y 2.**Compuesto 1****Compuesto 2***Unión del ligando de dirección trastuzumab a los liposomas cargados de fármaco**a) Conjugación de trastuzumab-<sup>125</sup>I con DSPE-PEG<sub>3400</sub>*

30 Se hidrató el *N*-hidroxisuccinimidiléster de 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil-etanolamina-*N*-[metoxi (polietilenglicol)-3400 (NHS-DSPE-PEG<sub>3400</sub>) con solución de trastuzumab-<sup>125</sup>I a una proporción molar de 0,1:6 y una temperatura de 60°C durante 5 min. Se usó trastuzumab radiomarcado para localizar los liposomas. La concentración de NHS-DSPEPEG<sub>3400</sub> fue de aproximadamente 0,2mM. Se incubó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se retiró el trastuzumab sin unir del trastuzumab-<sup>125</sup>I-DSPE-PEG<sub>3400</sub> mediante filtración en gel sobre una

35 columna de sefacril S-300 con HBS (pH 7,4).

*b) Transferencia de trastuzumab-<sup>125</sup>I-DSPE-PEG<sub>3400</sub> a los liposomas*

Se mezcló el trastuzumab-<sup>125</sup>I-DSPE-PEG<sub>3400</sub> con los liposomas cargados de fármaco a una proporción molar de 1:33 y una temperatura de 60°C durante 1 h. Se retiró el trastuzumab-<sup>125</sup>I-DSPE-PEG<sub>3400</sub> no incorporado de los liposomas mediante filtración en gel sobre una columna de sefarosa CL-4B con HBS (pH 7,4).

*Determinación de la conservación del fármaco*

Se incubaron los liposomas a temperaturas de 37°C o 60°C. A intervalos temporales seleccionados, se apartaron alícuotas por triplicado y se retiró el fármaco no encapsulado sobre una mini-columna de sefadex G-50 con HBS (pH 7,5) en un campo centrífugo de 680 g durante 2 min. Se ajustó el volumen del eluyente hasta 1 ml con HBS y se añadió 1 ml de solución de Triton X-100 al 1%. Se calentaron las muestras hasta una temperatura de 90°C y se volvieron a enfriar hasta la temperatura ambiente. Se determinó la intensidad de la fluorescencia de las muestras a una longitud de onda de excitación de 468 nm y una longitud de onda de emisión de 589 nm. Se determinó el porcentaje del fármaco encapsulado tras la incubación en relación con la cantidad de fármaco encapsulado antes de la incubación.

*Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Crio-TEM) de los liposomas cargados*

En síntesis, se transfirieron las muestras de liposomas a una rejilla de cobre revestida con una película polimérica perforada en una cámara ambiental hecha a la medida a una temperatura controlada (25°C) y unas condiciones de humedad para minimizar la evaporación del agua. Se retiró el exceso de muestra por aspiración sobre un filtro de papel. Se vitrificaron películas de muestra finas (10–500 nm) mediante inmersión en etano líquido a una temperatura de -165°C y se transfirieron bajo una atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 165°C a un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 920 A (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania). Se expusieron las muestras a una densidad de electrones de 5–15 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> y se tomaron imágenes en el modo de fondo claro sin pérdidas con un voltaje de aceleración de 80 kV.

*Resultados y descripción*

Aproximadamente el 80% de la doxorrubicina y más del 90% del Compuesto 1 permanecieron encapsulados en los liposomas al incubarlos en medio a una temperatura de 37°C durante 24 h (Figura 1). Estos resultados muestran que bajo las condiciones descritas para la preparación de los liposomas y el cultivo de células, la doxorrubicina y el Compuesto 1 no serán liberados significativamente de los liposomas.

La imagen de crio-TEM de los liposomas que contienen trastuzumab-<sup>125</sup>I-DSPE-PEG<sub>3400</sub> y cargados con el Compuesto 1 (Figura 2) confirma que el Compuesto 1 está en un estado cristalino dentro de los liposomas.

**Ejemplo 2. Unión al ADN****Ejemplo 2a***Cultivo de células*

Se desarrollaron células tumorales humanas cultivadas en sobreexpresión como cultivos de monocapas usando medio F-10 de Ham (Biochrom AG, Berlín, Alemania) que contenía suero bovino fetal al 10%, glutamina (2mM), estreptomina (100 µg/ml) y penicilina (100 UI/ml) a una temperatura de 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% humidificada.

*Unión al ADN*

Se desarrollaron células A431 tumorales humanas cultivadas (carcinoma escamoso) sobre placas de vidrio, se enfriaron hasta una temperatura de 4°C y se lavaron con tampón de fosfato. Las células fueron desactivadas en metanol durante 15 minutos a una temperatura de -20°C y luego lavadas rápidamente a una temperatura de 4°C con tampón de fosfato. Tras ello, se permeabilizaron las células mediante un tratamiento con acetona durante 10 segundos a una temperatura de 4°C. Tras secarlas, se incubaron las células con Compuesto 1-<sup>125</sup>I a temperatura ambiente durante una hora, se lavaron y se analizó su radiactividad usando un contador gamma (1480 Wallac Wizard, Perkin Elmer, Wellesley, MA, EE.UU.). Además, las células fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia.

*Resultados y descripción*

Cuando se incubaron las células A431 tumorales humanas permeabilizadas cultivadas (carcinoma escamoso) con Compuesto 1-<sup>125</sup>I a temperatura ambiente durante una hora, se determinó la radiactividad específica del Compuesto 1 unido a las células en  $21,2 \pm 3,7 \times 10^3$  cpm/10<sup>5</sup> células tras restar el fondo. Fue posible bloquear la unión usando un exceso de doxorrubicina.

La microscopía de fluorescencia reveló que el Compuesto 1 estaba unido al núcleo celular y no se encontraba en el interior del citoplasma. Se repitieron los experimentos de microscopía de fluorescencia con resultados similares usando células T24 de cáncer de vejiga humano y células U343 de glioma humano.

**Ejemplo 2b***Tapones de agarosa*

Se disolvió agarosa InCert (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) en medio libre de suero hasta una concentración final del 1%. Se mezcló 1 ml de solución de agarosa con células  $1,5 \times 10^6$  U-343 y se moldearon 20  $\mu$ l de tapones en moldes de plástico y se enfriaron durante 30 min a una temperatura de 4°C. Se sumergieron los tapones en tampón de lisis (1 mg/ml de Proteinasa K, Sarcosil al 2% en 10 ml de  $\text{Na}_3\text{-EDTA}$  0,5M, pH 8,0) a una temperatura de 50°C durante una noche para obtener ADN puro. Tras la lisis, se lavaron los tapones dos veces con  $\text{Na}_3\text{-EDTA}$  0,5M para eliminar los residuos celulares. Se almacenaron los tapones a una temperatura de 4°C en  $\text{Na}_3\text{-EDTA}$  0,5M. Los tapones sin ADN sirvieron como controles. Se incubaron los tapones de agarosa por duplicado durante 3 h sobre hielo con 600  $\mu$ l de solución que contenía el Compuesto 1- $^{125}\text{I}$ . Los tapones control contenían cantidades excesivas de doxorubicina a una concentración de  $3 \times 10^{-5}\text{M}$ . La concentración final del Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  fue de  $4 \times 10^{-7}\text{M}$  (en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Tras incubar y enjuagar cuidadosamente sobre hielo, se determinó la radiactividad restante de los tapones usando un contador gamma.

#### *Autorradiografía*

Se incubaron células de cáncer de mama cultivadas SKBR-3 con compuesto 1- $^{125}\text{I}$  durante 1 h a una temperatura de 37°C y una concentración de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de medio de cultivo (0,3 kBq/ng). Tras la incubación, se lavaron las células 6 veces con medio libre de suero y se separaron con 1 ml de tripsina/EDTA (0,25%/0,02% en PBS, Biochrome, Berlín, Alemania) durante 10 minutos. Se volvieron a suspender las células con 14 ml de medio de cultivo y se transfirieron a tubos de centrifugación. Se centrifugaron las células durante 5 min a 1.200 rpm para obtener sedimentos celulares. Se fijaron los sedimentos celulares con tampón de formalina (formaldehído tamponado con fosfato 0,01M (4%), Histolab Products AB, Göteborg, Suecia) durante una semana a 4°C. Tras ello, se deshidrataron los sedimentos mediante el siguiente procedimiento: 2 x 15 min: EtOH al 70%; 30 min: EtOH al 90%; 2 x 15 min: EtOH al 95%; 2 x 15 min: EtOH al 99% y 3 x 20 min: solución de infiltración de historesina (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemania). Tras la introducción en historesina con activador durante una noche, se cortaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de los sedimentos y se transfirieron a placas. Se sumergieron las placas en fotoemulsión NTB de Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., EE.UU.) en la oscuridad y se secaron antes de su almacenamiento a 4°C durante 3 días. Se revelaron las placas con solución D19 de Kodak durante 3 min, tras lo que se transfirieron a ácido acético, al 0,1% durante 10 s y se fijaron con fijador Kodak durante 5 min, todo en la oscuridad. Tras lavar detenidamente con agua, se tiñeron los núcleos de las células con hematoxilina de Mayer (Histolab Products AB, Göteborg, Suecia) durante 3 min. Antes de montarlas con Pertex (Histolab Products AB, Göteborg, Suecia), se lavaron las placas con agua durante 5 min y se dejaron secar al aire. Se examinaron las células al microscopio y se capturaron imágenes de las células representativas.

#### *Resultados y descripción*

Se pudo confirmar la unión del Compuesto 1 con el núcleo celular mediante la autorradiografía del Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  (Figura 3), pues el patrón de tinción de  $^{125}\text{I}$  se localiza con los núcleos celulares teñidos con hematoxilina.

Al incubar los tapones de agarosa que contenían ADN de células U-343 durante 3 h sobre hielo con solución de Compuesto 1- $^{125}\text{I}$ , el Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  se acumuló en los tapones de agarosa. Fue posible bloquear la acumulación y, por tanto, la unión del Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  al ADN mediante cantidades en exceso de doxorubicina. Los resultados confirman la afinidad del Compuesto 1 por el ADN. El hecho de poder desplazar la unión del Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  con el ADN mediante la doxorubicina (Figura 4) sugiere que tanto el Compuesto 1 como la doxorubicina ocupan los mismos puntos de unión con el ADN.

#### **Ejemplo 2c**

##### *Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)*

Para investigar la eficacia del Compuesto 1- $^{125}\text{I}$  para inducir un daño en el ADN, se analizó la inducción de trozos de cadena doble (dsb) en una electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se incubaron tapones de agarosa con compuesto 1- $^{125}\text{I}$  según lo descrito anteriormente. Tras lavar, se mantuvieron los tapones a una temperatura de 4°C durante 8 días. Se cargaron entonces los tapones en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) (Seakem Gold agarose powder, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, EE.UU.). Se analizó la fragmentación del ADN durante una electroforesis en gel de campo pulsado de 45 h a 2 V/cm según el siguiente protocolo: pulsos de 10 min (es decir, el campo es pulsado cada 10 minutos) durante 3 h; pulsos de 20 min durante 5 h y 20 min; pulsos de 30 min durante 8 h; pulsos de 40 min durante 9 h y 20 min; y pulsos de 1 h durante 20 h. Una vez pasado el gel, se tiñó con bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 8 h, luego se destiñó en  $\text{H}_2\text{O}$  durante una noche. Como marcador del peso molecular, se usó *Scizosaccharomyces pombe*, un estándar de ADN de Megabase (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, EE.UU.). Se cortó cada carril en 2 bloques que correspondían a fragmentos de ADN con un tamaño igual o menor a 5,7 Mpb, e igual o mayor a 5,7 Mpb, respectivamente. Se colocó cada bloque en un vial y se midió la radiactividad en el contador gamma automático anteriormente mencionado. Se determinó la fracción de ADN menor de 5,7 Mpb y luego se usó para los cálculos con la fórmula de Blöcher:

$$F_{<k} = 1 - e^{-rk/n} (1 + rk/n(1-k/n)) \quad (\text{Int. J. Rad. Biol. 57, 7-12, 1990})$$

$F_{<k}$  es la fracción de ADN menor de  $k$  pares de bases;  $r$  es el número medio de dsb/cromosoma y  $n$  es el número total de pares de bases de un cromosoma de tamaño medio.

5 En este ensayo, se usó una  $k = 5,7$  Mpb;  $n = 130$  Mpb para el cromosoma humano medio.

Para obtener el número de trozos de cadena doble ( $r$ ), es necesario resolver numéricamente la fórmula.

#### Resultados y descripción

10 Se determinó el número de trozos de cadena doble (dsb) tras la incubación de compuesto  $1-^{125}\text{I}$  con ADN de células de glioma (Figura 5) en aproximadamente 0,4 dsb/desintegración. Así pues, acoplado al Compuesto 1, el  $^{125}\text{I}$  se coloca lo suficientemente cerca del ADN como para provocar la fragmentación del ADN, pues el  $^{125}\text{I}$  que no está unido al ADN no conduciría a la fragmentación del mismo. A modo de comparación, el uso de moléculas precursoras de ADN marcadas con  $^{125}\text{I}$ , que provoca la incorporación directa del nucleído a la cadena de ADN, da un valor de dsb de aproximadamente 1 dsb/desintegración. La diferencia de los valores de dsb es relativamente pequeña, lo que indica que el nucleído debe haber venido a una distancia muy corta del ADN (para que la radiación tenga ese efecto) y que se ha producido la intercalación con el ADN.

#### Ejemplo 2d

20 Se hidrató sal de sodio de ADN de timo bovino de tipo 1 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, M.O., EE.UU.) en tampón de PBES ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2mM, EDTA 1mM, NaCl 185mM, pH 7) a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml y se sometió a un tratamiento con ultrasonidos a aproximadamente 8  $\mu\text{A}$  en un desintegrador ultrasónico MSE Soniprep 150 (Integrated Services TCP Inc., Palisades Park, N.J., EE.UU.) durante 30 min en un baño de agua sobre hielo. Entonces se sometió la muestra a diálisis durante 48 h frente a BPES usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer® (PM: 10.000) (Pierce, Rockford, I.L., EE.UU.). Se determinó la concentración de ADN final espectrofotométricamente en un espectrofotómetro HP8453 (Hewlett-Packard Company Houston TX., EE.UU.) a una longitud de onda de 260 nm usando un coeficiente de excitación de  $12.824 \text{ M (pb)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

25 Se realizaron experimentos de valoración de la fluorescencia en un espectrofluorómetro SPEX 1680 Fluorolog (SPEX Industries Inc., Edison, N.J., EE.UU.) a temperatura ambiente con  $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$  (anchura del portaobjetos de 2,5 mm) y  $\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$  (anchura del portaobjetos de 2,5 mm). La concentración inicial de fármaco libre fue de  $1 \mu\text{M}$ . La concentración de fármaco libre ( $C_f$  (M)) se calculó determinando la proporción de la intensidad de la fluorescencia de los compuestos examinados en ausencia ( $I_0$ ) y en presencia de ADN ( $I$ ) según:

$$30 \quad C_f = C_T(I/I_0 - P) / (1 - P) \quad (\text{Biopolymers 6, 1225-1235, 1968})$$

en la que  $C_T$ (M) es la concentración inicial de fármaco y  $P$  es la proporción entre el rendimiento cuántico observado de la intensidad de la fluorescencia del fármaco completamente unido ( $I_{\text{min}}$ ) y el del fármaco libre ( $P = I_{\text{min}}/I_0$ ). La concentración del fármaco unido se calculó mediante la diferencia entre las constantes de unión ( $K_i$ ) de  $C_T$  y  $C_f$ , y los parámetros de exclusión ( $n$ ) se calcularon representando  $r/C_f$  frente a  $r$  (gráfica de Scatchard), en la que  $r$  es el número de moles de fármaco unido por mol de pares de bases de ADN. Las curvas teóricas del modelo de exclusión por vecindad se calcularon usando el algoritmo:

$$35 \quad r/C_f = K_i(1-nr)[(1-nr)/(1-(n-1)r)]^{n-1} \quad (\text{J. Mol. Biol. 86, 469-489, 1974})$$

40 en la que  $K_i$ ( $\text{M}^{-1}$ ) es la constante de unión intrínseca y  $n$  (pares de bases) es el parámetro de exclusión. Los parámetros  $K_i$  y  $n$  fueron variados para generar las curvas teóricas que mejor se ajustaran a los datos experimentales. La Tabla 1 (que figura a continuación) muestra las constantes de unión ( $K_i$ ) y los parámetros de exclusión ( $n$ ) de la daunorrubicina, la doxorubicina, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 con respecto a ADN de timo bovino (ADN de TB). Los valores entre paréntesis indican el error estándar de los valores medios (EEM) ( $n = 3$ ). <sup>a</sup> =  $p < 0,05$  frente a la daunorrubicina. <sup>b</sup> =  $p < 0,05$  frente al Compuesto 2. Las diferencias entre los valores medios se analizaron mediante un análisis de varianza de un factor seguido por el análisis de Student-Newman-Keuls.

#### 45 Valores de la bibliografía

Daunorrubicina :  $K_i: 0,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \pm 0,07$  ;  $n = 3,5$  pares de bases  $\pm 0,35$  (Chaires, *et al.* (1982) *Biochemistry* 21, 3933-3940). Doxorubicina:  $K_i: 3,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ;  $n = 3,8$  pares de bases (Messori *et al.* (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1815-1825).

**Tabla 1:** Constantes de unión y parámetros de exclusión de la doxorubicina, la daunorrubicina, el Compuesto 1 y el Compuesto 2.

<i>Fármaco</i>	$K_i$ ( $K_i \times 10^6 M^{-1}$ )	$n$ ( <i>pares de bases</i> )
Daunorrubicina	0,7	3,6
	(0,05)	(0,17)
Doxorrubicina	3,2 <sup>a</sup>	3,9
	(0,64)	(0,23)
Compuesto 1	3,3 <sup>a</sup>	3,4
	(0,11)	(0,21)
Compuesto 2	3,0 <sup>a</sup>	3,7
	(0,65)	(0,31)

*Resultados y descripción*

- 5 La similitud de las constantes de unión al ADN de CT y de los parámetros de exclusión del Compuesto 1 y del Compuesto 2 con los de la doxorubicina confirma que la derivación de la daunorrubicina no provocó una pérdida de las propiedades de unión con el ADN (Tabla 1). Por el contrario, las constantes de unión del Compuesto 1 y del Compuesto 2 fueron mayores que las del compuesto precursor, la daunorrubicina.

**Ejemplo 3. Toxicidad**

- 10 *Curvas de crecimiento.* Se disolvieron Compuesto 1-<sup>125</sup>I, Compuesto 1, doxorubicina o daunorrubicina en medio de cultivo a una concentración de 0,5 ng/ml. La actividad específica del Compuesto 1-<sup>125</sup>I fue de 100 kBq/ng. Se incubaron células SKBR-3 con fármaco en placas de plástico de Petri de 60 mm por triplicado durante 2,5 h. Se incubaron las células control con medio de cultivo común. Tras la incubación, se retiró el medio de todas las placas y se lavaron las células seis veces con medio libre de suero. Se separaron las células de las placas añadiendo 0,5 ml de tripsina/EDTA durante 10 min a una temperatura de 37°C. Tras volver a suspenderlas en 1 ml de medio de cultivo, se contaron las células usando un contador Coulter (Z2 Coulter Counter, Beckman Coulter) y se subcultivaron hasta obtener 10<sup>5</sup> células para generar las curvas de crecimiento. Se corrigió la pérdida de células producida en cada subcultivo de las curvas de crecimiento.

*Resultados y descripción*

- 20 Las curvas de crecimiento de las monocapas de células SKBR-3 cultivadas revelaron que el efecto citotóxico del Compuesto 1-<sup>125</sup>I a una concentración tan reducida como la de 0,5 ng/ml fue mayor en varios órdenes de magnitud que el posterior a la incubación con Compuesto 1, doxorubicina o daunorrubicina (Figura 6). Ninguno de estos compuestos tuvo un efecto citotóxico relevante. Por consiguiente, el efecto citotóxico mostrado por el Compuesto 1-<sup>125</sup>I está únicamente provocado por el nucleído <sup>125</sup>I unido al Compuesto 1.

**Referencias**

- 25 [1] B.A. Chabner, C.E. Meyers (1982) en "Cancer: Principles and practice of oncology" (DeVita Jr. V.T., S. Hellman y S.A. Rosenberg, eds.), pp. 156-197, J. B. Lippincott Company, Filadelfia, Toronto.
- [2] H.G. Keizer, H.M. Pinedo, G.J. Schuurhuis, H. Joenje, "Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radicaldependent mechanisms of cytotoxicity, *Pharmaceutics and Therapeutics*" 47 (1990) 219-231.
- 30 [3] J. Bouma, J.H. Beijnen, A. Bult, W.J.M. Underberg, "Anthracycline antitumour agents", *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 8 (1986) 109-133.
- [4] C.P. Association, "Compendium of pharmaceuticals and specialities", Vol. 13, CK Productions, Toronto, 1995.
- [5] R.H. Blum, S.K. Carter, "Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity", *Ann Intern Med* 80 (1974) 249-59.

[6] M.N. Gaze, "The current status of targeted radiotherapy in clinical practice", *Phys Med Biol* 41 (1996) 1895–903.

[7] J.A. O'Donoghue, T.E. Wheldon, "Targeted radiotherapy using auger electron emitters", *Phys Med Biol* 41 (1996) 1973–92.

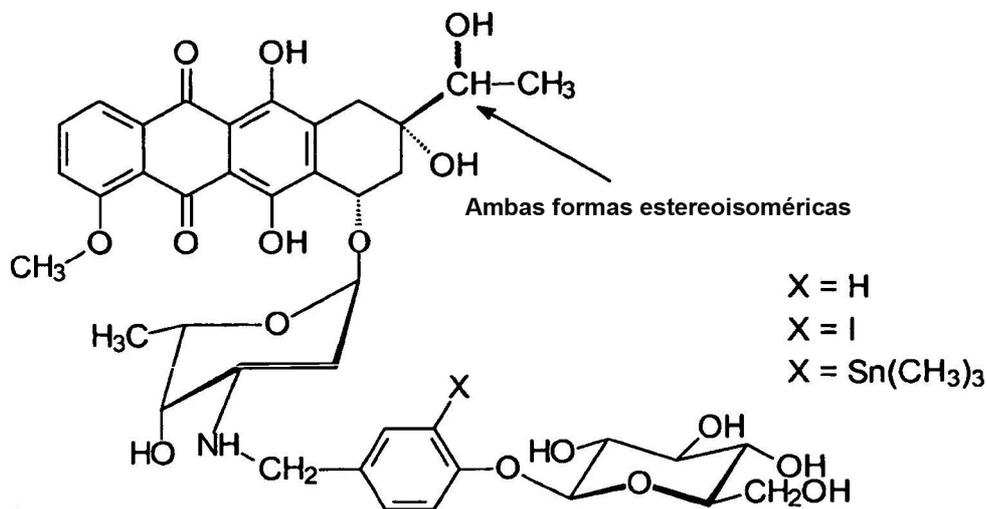
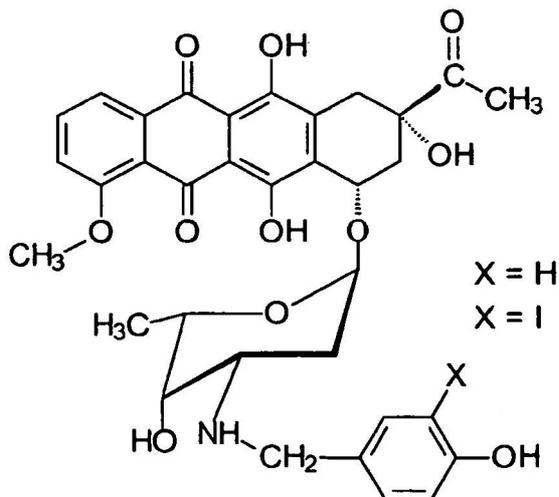
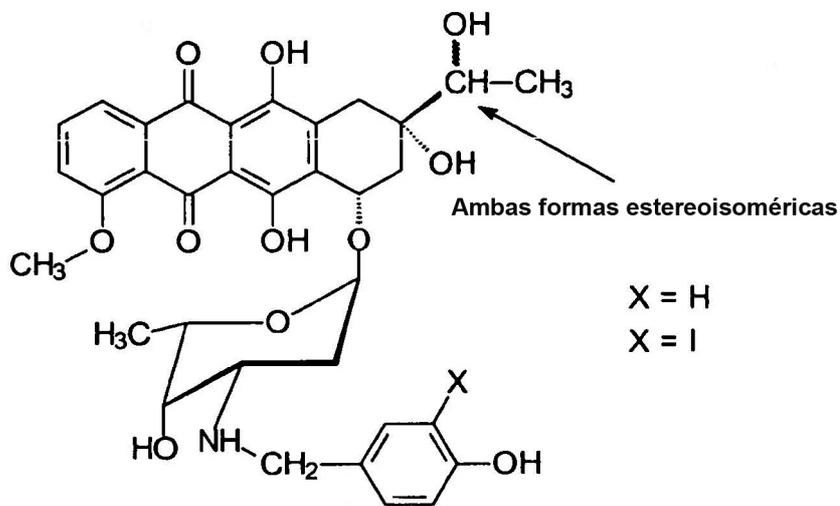
5 [8] S. Kim, "Liposomes as carriers of cancer chemotherapy. Current status and future prospects", *Drugs* 46 (1993) 618–38.

[9] (M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb y P.R. Cullis (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812: 55–65).

REIVINDICACIONES

1.- Un derivado de antraciclina seleccionado entre los siguientes derivados:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60





- 2.– Un fármaco radioterapéutico que comprende el derivado de antraciclina definido en la reivindicación 1, en el que el derivado de antraciclina comprende un nucleido radiactivo o un nucleido estable que puede ser activado por una radiación externa con neutrones o fotones.
- 5 3.– El fármaco radioterapéutico según la reivindicación 2, en el que el nucleido radiactivo se selecciona del grupo que consiste en  $^{123-125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{76-77}\text{Br}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  y  $^{189}\text{Re}$ , y el nucleido estable se selecciona del grupo que consiste en  $^{10}\text{B}$  y  $^{157}\text{Gd}$ .
- 4.– Uso del fármaco radioterapéutico según la reivindicación 2 ó 3 como un agente de generación de imágenes para los diagnósticos del cáncer.
- 10 5.– El derivado de antraciclina según la reivindicación 1 o el fármaco radioterapéutico según la reivindicación 2 ó 3 para su uso como un agente de dirección hacia el ADN en la terapia contra el cáncer.
- 6.– Un sistema de administración de fármacos que comprende un agente de interacción con el ADN, siendo dicho agente de interacción con el ADN el derivado de antraciclina según la reivindicación 1 o el fármaco radioterapéutico según la reivindicación 2 ó 3.
- 15 7.– El sistema de administración de fármacos según la reivindicación 6, en el que dicho sistema de administración de fármacos comprende un vehículo capaz de encerrar o unirse a agentes farmacéuticamente activos que incluyen dicho agente de interacción con el ADN.
- 8.– El sistema de administración de fármacos según la reivindicación 7, en el que dicho vehículo es un vehículo lipídico, un vehículo polimérico o una partícula compuesta lipídica y polimérica.
- 20 9.– El sistema de administración de fármacos según la reivindicación 8, en el que dicho vehículo lipídico es un liposoma.
- 10.– El sistema de administración de fármacos según la reivindicación 8, en el que dicho vehículo polimérico es un microgel.
- 11.– El sistema de administración de fármacos según cualquiera de las reivindicaciones 6–10, en el que el sistema de administración de fármacos incluye una dirección de dos etapas que comprende:
- 25 (a) agentes de dirección hacia células proporcionados en el vehículo para dirigirlos hacia células o tejido específicos y
- (b) un agente de dirección hacia el ADN (los agentes de interacción con el ADN) proporcionado dentro del o unido al vehículo para dirigir el nucleido radiactivo hacia el núcleo celular.
- 12.– Sistema de administración de fármacos según la reivindicación 11, en el que el agente de dirección hacia las células tiene la propiedad de unirse selectivamente y con una alta afinidad a células o tejido tumorales.
- 30 13.– Sistema de administración de fármacos según la reivindicación 11, en el que el agente de dirección hacia las células es un ligando.
- 14.– Sistema de administración de fármacos según la reivindicación 11, en el que el agente de dirección hacia las células comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un factor de crecimiento epidérmico o una molécula que se une a un receptor del EGF mutado con especificidad tumoral.

35

Figura 1

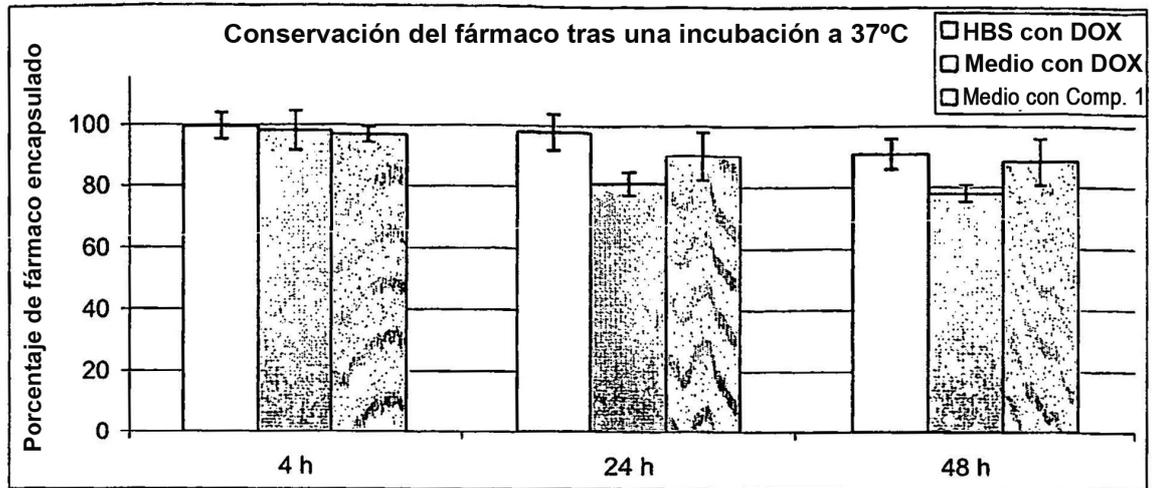


Figura 2

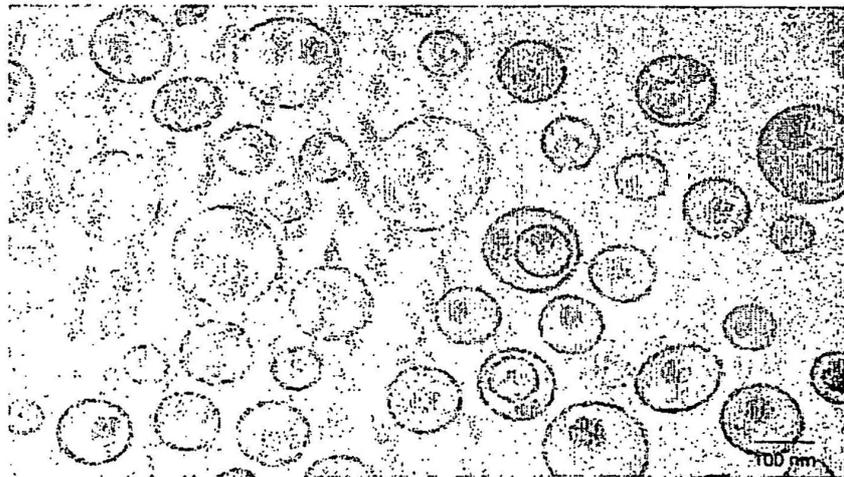


Figura 3

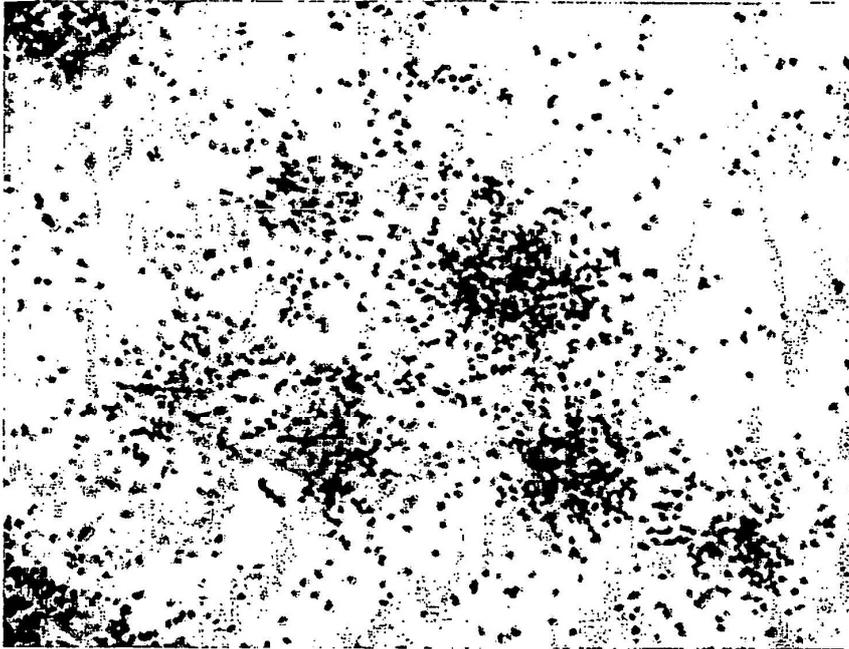


Figura 4

Unión al ADN del Compuesto 1-<sup>125</sup>I

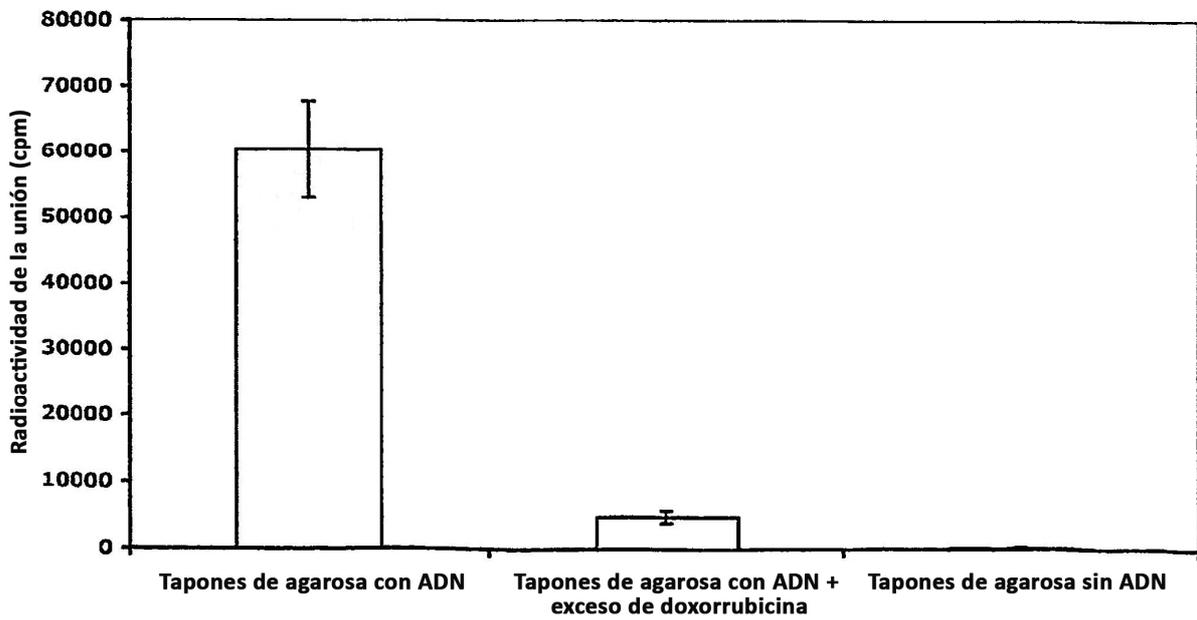


Figura 5

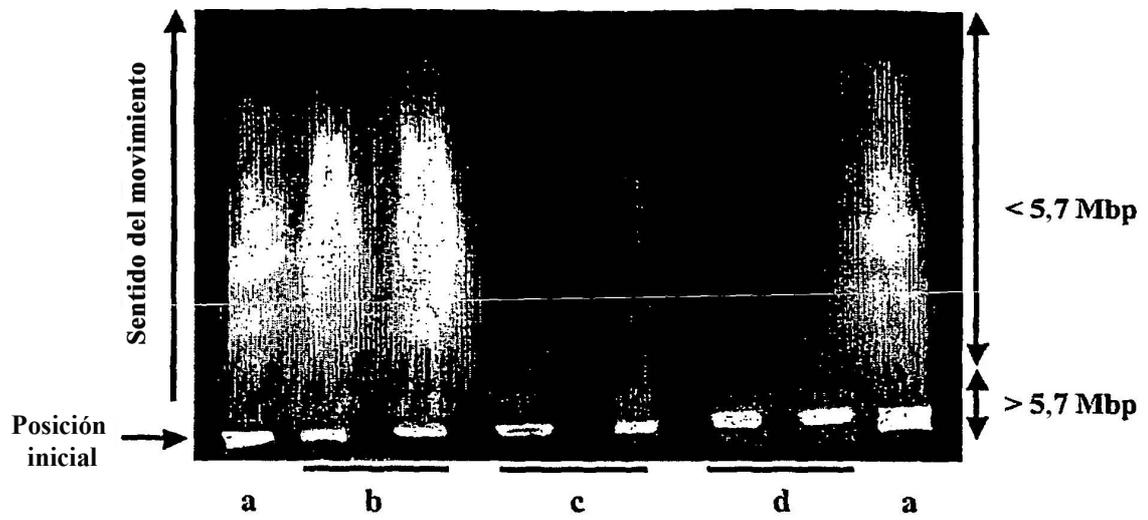


Figura 6

