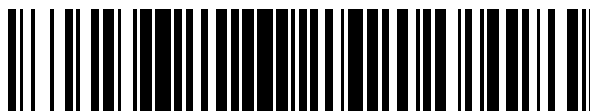


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 002**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03757380 .5**
96 Fecha de presentación: **06.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1531851**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Conjugados covalentes entre los endoperóxidos relacionados con la artemisinina y las proteínas transportadoras de hierro y procedimientos de utilización**

30 Prioridad:
06.06.2002 US 386928 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF WASHINGTON
OFFICE OF TECHNOLOGY LICENSING, 4311
11TH AVENUE NE, SUITE 500, BOX 354990
SEATTLE, WA 98105-4608, US**

72 Inventor/es:
**LAI, Henry, C.;
SASAKI, Tomikazu y
SINGH, Narendra, P.**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 377 002 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

Conjugados covalentes entre los endoperóxidos relacionados con la artemisinina y las proteínas transportadoras de hierro y procedimientos de utilización.

5

Campo de la invención

La invención se refiere a conjugados covalentes entre endoperóxidos relacionados con la artemisinina y proteínas transportadoras de hierro según las reivindicaciones para la utilización en un procedimiento de tratamiento del cáncer y las infecciones causadas por patógenos que se unen a proteínas transportadoras de hierro.

10

Antecedentes de la invención

La artemisinina es una lactona sesquiterpénica aislada de la planta *Artemisia annua* L, cuyos extractos se han utilizado para tratar el paludismo durante por lo menos 1.600 años. La molécula de artemisinina contiene un puente endoperóxido que reacciona con un átomo de hierro para formar radicales libres. La acción contra el paludismo de la artemisinina se debe a su reacción con hemo intraparasitario para generar radicales libres, causando la muerte celular. Las células cancerosas presentan una entrada significativamente mayor de hierro que las células normales. Por consiguiente, se ha demostrado que la artemisinina y los análogos de artemisinina son citotóxicos contra los tumores y las estirpes de células tumorales demostradas (véase, p. ej., Woerdenbag *et al.* (1993) *J. Nat. Prod.* 56(6):849-56; Lai y Singh (1995) *Cancer Lett.* 91:41-6; Efferth *et al.* (2001) *Int. J. Oncol.* 18:767-73; Li *et al.* (2011) *Bioorg. Mend. Chem. Lett.* 11:5-8; Singh y Lai (2001) *Life Sci.* 70:49-56; Efferth *et al.* (2002) *Biochem. Pharmacol.* 64:617-23; Efferth *et al.* (2002) *Blood Cells. Molecules & Diseases* 28(2): 160-8; Sadava *et al.* (2002) *Cancer Lett.* 179:151-6).

15

20

25

Se han descrito muchos análogos de artemisinina y de otros compuestos que contienen un puente endoperóxido que son biológicamente activos (véase, p. ej., la patente US nº 5.180.840; la patente US nº 5.216.175; la patente US nº 5.225.427; Cumming *et al.* (1998) *J. Med Chem* 41(6):952-64; Posner *et al.* (1999) *J. Med Chem* 42:300-4; Li *et al.* (2001) *Bioorg. Med Chem Lett.* 11:5-8; Wu *et al.* (2001) *Eur. J. Med Chem* 36:469-79; Posner *et al.* (2003) *J. Med Chem* 46:1060-5). Los análogos de artemisinina que se han utilizado en el tratamiento del paludismo incluyen la dihidroartemisinina, arteméter, artesunato, arteéter, carbonato de propil-dihidroartemisinina y ácido artelinico.

30

35

40

La artemisinina es un medicamento relativamente seguro con pocos y menores efectos secundarios incluso a dosis elevadas. Se han utilizado dosis orales de 70 mg/kg/día durante 6 días en seres humanos para el tratamiento del paludismo. No se apreciaron efectos secundarios desfavorables aparentes después del tratamiento de un paciente con cáncer con artesunato (dosis oral de 50 mg al día; dosis intramuscular de 60 mg/día, durante un período de 9 meses) (Singh y Verma (2002) *Arch. Oncol.* 10(4):279-80). La artemisinina y los análogos de artemisinina se han utilizado también en el tratamiento de enfermedades de la piel tales como la psoriasis, enfermedades de formación de ampollas en la piel, verrugas víricas, *molluscum* contagioso y hemorroides (véase, p. ej., la patente US nº 4.978.676; la patente US nº 5.219.880). La artemisinina y los análogos de artemisinina se han utilizado también para la profilaxis del paludismo.

45

Se ha demostrado que la administración de sales de hierro o la proteína holotransferrina transportadora de hierro aumenta la sensibilidad de las células de cáncer y los tumores implantados a la artemisinina y sus análogos (Lai y Singh (1995) *Cancer Lett.* 91:41-46; Moore *et al.* (1995) *Cancer Lett.* 98:83-7; Singh y Lai (2001) *Life Sci.* 70:49-56; Sadava *et al.* (2002) *Cancer Lett.* 1179:151-6).

50

55

Se ha demostrado también que determinados patógenos obtienen hierro uniéndose a las proteínas del hospedador transportadoras de hierro. Por ejemplo, *Neisseria meningitidis*, agente etiológico de la meningitis bacteriana, expresa los receptores de la superficie de las células para los compuestos transportadores de hierro tales como transferrina y lactoferrina (Evans y Oakhill (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):705-7). Actualmente, no existe ninguna vacuna disponible para la cepa de *N. meningitidis*, la cepa más corriente en el mundo occidental. Además, se ha demostrado que *Helicobacter pylori*, agente etiológico de la gastritis, de las úlceras gástricas y del duodeno, y del adenocarcinoma en seres humanos, obtiene hierro uniéndose a la lactoferrina humana (Husson *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61(6):2694-7).

El documento WO 02/091992 da a conocer conjugados de transferrina o de transcobalamina con fármacos antiprotozoarios útiles en el tratamiento de infecciones por protozoos.

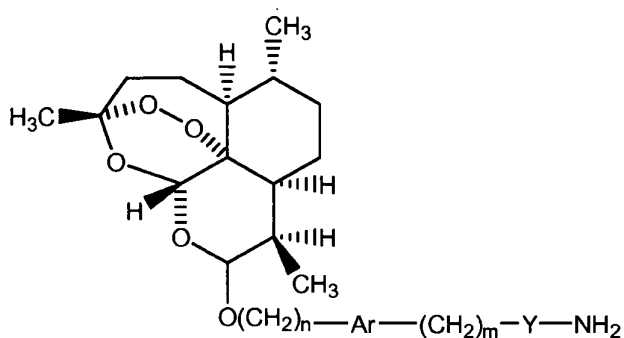
60

Resultan necesarias composiciones de artemisinina con mayor eficacia para el tratamiento del cáncer y de las enfermedades producidas por patógenos que se unen a las proteínas del hospedador transportadoras de hierro. Resultan necesarios procedimientos para el tratamiento del cáncer y de las enfermedades producidas por patógenos que obtienen hierro interiorizando las proteínas del hospedador transportadoras de hierro. La presente invención estudia estas necesidades.

Sumario de la invención

En la presente memoria se describen nuevos compuestos y composiciones que comprenden conjugados covalentes entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro.

La invención proporciona un conjugado covalente constituido por un endoperóxido relacionado con la artemisinina seleccionado de entre el grupo constituido por lactonas sesquiterpénicas y alcoholes, carbonatos, ésteres, éteres y sulfonatos de las mismas, artefleno, 1,2,4-trioxanos, y 1,2,4,5-tetraoxanos conjugados por enlace covalente con una proteína transportadora de hierro seleccionada de entre el grupo constituido por transferrina, holotransferrina, lactoferrina, hololactoferrina, hemoglobina, hemopexina, y lipocalina asociada a gelatinasa neutra, en las que la proteína transportadora de hierro libera el hierro que reacciona con un puente endoperóxido para formar radicales libres. El endoperóxido relacionado con la artemisinina puede estar unido al compuesto transportador de hierro por un resto de hidrazida, un resto de hidrazina o un resto aminoxi. El endoperóxido relacionado con la artemisinina puede presentar la estructura:



en la que $n = 1-3$, $m = 0-3$, $Ar =$ arilo e $Y = -(C=O)NH-$ u $-O-$. Los endoperóxidos representativos relacionados con artemisinina presentes en los conjugados covalentes de la invención incluyen el artelinato y la dihidroartemisinina.

Las proteínas representativas transportadoras de hierro incluyen la familia transferrina de proteínas, lipocalina asociada a gelatinasa neutra (LAGN) y hemoproteínas. Por lo tanto, los conjugados covalentes de la invención pueden contener, por ejemplo, conjugados de artelinato y holotransferrina, artelinato y hololactoferrina, o artelinato y hemoglobina. La invención proporciona además composiciones que comprenden los conjugados covalentes de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Los conjugados covalentes de la invención pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer e infecciones por patógenos que unen proteínas transportadoras de hierro.

En la presente memoria se describen los conjugados covalentes de la invención para administración a un paciente que lo necesita. Los conjugados covalentes ejemplificativos para su administración incluyen, por ejemplo, conjugados covalentes entre artelinato y holotransferrina, entre artelinato y hololactoferrina y entre artelinato y hemoglobina.

La invención proporciona conjugados y composiciones covalentes para su utilización en el tratamiento del cáncer, administrando a un ser humano o animal que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que comprende un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro según las reivindicaciones, a un paciente que lo necesita. Los conjugados covalentes pueden administrarse por vía tópica, generalmente, o pueden inyectarse directamente en un tumor. Los conjugados covalentes pueden administrarse solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, los conjugados covalentes pueden administrarse con un agente que aumenta el transporte de hierro en las células, por ejemplo aumentando el número de receptores de la superficie celular para las proteínas transportadoras de hierro en el conjugado.

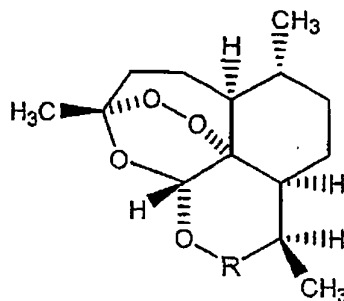
La invención proporciona también composiciones covalentes para su utilización en el tratamiento de infecciones por patógenos que se unen a proteínas transportadoras de hierro, administrando a un paciente humano o animal que lo necesita una cantidad eficaz que comprende un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro según las reivindicaciones. El patógeno puede comprender *Helicobacter pylori*, en el que la proteína portadora de hierro comprende lactoferrina humana, y en el que el endoperóxido relacionado con la artemisinina se selecciona de entre el grupo constituido por artelinato y dihidroartemisinina. El patógeno puede contener *Neisseria meningitidis*, en el que la proteína transportadora de hierro comprende transferrina humana y en el que el endoperóxido relacionado con la artemisinina se selecciona de entre el grupo constituido por artelinato y dihidroartemisinina.

Los conjugados/composiciones covalentes pueden utilizarse en el tratamiento de infecciones por *H. pylori* administrando a un paciente humano o animal que lo necesita una cantidad eficaz de una composición que

comprende un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro según las reivindicaciones.

Descripción detallada de la forma de realización preferida

- 5 La invención proporciona composiciones que comprenden conjugados covalentes entre endoperóxido relacionado con la artemisinina y proteínas transportadoras de hierro como se describe en la reivindicación 1. Como se utiliza en la presente memoria la expresión, "conjugado covalente", se refiere a un compuesto en el que un endoperóxido relacionado con la artemisinina está unido por enlace covalente a una proteína transportadora de hierro. La expresión "endoperóxido relacionado con la artemisinina" se refiere a un compuesto que presente un puente endoperóxido, que reacciona con un átomo de hierro para formar radicales libres, originando la muerte celular. Los compuestos endoperóxido relacionados con artemisinina pueden formar también radicales libres en presencia de cobre y manganeso.
- 10 El endoperóxido relacionado con la artemisinina del conjugado covalente de la presente invención se selecciona de entre el grupo constituido por lactonas sesquiterpénicas y alcoholes, carbonatos, ésteres, éteres y sulfonatos de las mismas, artefleno, 1,2,4-trioxanos y 1,2,4,5-tetraoxanos. El endoperóxido relacionado con la artemisinina puede presentar la estructura:



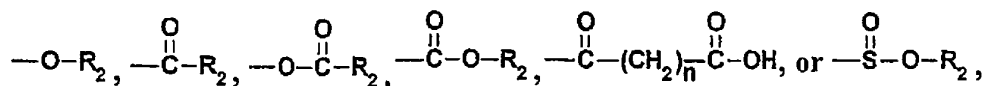
en la que R es



o

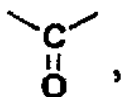


en la que R₁ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo o tiene la fórmula:



en las que R₂ es alquilo o arilo y n es 1 a 6, y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" significa alquilo inferior de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo de la invención pueden ser grupos de cadena lineal o de cadena ramificada. El término "arilo" se refiere a grupos aromáticos monocíclicos y policíclicos que contienen de 4 a 14 átomos de carbono o heteroátomos en el eje central, e incluye tanto grupos arilo carbocíclicos como grupos arilo heterocíclicos. Los grupos arilo carbocíclicos son grupos arilo en los que todos los átomos del anillo son carbono. Los grupos arilo heterocíclicos presentan de 1 a 4 heteroátomos como átomos del anillo siendo carbono el resto de los átomos. Los grupos arilo representativos incluyen, por ejemplo, fenilo y bencilo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, preferentemente sodio o potasio.

Por ejemplo, endoperóxido relacionado con la artemisinina incluyen artemisinina, en la que R es



5 dihidroartemisinina ($R_1 = \text{OH}$), ácido artesúnic ($R_1 = -\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$), y artesunato, arteméter ($R_1 = -\text{OCH}_3$), y arteéter ($R_1 = -\text{OC}_2\text{H}_5$). Otros compuestos de endoperóxido representativos de la invención pueden incluir ácido artelínico, carbonato de propil-dihidroartemisinina, artefleno (Ro. 42-1611) y sus análogos. (Birgen *et al.* (1994) *Sixth Int. Cong. Infect. Dis. Abst.* 427, pág. 152, Praga), 1,2,4-trioxanos (Peters *et al.* (1993) *Ann. Trop. Med. Parasit.* 87 (1):9-16 y 1,2,4,5-tetraoxanos (Vennerstrometal. (1992) *J. Med. Chem.* 35(16):3023-3027). Otros análogos estructurales adecuados de artemisinina se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 5.216.175 y 5.180.840; Cumming *et al.* (1998) *J. Med. Chem.* 41(6):952-64; y las solicitudes de patente PCT WO 97/01548, WO 99/33461 y WO 00/42046.

15 La fuente de endoperóxidos relacionados con la artemisinina puede ser natural (p. ej., aislada de plantas), sintética o semisintética. Por ejemplo, los agentes que general radicales libres pueden producirse expresando las enzimas para las rutas sintéticas relevantes en un hospedador microbiano (véase, p. ej., Martin *et al.* (2003) *Nature Biotechnol.*, publicada en Internet: 1 de Junio de 2003, doi:10.1038/nbt833).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína transportadora de hierro" se refiere a una proteína que es adecuada para transportar hierro a una célula o dentro de ella. La proteína transportadora de hierro en los conjugados covalentes de la invención puede ser una proteína de mamífero, tal como una proteína humana. Los ejemplos de proteínas transportadoras de hierro incluyen la familia transferrina de proteínas, la lipocalina asociada a gelatinasa neutra (NGAL) y las hemoproteínas. El hierro desempeña una función vital en el crecimiento células. La familia transferrina de proteínas incluye transferrina, lactoferrina, homotransferrina y melanotransferrina (Aisen y Harris (1989) en *Iron Carriers and Iron Proteins* (ed. Oler, VHC, Nueva York) páginas 273-320; Baker (1994) *Adv. Inor. Chem.* 41:389-463). Todas estas proteínas son glucoproteínas monocatenarias relacionadas estructuralmente que contienen 670 a 690 aminoácidos. La transferrina transporta hierro y hemo de la circulación al interior de las células. La forma de transferrina cargada con hierro (holotransferrina) se une a los receptores de transferrina en la superficie de la célula y se introduce en la célula por endocitosis mediada por el receptor, donde se libera el hierro. La lactoferrina ejerce una función clave en la absorción del hierro en la leche humana. Otra función de la lactoferrina es secuestrar el hierro de los agentes infecciosos. La lactoferrina, a diferencia de la transferrina, se une de manera estable al hierro a pH bajo y se absorbe en el intestino.

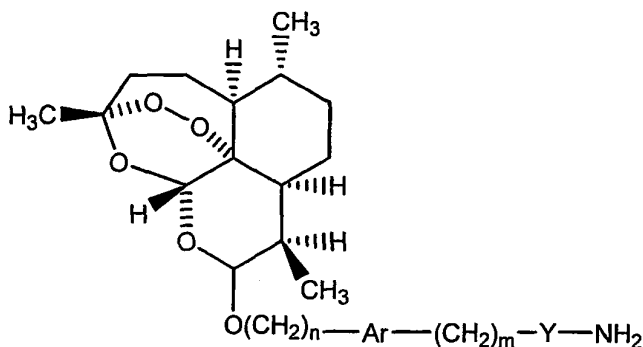
30 La NGAL es una proteína transportadora de hierro que no está relacionada con la familia transferrina y está destinada a liberar el hierro en las células epiteliales diferenciadas (Kaplan (2002) *Cell* 111:603-6). Las hemoproteínas son proteínas tales como la hemoglobina, mioglobina, hemopexina, citocromos, catalasas y peroxidasas transportadoras de hemo como grupo prostético. Por ejemplo, la hemopexina es una glucoproteína del suero de 60 kDa que secuestra hemo con muy alta afinidad en el torrente sanguíneo y lo transporta al hígado (Baker *et al.* (2003) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 100(7):3579-83).

40 En los conjugados covalentes de la invención, los endoperóxidos relacionados con la artemisinina están unidos a la proteína transportadora de hierro de alguna manera que conserva tanto la actividad de la proteína transportadora de hierro como la actividad del endoperóxido relacionado con la artemisinina. Por ejemplo, el endoperóxido relacionado con la artemisinina puede estar unido a una proteína glucosilada transportadora de hierro preparando en primer lugar un derivado de hidrazida del endoperóxido relacionado con la artemisinina, que se une a continuación a uno más grupos polisacárido oxidados en la proteína transportadora de hierro, como se describe en el ejemplo 1. Para preparar el derivado de hidrazida del endoperóxido relacionado con la artemisinina, puede formarse en primer lugar un éster del endoperóxido relacionado con la artemisinina añadiendo 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) al endoperóxido relacionado con la artemisinina, seguido de la adición de etil-dimetiletildicarbodimida. El éster HOBt puede hacerse reaccionar a continuación con hidrazina para formar el derivado hidrazida. El derivado hidrazida puede unirse a continuación por enlace covalente a una proteína transportadora de hierro, en la que los grupos polisacárido se han oxidado con agente oxidante tal como peryodato sódico. Puede utilizarse cualquier endoperóxido relacionado con la artemisinina con un grupo $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ para preparar un derivado de hidrazida que puede unirse a transferrina o a otras glucoproteínas transportadoras de hierro (véase, p. ej., Cumming *et al.* (1998) *J. Med. Chem.* 41(6):952-64).

55 El endoperóxido relacionado con la artemisinina puede unirse también a la proteína glucosilada transportadora de hierro preparando en primer lugar un derivado de hidrazina o aminoxi del endoperóxido relacionado con la artemisinina. Para preparar el derivado de hidrazina o de aminoxi del endoperóxido relacionado con la artemisinina, puede formarse en primer lugar un haluro del endoperóxido relacionado con la artemisinina añadiendo un haloalcohol al endoperóxido relacionado con la artemisinina, seguido de la adición de trifluoruroterato de boro. El haluro o el endoperóxido relacionado con la artemisinina puede reaccionar a continuación con hidrazina o hidroxilamina para formar el derivado de hidrazina o aminoxi, respectivamente. Para la reacción el grupo haluro puede sustituirse por el grupo p-toluensulfonilo o metansulfonilo. El derivado de hidrazina o de aminoxi puede unirse a continuación por enlace covalente a una proteína transportadora de hierro, en la que los grupos polisacárido han

sido oxidadas por un agente oxidante tal como el peryodato sódico. Cualquier endoperóxido relacionado con la artemisinina con un grupo (C=O)NH-, un grupo NH- o un grupo O- puede utilizarse para preparar ya sea un derivado de hidrazina o un derivado aminoxi que puede unirse a la transferrina o a otras glucoproteínas transportadoras de hierro.

Los endoperóxidos relacionados con la artemisinina que son adecuados para unirse de esta manera incluyen compuestos a partir de los cuales puede prepararse un derivado de hidrazida, hidrazina, o aminoxi sin destruir la actividad del puente endoperóxido. Generalmente, el grupo hidrazida, hidrazina o aminoxi está separado del puente endoperóxido por un espaciador, tal como una cadena de hidrocarburo. Pueden utilizarse también como espaciadores éteres, ésteres, amidas, sulfuros y disulfuros. Por ejemplo, un anillo bencénico puede separar el puente endoperóxido del grupo hidrazida, hidrazina o aminoxi, como en el artelinato. Por consiguiente, los endoperóxidos relacionados con la artemisinina adecuados para su utilización según la invención incluyen endoperóxidos de estructura:



en la que $n = 1$ a 3 , $n = 0$ a 3 , Ar = arilo, por ejemplo, fenilo, naftilo, pirenilo, piridilo o pirimidinilo, e Y = -(C=O)NH-, -NH-, u -O-. Los endoperóxidos representativos relacionados con artemisinina presentes en los conjugados covalentes de la invención incluyen el artelinato y la dihidroartemisinina.

Otros procedimientos para unir un endoperóxido relacionado con la artemisinina a una glucoproteína transportadora de hierro incluyen enlaces mediados por borato a restos carbohidrato en la glucoproteína transportadora de hierro (véase, p. ej., la patente de EE. UU. nº 5.919.708). Por lo tanto, los endoperóxidos relacionados con la artemisinina con un grupo borato reaccionarán con un resto 1,2-diol de los restos de carbohidrato en la superficie de la proteína.

Para las proteínas no glucosiladas transportadoras de hierro, los endoperóxidos relacionados con la artemisinina pueden estar unidos a la superficie de la proteína utilizando cadenas laterales de aminoácidos, como se describe en el ejemplo 2. Por ejemplo, tanto el artesunato como el artelinato tienen un grupo de ácido carboxílico libre que puede estar activado con N-hidroxi-succinimida (véase, p. ej., Lewis *et al.* (1994) *Bioconj. Chem.* 5(6):655-76) y un reactivo de carbodiimida soluble en agua tal como N-etenil-N'-dimetilaminoetilcarbodiimida para formar un éster activo. Este éster activo puede mezclarse con una solución acuosa de una proteína no glucosilada transportadora de hierro para unir el endoperóxido relacionado con la artemisinina a restos de Lys en la superficie de la proteína.

Los conjugados covalentes pueden purificarse utilizando procedimientos convencionales en esta materia, por ejemplo utilizando cromatografía con filtración en gel, intercambio iónico y cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en fase inversa o interacción hidrófoba. El número de moléculas de endoperóxido relacionado con la artemisinina unidas a una molécula de proteína transportadora de hierro puede determinarse utilizando procedimientos convencionales en la materia, por ejemplo, espectrometría de masas con atomización iónica. La relación de endoperóxido relacionado con la artemisinina a las proteínas transportadoras de hierro en los conjugados covalentes dependerá de la proteína transportadora de hierro que se esté utilizando y del procedimiento de formación del conjugado. Por ejemplo, los conjugados covalentes que contienen entre 1 y 10 moléculas del endoperóxido relacionado con la artemisinina por molécula de holotransferrina pueden obtenerse utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La invención proporciona también composiciones que comprenden los conjugados covalentes de la invención. En algunas formas de realización, las composiciones de la invención comprenden un conjugado covalente entre el artelinato y la holotransferrina humana, como se describe en el ejemplo 1. En otras formas de realización, las composiciones comprenden un conjugado covalente entre el artelinato y la hololactoferrina humana.

Los conjugados covalentes de la invención pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer. Debido a su rápida velocidad de división, la mayoría de las células cancerígenas tienen grandes tasas de ingesta de hierro y expresan concentraciones mayores de receptores de transferrina en la superficie celular que las células normales. Se ha demostrado que la administración de sales de hierro o de holotransferrina aumenta la sensibilidad de las células de cáncer a la artemisinina y sus análogos (Moore *et al.* (1995) *Cancer Lett.* 98:83-7; Singh y Lai (2001) *Life Sci.* 70:49-56; Sadava *et al.* (2002) *Cancer Lett.* 1179:151-6). Por lo tanto, la eficacia y selectividad de los endoperóxidos

relacionados con la artemisinina contra el cáncer aumentan uniendo con enlace covalente los endoperóxidos relacionados con la artemisinina a las proteínas transportadoras de hierro tal como la holotransferrina porque tanto el endoperóxido como el hierro son transportados a la misma célula o en su interior al mismo tiempo.

5 Los conjugados covalentes de la invención pueden utilizarse también en el tratamiento de infecciones por organismos patógenos que presentan receptores para la proteína transportadora de hierro en los conjugados covalentes. Para lograr crear una infección, un patógeno debe superar las limitaciones de hierro estrictas impuestas por el hospedador. Para superar estas limitaciones muchos patógenos obtienen hierro de las proteínas del hospedador transportadoras de hierro (véase, p. ej., Cornelissen, (2003) *Front Biosci.* 8:D836-47). Por ejemplo, 10 *Neisseria meningitidis*, agente etiológico de la meningitis bacteriana expresa receptores de la superficie celular para las proteínas transferrina y lactoferrina transportadoras de hierro (Evans y Oakhill (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):705-7), *Helicobacter pylori*, agente etiológico de la gastritis y de la enfermedad de la úlcera péptica en seres humanos, expresa un receptor para la lactoferrina humana (Husson *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61(6):2694-7) y *Staphylococcus aureus* expresa receptores para la hemoglobina (Mazmanian *et al.* (2003) *Science* 299:906-9). Por 15 lo tanto, los conjugados covalentes de la invención se utilizan para destruir organismos patógenos que presentan receptores para la proteína transportadora de hierro en el conjugado.

Por ejemplo, puede utilizarse un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y la transferrina humana o la holotransferrina humana para tratar la meningitis bacteriana originada por *N. meningitidis* o 20 la gastritis y la enfermedad de la úlcera péptica producida por *Helicobacter pylori*.

Los conjugados covalentes entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro según las reivindicaciones presentan actividades citotóxicas superiores cuando se administra a células cancerígenas en comparación con la administración por separado del endoperóxido relacionado con la artemisinina 25 y la proteína transportadora de hierro. Además, los conjugados covalentes de la invención son eficaces en la destrucción de patógenos con receptores para las proteínas transportadoras de hierro.

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteínas transportadoras de hierro según las reivindicaciones 30 para la administración a un paciente que lo necesita. Los conjugados covalentes entre los endoperóxidos relacionados con la artemisinina y las proteínas transportadoras de hierro son como se describieron anteriormente. Por ejemplo, algunas formas de realización proporcionan conjugados covalentes entre artelinato y holotransferrina, como se describe en el ejemplo 1.

35 Los procedimientos descritos en la presente memoria son aplicables a cualquier animal, tal como un paciente humano. Por ejemplo un paciente necesitado de composiciones que comprenden un conjugados covalentes entre endoperóxido relacionado con la artemisinina y la proteína transportadora de hierro puede ser un paciente con cáncer. Como se describió anteriormente, las células que proliferan rápidamente tales como las células de cáncer poseen generalmente las reacciones mayores de receptores de transferrina en la superficie celular. Los 40 procedimientos descritos proporcionan un mecanismo para administrar selectivamente tanto el resto de endoperóxido como hierro y reacciona con las células que proliferan rápidamente, tales como las células de cáncer. Por consiguiente, en la presente memoria se describen los compuestos según las reivindicaciones para su utilización en un procedimiento de tratamiento de cáncer administrando a un paciente humano o animal que lo necesita una cantidad eficaz de dicho compuesto. Otras enfermedades en las que existe hiperproliferación de células y en las que 45 pueden utilizarse los conjugados covalentes de la invención para tratar incluyen la restenosis, la enfermedad autoinmunitaria, la artritis, el rechazo del trasplante, la enfermedad inflamatoria del intestino o la proliferación producida después de procedimientos médicos. Los procedimientos descritos comprenden la administración de un compuesto que contiene un conjugado covalente entre el artelinato y la holotransferrina humana.

50 Los compuestos y composiciones que contienen un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y una proteína transportadora de hierro según las reivindicaciones pueden utilizarse también para tratar una infección por un patógeno que expresa los receptores de la superficie celular para las proteínas transportadoras de hierro en el conjugado covalente. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "tratamiento de una infección por un patógeno" se refiere a la inhibición del crecimiento del patógeno y/o la prevención o mejora de los 55 síntomas de la enfermedad asociada a la infección.

Los patógenos ejemplificativos con receptores para las proteínas del hospedador transportadoras de hierro se describieron anteriormente e incluyen *Neisseria meningitidis*, que expresa un receptor para transferrina humana y *H. pylori*, que expresa un receptor para lactoferrina humana. Se ha demostrado recientemente que *S. aureus* expresa un receptor para hemoglobina (Mazmanian *et al.* (2003) *Science* 299:906-9), y proteínas similares son también expresadas por *Listeria monocytogenes* y *Bacillus anthracis* (Cabanés *et al.* (2002) *Trends. Microbiol.* 10(5):238-45). Una lista ilustrativa de los patógenos que expresan receptores para las proteínas del hospedador transportadoras de 60 hierro se muestra en la tabla 1. Una vez la proteína transportadora de hierro se une al receptor expresado por el patógeno, el hierro o hemo se libera generalmente de la proteína transportadora de hierro y se transporta dentro de la células (véase, p. ej., Gray-Owens y Schryvers (1996) *Trends. Mibrobiol.* 4(5):185-91; Wandersman y Stojifjkovie (2000) *Curr. Op. Microbiol.* 3:215-20). 65

Tabla 1. Receptores para proteínas transportadoras de hierro en patógenos humanos y animales

Patógeno	Hospedador	Enfermedad	Receptor
<i>Moraxella bovis</i>	Bovino	Querato-conjuntivitis	Transferrina, lactoferrina ¹
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Humano	Otitis media	Transferrina, lactoferrina ¹
<i>Moraxella lacunata</i>	Humano	Querato-conjuntivitis	Transferrina, lactoferrina ¹
<i>Neisseria meningitidis</i>	Humano	Meningitis	Transferrina, lactoferrina, hemoglobina ^{1,19}
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Humano	Gonorrea	Transferrina, lactoferrina, hemoglobina ^{1,18}
<i>Actinobacillus actinomycetecomitans</i>	Humano	Periodontitis juvenil	Transferrina ¹
<i>Actinobacillus equuli</i>	Equino	Septicemia	Transferrina ¹
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Porcino	Neumonía	Transferrina ¹
<i>Haemophilus agnii</i>	Ovino	Septicemia	Transferrina ¹
<i>Haemophilus avium</i>	Aves de corral	Sinusitis	Transferrina ¹
<i>Haemophilus influenzae</i>	Humano	Meningitis, otitis media	Transferrina, hemoglobina ^{1,20}
<i>Haemophilus paragallinarum</i>	Aves de corral	Coriza infecciosa	Transferrina ¹
<i>Haemophilus somnus</i>	Bovino	Meningoencefalitis tromboembólica	Transferrina ¹
<i>Haemophilus paraseis</i>	Porcino	Enfermedad de Glasser	Transferrina ¹
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Humano	Enfermedad de úlcera genital	Hemoglobina ¹⁵
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Bovino, porcino, caprino	Fiebre del transporte, pasteurelosis	Transferrina ¹
<i>Pasteurella multocida</i>	Bovino	Neumonía, septicemia	Transferrina ¹
<i>Staphylococcus aureus</i>	Humano	Bacteremia, neumonía, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, abscesos profundos, envenenamiento por alimentos	Transferrina, hemoglobina ^{2,13}
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Humano	Endocarditis, endoftalmítis, septicemia, cistitis	Transferrina ²
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Humano	Neumonía, meningitis, bacteremia, otitis media	Lactoferrina ³
<i>Leishmania chagasi</i>	Humano	Leishmaniosis	Transferrina, lactoferrina ⁴
<i>Escherichia coli</i> K88	Porcino	Enteropatogenia	Transferrina ⁵
<i>Trichomonas foetus</i>	Vacuno	Tricomoniasis	Lactoferrina, hemoglobina ⁶
<i>Treponema pallidum</i>	Humano	Sífilis	Lactoferrina ⁷
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Humano	Neumonía	Lactoferrina ⁸
<i>Bordetella pertussis</i>	Humano	Tosferina	Lactoferrina ⁹
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Humano	Vaginositis	Lactoferrina ¹⁰
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peces	Forunculosis	Transferrina, lactoferrina ¹¹
<i>Helicobacter pylori</i>	Humano	Gastritis, úlcera gástrica y duodenal, adenocarcinoma gástrico, linfoma	Lactoferrina ¹²
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Humano	Enteritis	Hemoglobina, mioglobina, hemopexina, catalasa, albúmina-hemo ¹⁴
<i>Vibrio vulnificus</i>	Anguila	Envenenamiento por alimentos, septicemia, infecciones de heridas	Hemoglobina ¹⁶
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Humano	Periodontitis	Hemoglobina ¹⁷

1 Gray-Owen & Schryvers (1996) Trends Microbiol. 4(5):185-91

2 Modun et al. (1998) Infect. Immun. 66(8):3591-6

3 Hammerschmidt et al. (1999) Infect. Immun. 67(4):1683-7

4 Britigan et al. (1998) Adv. Exp. Med. Biol. 443: 135-40

5 Grange et al. (1997) Adv. Exp. Med Biol. 412:357-61

- 6 Tachezy et al. (1996) Exp. Parasitol. 83(2):216-28
- 7 Alderete et al. (1988) Genitourin. Med. 64(6):359-63
- 8 Tryon & Baseman (1987) Microb. Pathog. 3(6):437-43
- 9 Redhead et al. (1987) J. Gen. Microbiol. 133(4):891-8
- 10 Peterson & Alderete (1984) J. Exp. Med. 160(2):398-410
- 11 Chart & Trust (1983) J. Bacteriol. 156(2):758-64
- 12 Dhaenens et al. (1997) Infect. Immun. 65(2):514-8
- 13 Mazmanian et al. (2003) Science 299:906-9
- 14 Bracken et al. (1999) J. Bacteriol. 181(19):6063-72
- 15 Al-Twafiq et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(3):1049-54
- 16 Fouz et al. (1997) Microbiol. Lett. 156(2):187-91
- 17 Simpson et al. (2000) J. Bacteriol. 182(10): 5737-48
- 18 Chen et al. (1996) Infect. Immun. 64:5008-14
- 19 Stojiljkovic et al. (1996) J. Bacteriol. 179(15):4670-78
- 20 Frangipane et al. (1994) FEMS Microbiol. Lett. 118:243-8

5 Los procedimientos descritos en la presente memoria proporcionan un mecanismo para liberar de manera selectiva un resto endoperóxido y el hierro reacciona directamente con la membrana celular de un organismo patógeno mediante el enlace del conjugado covalente a un receptor para la proteína transportadora de hierro. Según los procedimientos descritos, el resto endoperóxido conjugado con enlace covalente reacciona con el hierro o el hemo liberado de la proteína transportadora de hierro, produciendo radicales libres dañinos en íntima proximidad con el patógeno. Por consiguiente, en la presente memoria se describen composiciones según las reivindicaciones para su utilización en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad producida por *Helicobacter pylori* administrando una cantidad eficaz de dicha composición que comprende un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y hololactoferrina humana a un paciente humano que lo necesita. Se describen también en la presente memoria composiciones según las reivindicaciones para su utilización en un procedimiento para tratar una enfermedad producida por *Neisseria meningitidis* administrando una cantidad eficaz de dicha composición que comprende un conjugado covalente entre un endoperóxido relacionado con la artemisinina y la holotransferrina humana a un paciente humano que lo necesita.

15 Pueden utilizarse otras infecciones ilustrativas además de una cantidad eficaz de una composición que comprende un conjugado covalente de la invención para tratar incluyen infecciones bacterianas tópicas, tales como gingivitis, infecciones de la piel y los ojos.

20 Las cantidades eficaces de los conjugados covalentes oscilarán generalmente hasta la dosis máxima tolerada, pero las concentraciones no son críticas y pueden variar ampliamente. Las cantidades exactas utilizadas por el médico oscilarán, desde luego, dependiendo del compuesto, la cantidad de administración, el estado físico del paciente y otros factores. Para su administración la dosis diaria puede administrarse en forma de una sola dosis o puede dividirse en varias dosis.

25 En los procedimientos descritos en la presente memoria, la cantidad de los conjugados de la invención administrados realmente serán una cantidad terapéuticamente eficaz, cuyo término se utiliza en la presente memoria para indicar la cantidad necesaria para producir un efecto beneficioso sustancial. Las dosis eficaces pueden extrapolarse en las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o del modelo animal. El modelo animal se utiliza también por lo general para determinar un intervalo de dosis deseable y la vía de administración. Dicha información puede utilizarse a continuación para determinar las dosis y vías útiles para la administración en seres humanos u otros mamíferos. La determinación de una dosis eficaz resultará evidente para los expertos en la materia. Por lo tanto, la cantidad administrada realmente dependerá del individuo al que se aplique el tratamiento, y preferentemente será una cantidad optimizada de modo que se consiga el efecto deseado sin efectos secundarios significativos.

35 La eficacia terapéutica y la posible toxicidad de los conjugados covalentes de la invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales, en cultivos celulares o animales experimentales (p. ej., DE₅₀, dosis terapéutica eficaz en el 50% de la población; y DL₅₀, dosis letal para el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y puede expresarse como relación DL₅₀ a DE₅₀.

40 Los conjugados covalentes que presentan índices terapéuticos grandes son particularmente adecuados en la puesta en práctica de los procedimientos descritos en la presente memoria. Los datos obtenidos de los ensayos obtenidos en cultivo celular y los ensayos en animales pueden utilizarse en la formulación de un intervalo de dosis para su utilización en personas u otros mamíferos. La dosis de dichos conjugados está comprendida preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis varía por lo general comprendida en este intervalo dependiendo de la formulación utilizada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. Por lo tanto, las cantidades óptimas variarán con el procedimiento de administración, y generalmente estarán de acuerdo con las cantidades de medicamentos convencionales administrados en la misma forma o similar.

Los conjugados covalentes de la invención pueden utilizarse para el tratamiento administrándose solos, o en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, pueden administrarse conjugados en combinación con agentes terapéuticos incluyendo inhibidores de andrógenos, tales como flutamida y luprolida; antiestrógenos, tal como tomoxifeno; antimetabolitos y agentes citotóxicos, tales como daunorrubicina, fluorouracilo, floxuridina, interferón alfa, metotrexato, plicamicina, mercaptopurina, tioguanina, adriamicina, carmustina, lomustina, citarabina, ciclofosfamida, doxorubicina, estramustina, altretamina, hidroxiaurea, ifosfamida, procarbazona, mutamicina, busulfán, mitoxantrona, carboplatino, cisplatino, estreptozocina, bleomicina, dactinomicina e idamizina; hormonas tales como medroxiprogesterona, estramustina, etinil estradiol, estradiol, leuprolida, megestol, octreotida, dietilestilbestrol, clorotrianiseno, etopósido, podofilotoxina y goserelina; derivados de mostaza nitrogenada, tales como melfalán, clorambucilo, metloreamina y tiotepa, esteroides tales como betametasona; y otros agentes antineoplásicos, tales como *Mycobacterium bovis* viva, dicarbazona, asparginasa, leucovorina, mitotano, vincristina, vinblastina, y taxotere. Las cantidades apropiadas en cada caso variarán con cada agente específico y se conocerán fácilmente ya sea por los expertos en la materia o serán fácilmente determinables por experimentación rutinaria.

Los conjugados covalentes de la invención pueden utilizarse también para el tratamiento administrándose en combinación con un agente que aumenta el transporte del hierro dentro de las células, por ejemplo, aumentando el número de receptores de la superficie celular para la proteína transportadora de hierro en el conjugado. Se ha demostrado por ejemplo, que la insulina, el factor de crecimiento I insulinoide y el factor de crecimiento epidérmico produce un aumento en el número de receptores de transferrina en la superficie de las células (véase, p. ej., Davis *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 261(19):8708-11; Davis *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 262(17):12126-34). Por consiguiente, en algunos casos, los conjugados covalentes de la invención que contienen transferrina se administran en combinación con insulina, factor de crecimiento I insulinoide o factor de crecimiento epidérmico.

La administración de conjugados covalentes de la invención se lleva a cabo por cualquier vía eficaz, p. ej., parenteral u oral. Los procedimientos de administración incluyen la administración tópica (p. e., parches cutáneos), por inhalación, bucal, intraarterial, subcutánea, intramedular, intravenosa, intranasal, intrarrectal o intraocular, y otros medios convencionales. Por ejemplo, los conjugados covalentes para su utilización en el tratamiento pueden inyectarse directamente en un tumor, en la proximidad de un tumor o dentro de un vaso sanguíneo que suministra sangre al tumor.

Los conjugados covalentes de la invención pueden formularse en una composición que comprende además portadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo excipientes y otros compuestos que facilitan la administración del conjugado covalente a un mamífero. Más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Maack Publishing Co., Easton PA).

Las composiciones para administración oral pueden formularse utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica, en dosis adecuadas para la administración oral. Dichos portadores vehículos permiten formular composiciones que contienen conjugados covalentes de la invención como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, etc., adecuados para la ingestión por un paciente. Las composiciones para su utilización por vía oral, pueden conjugarse, en combinación, con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y tratando la mezcla de gránulos, añadiendo después compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados incluyen cargas de carbohidratos o proteínas. Estas incluyen azúcares, que comprenden lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tales como metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, o carboximetil-celulosa sódica; y gomas incluyendo arábica y de tragacanto; así como proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregadores o disolventes, tales como povidona reticulada, agar-agar, ácido alginico o una de sus sales, tal como alginato sódico.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados tal como soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener también goma arábica, talco, povidona, carbopol gel, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir, la dosis).

Los conjugados covalentes para administración oral pueden conjugarse, por ejemplo, como cápsulas duras realizadas en gelatina, así como cápsulas selladas blandas realizadas en gelatina y un recubrimiento tal como de glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener conjugados covalentes mezclados con cargas o aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tal como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los conjugados covalentes pueden disolverse o ponerse en suspensión en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las composiciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de uno o más conjugados covalentes de la invención. Para inyectables, pueden formularse conjugados covalentes en soluciones acuosas, tales como en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o la

solución salina fisiológica tamponada. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil-celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Además, las suspensiones de los conjugados covalentes pueden prepararse como suspensiones inyectables aceitosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen ácidos grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Opcionalmente, la suspensión puede contener además estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la estabilidad del conjugado covalente para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Para la administración tópica o nasal, se utilizan por lo general en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera específica que debe penetrarse. Sus ejemplos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, sulfóxido de dimetilo y azona. Pueden estar incluidos además agentes adicionales para preparar la formulación cosméticamente aceptable. Sus ejemplos son grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes y agentes tensioactivos. Pueden incluirse también agentes queratolíticos tales como los conocidos en la materia. Son ejemplos el ácido salicílico y el azufre. La composición puede estar en forma de pomada para la administración tópica o de parche transdérmico para la administración general del compuesto y puede prepararse de manera convencional (véase, p. e., Barry. *Dermatological Formulations* (Drugs and the Pharmaceutical Sciences-Dekker); Harrys *Cosmeticology* (Leonard Hill Books).

Para la administración rectal las composiciones para su utilización en el tratamiento pueden administrarse en forma de supositorios o enemas de retención. Dichas composiciones pueden prepararse mezclando los conjugados covalentes con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a las temperaturas ordinarias y líquido a la temperatura rectal y por consiguiente se mezclará en el recto para liberar el fármaco. Los excipientes adecuados comprenden de manera no limitativa, manteca de caco y polietilenglicoles.

Las cantidades de cada uno de estos tipos de aditivos resultarán evidentes para los expertos en la materia, siendo la cantidades óptimas las mismas que en otras formulaciones conocidas, diseñadas para el mismo tipo de administración. Los potenciadores de penetración en la capa córnea, por ejemplo, por lo general se incluirán a concentraciones comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 15%.

Las composiciones que contienen los conjugados covalentes de la presente invención pueden prepararse de manera similar a la conocida en la técnica, (p. ej., mediante procesos de mezclado convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, oclusión o liofilización). Las composiciones pueden también modificarse para proporcionar características de liberación apropiadas, p. ej., liberación lenta o liberación dirigida, por medios convencionales, (p. ej., recubrimiento).

Pueden proporcionarse composiciones que contienen los conjugados covalentes en forma de sales y pueden formarse con muchos ácidos, incluyendo el ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico o succínico. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que son las correspondientes formas de base libre.

Una vez formuladas las composiciones para que contengan conjugados covalentes y se ha preparado un portador aceptable, pueden colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para su utilización.

45 **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe un procedimiento para preparar una composición representativa de la invención que contiene una o más moléculas de endoperóxido relacionadas con artemisinina unidas por enlace covalente a una molécula de holotransferrina.

Síntesis de hidrazida del ácido artelínico (ART-NH-NH₂): Se intentó preparar sin éxito un derivado de hidrazida de artesunato y provocó la formación de dihidroartemisinina debido a la reacción de ciclación. Se sintetizó artelinato a partir de dihidroartemisinina tal como se describió anteriormente (Shrimali *et al.* (1998) *Indian J. Chem.* 37B:1161-1163). El ácido artelínico (0,1 g, 0,24 mmoles) se disolvió en acetonitrilo anhidro (0,48 ml). A esta solución, se le añadió 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,038 g, 0,29 mmoles) seguido de la adición de etil-dimetiletildicarbodiimida (0,055 g, 0,29 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se hizo un seguimiento por cromatografía en capa fina (TLC) hasta que todo el ácido se convirtió en el éster HOBt.

Una solución de hidrazina (0,46 ml, 0,48 mmoles) en acetonitrilo (0,48 ml) se enfrió a 0°C, y la mezcla de reacción anterior se añadió a ésta manteniendo la temperatura entre 0 y 10°C. La reacción se terminó en 10 minutos, medida por TLC. La mezcla de reacción se vertió en agua (5 ml), se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml) y se lavó con salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de metanol/cloroforno, para dar el producto puro (0,078 g) con 76% de rendimiento.

Síntesis del conjugado artelinato-holotransferrina: Holotransferrina (2 mg), disuelta en 1 ml de 0,1 mol/l de acetato de

sodio pH 5,5, se oxidó a una concentración de sus glucanos, a temperatura ambiente durante 30 minutos con 10 mmoles/l de peryodato sódico. La solución se aplicó a una columna Sephadex G-25 corta equipada con un monitor de UV. La columna se eluyó con 0,1 moles/l de acetato sódico pH 5,5 y se recogieron las fracciones de proteína. Se añadió una solución de ART-NH-NH₂ en exceso a la holotransferrina oxidada, y la reacción se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente con agitación suave. La solución del conjugado artelinato-holotransferrina se aplicó a una columna Sephadex G-25 para eliminar a RT-NH-NH₂ en exceso. La columna se eluyó con 0,1 mol/l de tampón Tris-HCl, pH 7,5 y las fracciones proteicas se recogieron. Se almacenó el conjugado a 4°C.

El conjugado artelinato-holotransferrina se purificó por HPLC de interacción hidrófoba para obtener un conjugado de proteínas homogéneo. El número de moléculas de artelinato por molécula de holotransferrina se determinó por espectrometría de masas con atomización iónica.

Ejemplo 2

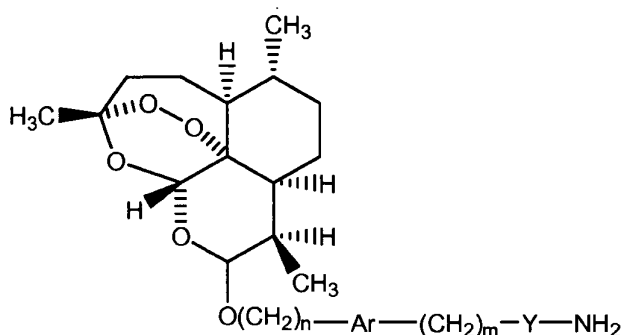
Este ejemplo describe un procedimiento para preparar una composición representativa de la invención que contiene una o más moléculas de endoperóxido relacionadas con artemisinina unidas por enlace covalente a una molécula de hemoglobina.

Para la modificación covalente de proteínas no glucosiladas tales como hemoglobina con derivados de artemisinina, los derivados del ácido carboxílico de artemisinina tales como el ácido artelínico se activan en primer lugar como éster de N-hidroxi-succinimida (HOSu) para reaccionar con restos de lisina en la superficie de la proteína. Se disuelve ácido artelínico (4,2 mg, 0,01 mmoles) en dimetilformamida (DMF) (0,5 ml) y la solución se enfría en baño con hielo. A esta solución, se le añaden N-etil-N'-dimetilaminoetil-carbodiimida (EDC) (1,5 mg, 0,01 mmoles) y HOSu (1,1 mg, 0,01 mmoles). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 2 horas a 0°C para completar la formación del éster HOSu del ácido artelínico.

Se disuelve hemoglobina (10 mg) en tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 (5 ml). La solución en DMF del éster HOSu del ácido artelínico se añade lentamente a 0°C a la solución de hemoglobina. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 2 horas a 0°C, y durante otras 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplica a continuación a la columna Sephadex G-25 que está equilibrada con tampón fosfato 0,1 M pH 7, y la columna se eluye con el mismo tampón. La hemoglobina modificada se eluye al volumen vacío. Las fracciones que contienen hemoglobina se combinan y a continuación se purifican por HPLC de interacción hidrófoba. El número de derivados de artemisinina acoplados a la proteína se determina por espectrometría de masas con atomización iónica.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado covalente constituido por un endoperóxido relacionado con la artemisinina seleccionado de entre el grupo constituido por lactonas sesquiterpénicas y alcoholes, carbonatos, ésteres, éteres y sulfonatos de los mismos, artefleno, 1,2,4-trioxanos, y 1,2,4,5-tetraoxanos conjugados por enlace covalente con una proteína transportadora de hierro seleccionada de entre el grupo constituido por transferrina, holotransferrina, lactoferrina, hololactoferrina, hemoglobina, hemopexina, y lipocalina asociada a la gelatinasa neutra, en el que la proteína transportadora de hierro libera el hierro que reacciona con un puente endoperóxido sobre el endoperóxido para formar radicales libres.
2. Conjugado covalente según la reivindicación 1, en el que la proteína transportadora de hierro es una proteína de mamífero.
3. Conjugado covalente según la reivindicación 2, en el que la proteína transportadora de hierro es una proteína humana.
4. Conjugado covalente según la reivindicación 1, en el que la proteína transportadora de hierro es la holotransferrina o la hololactoferrina.
5. Conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el endoperóxido comprende artelinato o es un derivado de hidrazida.
6. Conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el endoperóxido presenta la estructura:



- en la que $n = 1-3$, $m = 0-3$, Ar = arilo e Y = $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NH}-$ u $-\text{O}-$.

7. Conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el endoperóxido es el artelinato y la proteína transportadora de hierro es la holotransferrina, el endoperóxido es el artelinato y la proteína transportadora de hierro es la hololactoferrina o el endoperóxido es el artelinato y la proteína transportadora de hierro es la hemoglobina.
8. Composición que comprende un conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Conjugado covalente tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, en un humano, opcionalmente por administración parenteral.
10. Conjugado covalente para su utilización según la reivindicación 9, en el que el endoperóxido se selecciona de entre el grupo constituido por artelinato y dihidroartemisinina y/o en el que la proteína transportadora de hierro es la holotransferrina.
11. Conjugado covalente tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización en el tratamiento de una infección por un patógeno, en el que el patógeno expresa los receptores para la proteína transportadora de hierro.
12. Conjugado covalente para su utilización según la reivindicación 11, en el que el endoperóxido se selecciona de entre el grupo constituido por artelinato y dihidroartemisinina y/o en el que la proteína transportadora de hierro se selecciona de entre el grupo constituido por holotransferrina, hololactoferrina, hemoglobina, hemopexina, y lipocalina asociada a la gelatinasa neutra.
13. Conjugado covalente para su utilización según la reivindicación 11, en el que el patógeno comprende *Helicobacter pylori*, la proteína transportadora de hierro comprende lactoferrina humana, y el endoperóxido es

artelinato o dihidroartemisinina; o en el que el patógeno comprende *Neisseria meningitidis*, la proteína transportadora de hierro comprende transferrina humana, y el endoperóxido relacionado con la artemisinina es el artelinato o la dihidroartemisinina.

5 14. Conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su utilización como producto farmacéutico.

10 15. Conjugado covalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el endoperóxido es artemisinina, dihidroartemisinina, artelinato, ácido artesúnico, artesunato, arteméter, arteéter, ácido artelínico, carbonato de propil-dihidroartemisinina o artefleno.

16. Composición según la reivindicación 8, en la que el endoperóxido es artemisinina, dihidroartemisinina, artelinato, ácido artesúnico, artesunato, arteméter, arteéter, ácido artelínico, carbonato de propil-dihidroartemisinina o artefleno.