(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 380 620**

(51) Int. CI.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04751275 .1**
(96) Fecha de presentación: **29.04.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1617873**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

(54) Título: **Tratamiento de tumores resistentes a múltiples fármacos mediante un conjugado de mitomicina C**

(30) Prioridad:
30.04.2003 US 467070 P
14.11.2003 US 714085

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

(73) Titular/es:
ALZA CORPORATION
1900 CHARLESTON ROAD, M10-3B, P.O. BOX 7210
MOUNTAIN VIEW, CA 94039-7210, US y
Yissum Research Development Company of the HebrewUniversity of Jerusalem Ltd.

(72) Inventor/es:
ZALIPSKY, Samuel y
GABIZON, Alberto

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

Tratamiento de tumores resistentes a múltiples fármacos mediante un conjugado de mitomicina C

Campo de la invención

La presente invención se refiere a reducir la citotoxicidad de mitomicina C, y a administrar mitomicina C a una célula resistente a múltiples fármacos. La mitomicina C se proporciona en forma de un conjugado de profármaco compuesto por un resto hidrófobo unido al fármaco a través de un enlace escindible tal como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, el conjugado de profármaco está compuesto por un lípido unido al fármaco a través de un enlace escindible, incorporándose el lípido en una formulación liposómica. El conjugado de profármaco puede escindirse en condiciones tiolíticas leves *in vivo* para la liberación de mitomicina C en un estado no modificado.

Antecedentes de la invención

La mitomicina es un agente quimioterápico establecido que se administra para varios tipos diferentes de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de estómago, de garganta y de vejiga. El agente actúa mediante el entrecruzamiento del ADN de modo que las células cancerosas no puedan proliferar. Cuando se administra por vía intravenosa a los pacientes, los efectos secundarios comunes debidos a la toxicidad incluyen fiebre, náuseas, vómitos, depresión de la médula ósea, y otros (HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, Wilson y col., Eds., 12ª Edición, parte once, página 1592, 1991). La toxicidad del fármaco no es el único problema asociado con la quimioterapia. Otro problema es la resistencia a fármacos. Algunos tipos de tumor, por ejemplo, el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de colon, presentan resistencia primaria, es decir, ausencia de respuesta tras la primera exposición a agentes quimioterápicos convencionales, actualmente disponibles. Otros tipos de tumor presentan resistencia adquirida, que se desarrolla en varios tipos de tumor sensibles a fármacos. Las células cancerosas resistentes a fármacos demuestran dos tipos de resistencia a fármacos adquirida; las células que presentan resistencia a un único agente o resistencia a una única clase de fármacos anticancerígenos con el mismo mecanismo de acción. El segundo tipo implica células ampliamente resistentes a varios o a muchos fármacos anticancerígenos químicamente diversos con diferentes mecanismos de acción. Este segundo tipo de resistencia adquirida se conoce como resistencia a múltiples fármacos.

La resistencia a múltiples fármacos se encuentra también en algunas células tumorales, tales como tumores renales y de colon, que presentan resistencia primaria. Es decir, al contrario de una resistencia adquirida a múltiples fármacos, ciertos tipos de tumor no responden al tratamiento inicial con muchos agentes quimioterápicos.

La resistencia a múltiples fármacos está asociada con frecuencia con una expresión aumentada de un gen normal, el gen *MDR1*, para una glicoproteína de superficie celular, la glicoproteína P, implicada en el eflujo del fármaco. La expresión de glicoproteína P está correlacionada con una disminución en la acumulación de fármaco intracelular; es decir, la glicoproteína P actúa como una molécula de transporte o de bomba dependiente de energía que elimina los fármacos de la célula, impidiendo que el fármaco se acumule en la célula.

La glicoproteína P se expresa de manera normal principalmente en superficies epiteliales y endoteliales y parece desempeñar un cierto papel en la absorción y/o secreción. Es un transportador activo que bombea fármacos hidrófobos hacia fuera de las células, reduciendo su concentración citoplasmática y por lo tanto la toxicidad. En células normales, la glicoproteína P funciona para eliminar metabolitos tóxicos o compuestos xenobióticos del organismo (Endicott, J. y Ling, V., Annu. Rev. Biochem., 58:137-171, (1989)).

Los cánceres que expresan la glicoproteína P incluyen cánceres derivados de tejidos que expresan normalmente el gen *MDR1*, en concreto los cánceres de hígado, de colon, de riñón, de páncreas y suprarrenal. La expresión del gen se observa también durante el ciclo de la quimioterapia con fármacos resistentes a múltiples fármacos en leucemias, linfomas, cáncer de mama y ovario, y muchos otros cánceres. Estos cánceres responden inicialmente a la quimioterapia, pero cuando el cáncer experimenta recidiva, las células cancerosas expresan frecuentemente más glicoproteína P. Existen cánceres derivados de tejidos que no expresan normalmente glicoproteína P pero en los que la expresión de la glicoproteína P aumenta durante el desarrollo del cáncer. Un ejemplo es la leucemia mielógena crónica, que cuando pasa a crisis blástica, expresa más glicoproteína P independientemente de la historia de tratamiento previa (Gottesman, M.M. Cancer Research, 53:747-754 (1993)).

La bomba de glicoproteína P codificada por *MDR1* reconoce y transporta muchas sustancias diferentes, incluyendo fármacos anticancerígenos de los productos más naturales tales como doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, actinomicina D, paclitaxel, tenipósido y etopósido (Gottesman, M. y col., Current Opinion in Genetics and Development, 6:610-617 (1996)). Más generalmente, los fármacos frecuentemente implicados en la resistencia a múltiples fármacos son alcaloides o antibióticos de origen vegetal o fúngico, e incluyen alcaloides de la vinca, antraciclinas, epipodofilotoxinas y dactinomicina. La resistencia cruzada a agentes alquilantes tales como melfalán, mostaza nitrogenada, y mitomicina C se observa ocasionalmente (Endicott, J. y Ling, V., Annu. Rev. Biochem., 58:137-171, (1989)). Claramente, la resistencia a múltiples fármacos en células cancerosas limita la quimioterapia satisfactoria y sugiere un mal pronóstico para el paciente.

Los liposomas son vesículas lipídicas cerradas que se usan para diversos fines terapéuticos, y en particular, para

portar agentes terapéuticos a una región o célula diana mediante la administración sistémica de liposomas. Los liposomas que tienen una superficie injertada con cadenas de polímero biocompatible, soluble en agua, en particular polietilenglicol, se han convertido en vehículos farmacológicos importantes. Estos liposomas ofrecen una vida prolongada en la circulación sanguínea con respecto a liposomas que carecen del recubrimiento polimérico. Las cadenas poliméricas injertadas protegen o enmascaran el liposoma, minimizando así la interacción no específica mediante proteínas plasmáticas. Esto ralentiza a su vez la velocidad a la que se aclaran o eliminan los liposomas *in vivo* puesto que los liposomas circulan sin ser reconocidos por los macrófacos y otras células del sistema reticulo-endotelial. Además, debido al efecto de retención y permeabilidad mejorado (Maeda H. y col., J. Controlled Release, 65 (1-2) : 271 (2000)), los liposomas tienden a acumularse en sitios de la vasculatura dañada o expandida, por ejemplo, tumores, sitios de inflamación.

Con frecuencia se desea un tiempo prolongado en la circulación sanguínea para permitir que los liposomas administrados sistémicamente alcancen una región, célula o sitio diana. Por ejemplo, se prefiere una vida en circulación sanguínea de más de aproximadamente 12 horas para la terapia liposómica en una región tumoral, ya que los liposomas deben distribuirse sistémicamente y luego extravasarse hacia la región tumoral.

Zalipsky, S y col. ("New liposomal prodrug of mitomicyn C" Proceedings - 28th International. Symposium on Controlled Release of Bioactive Materiales y 4th Consumer & Diversified Products Conference, San Diego, CA, EE.UU., Editor: Controlled Release Society, vol. 1, 23 junio de 2001, páginas 437-438) da a conocer un conjugado de profármaco que contiene lípido de 1,2-diacilo como pro-resto unido a mitomicina C a través de carbamato de ditiobencilo tiolíticamente escindible, incorporado en liposomas de larga circulación.

El documento WO 00/64484 da a conocer conjugados de un resto hidrófobo, tal como un lípido, unido a través de un enlace de ditiobencilo escindible a un agente terapéutico.

El documento EP 0317956 da a conocer compuestos de profármaco antitumoral que comprenden un resto disulfuro. Los compuestos de profármaco liberan fármaco activo, libre, como resultado de experimentar una escisión reductora del resto disulfuro y su posterior fragmentación química.

Diaz, C y col. ("Síntesis of disulfide-containing fosfolypid analogs for the preparation of head group-specific lipid antigens: generation of fosfatidilserine antibodies" Bioconjugate Chemistry, EE.UU., American Chemical Society, Washington, vol. 9, Nº 2, marzo de 1998, páginas 250-254) da a conocer análogos de fosfatidilserina que contienen grupos de acoplamiento activados covalentemente unidos a proteínas portadoras para la producción de antígenos lipídicos que provocan respuestas inmunitarias específicas contra la fosfatidilserina.

El documento EP 0317957 da a conocer conjugados de fármaco-anticuerpo monoclonal en los que el anticuerpo se une a un fármaco antitumoral usando disulfuro-bencil-carbamato o carbonato como ligador.

El documento WO 97/36904 da a conocer un derivado de mitomicina C que comprende un grupo docosahexanoílo para inhibir tirosina cinasas no receptoras que se cree que participan en enfermedades inmunitarias.

El documento EP 0510197 da a conocer una emulsión grasa que comprende un derivado de mitomicina C que permite la migración eficaz de un profármaco de mitomicina C hacia los tejidos.

El documento FR 2254336 da a conocer derivados de mitomicina C en los que la mitomicina C está conjugada con un ácido graso.

Vaage J y col. ("Therapy of Primary and Metastatic Mouse Mammary Carcinomas with Doxorubicin Encapsulated in Long Circulating Liposomes" International Journal of Cancer, vol. 51, Nº 6, 1992, páginas 942-948) da a conocer los efectos terapéuticos de doxorubicina en tres formulaciones diferentes, en concreto en PBS, en liposomas convencionales y en liposomas "Stealth" estabilizados estéricamente, de larga circulación.

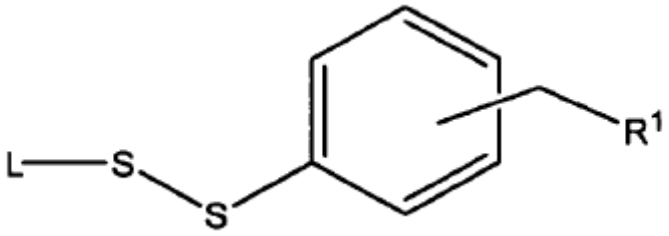
El documento WO 99/29302 da a conocer un sistema de administración de fármaco con un selección como diana en dos etapas, que comprende una combinación de un portador lipídico con agentes que seleccionan como diana células para dirigir el sistema de administración de fármaco a células o tejidos específicos y un fármaco encerrado en el portador lipídico proporcionado con un agente de selección como diana de ADN para dirigir el fármaco a los núcleos de células dianas específicas. Sería deseable proporcionar una formulación de mitomicina C que pueda captarse por células resistentes a múltiples fármacos.

También sería deseable formular una composición de liposoma que tenga una larga vida en circulación sanguínea y que pueda retener un fármaco atrapado durante un tiempo deseado, pero que pueda liberar el fármaco a demanda. También sería deseable proporcionar una formulación de mitomicina C que sea tan eficaz como el fármaco en forma libre, pero que tenga una toxicidad sistémica reducida. Además, sería deseable liberar la mitomicina C citotóxica en respuestas a las condiciones endógenas en el tumor.

Sumario de la invención

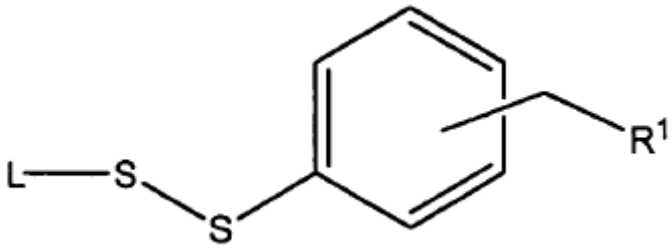
Por consiguiente, un objetivo de la invención es proporcionar una formulación liposómica de mitomicina C que ofrezca una toxicidad reducida con respecto al fármaco en forma libre, y que pueda captarse por células resistentes a múltiples fármacos. Es decir, la mitomicina C, que no puede acumularse en células resistentes a múltiples fármacos cuando se administra en forma libre, puede acumularse en tales células cuando se administra en forma de un conjugado de profármaco incorporado en la formulación liposómica que se describe en el presente documento.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una composición que comprende liposomas formados por un lípido formador de vesículas y de entre el 1 y el 30 por ciento en moles de un conjugado que tiene la fórmula general:



en la que L es un resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica, R^1 es mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo, y en la que la orientación del grupo CH_2R^1 se selecciona entre la posición orto y la posición para, para la fabricación de un medicamento para administrar mitomicina C *in vivo* para tratar un tumor resistente a múltiples fármacos.

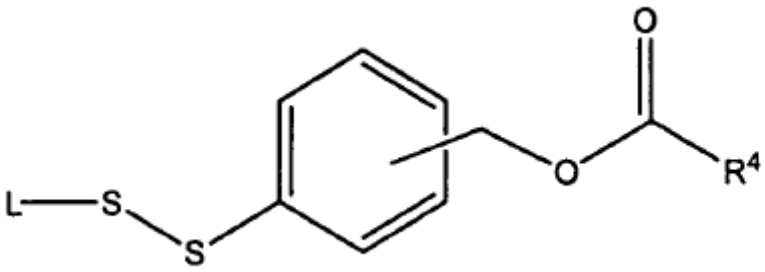
La presente invención proporciona también una composición que comprende liposomas formados por un lípido formador de vesículas y de entre el 1 y el 30 por ciento en moles de un conjugado que tiene la fórmula general:



en la que L es un resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica, R^1 es mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo, y en la que la orientación del grupo CH_2R^1 se selecciona entre la posición orto y la posición para, para su uso en la administración de mitomicina C *in vivo* para tratar un tumor resistente a múltiples fármacos.

Preferiblemente, la mitomicina C está covalentemente unida mediante un enlace uretano. Preferiblemente, L se selecciona del grupo que consiste en colesterol, un diacilglicerol y un fosfolípido.

Preferiblemente, el conjugado comprende mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo para formar un conjugado que tiene la estructura:



en la que R^4 representa un residuo de mitomicina C.

Preferiblemente un resto de amina secundaria de R^4 forma un enlace uretano entre el ditiobencilo y la mitomicina C.

Éstos y otros objetivos y características de la invención se apreciarán más completamente al leerse la siguiente descripción detallada junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

la figura 1 muestra un esquema de reacción sintético para la preparación de para-diacildiglicerol-ditiobencilalcohol para la reacción adicional con fármacos que contiene amina, hidroxilo o carboxilo;

la figura 2A muestra un esquema de reacción general para la unión de un fármaco que contiene amina a un diacildiglicerol-ditiobencilcarbonato reactivo;

la figura 2B muestra los productos tras la escisión tiolítica del conjugado en la figura 2A;

la figura 3A muestra un esquema de reacción sintético para la preparación de un conjugado de diacildiglicerol-ditiobencil-mitomicina C;

la figura 3B muestra los productos tras la escisión tiolítica del conjugado en la figura 3A;

la figura 4 muestra un esquema de reacción sintético para la preparación de un conjugado de colesterol-ditiobencil-mitomicina C;

la figura 5 muestra otro esquema de reacción sintético para la preparación de un conjugado de colesterol-ditiobencil-mitomicina C;

las figuras 6A-6C muestran las estructuras de tres conjugados de lípido-ditiobencil-mitomicina C, para-diestearoil-DTB-mitomicina C (figura 6A), para-dipalmitoil-DTB-mitomicina C (figura 6B) y orto-dipalmitoil-DTB-mitomicina C (figura 6C);

las figuras 7A-7B son cromatogramas de HPLC para liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (figura 7A) y HSPC/colesterol/mPEG-DSPEE/lípido-DTB-mitomicina C (figura 7B), en los que cada figura muestra una serie de cromatogramas en función del tiempo de incubación de los liposomas en presencia de cisteína;

la figura 8 es un diagrama que muestra el porcentaje de mitomicina C liberada a partir de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (rombos rellenos) y HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos) en función del tiempo de incubación en presencia de cisteína;

las figuras 9A-9B son diagramas que muestran el porcentaje de mitomicina C liberada a partir de liposomas compuestos por HSPC/mPEGDSPE/lípido-DTB-mitomicina C (figura 9A) y HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (figura 9B) en función del tiempo de incubación en presencia de cisteína a concentraciones de 150 μM (símbolos rellenos) y a 1,5 mM (símbolos en blanco);

la figura 10 es un diagrama de la tasa de crecimiento de células M109, expresada como un porcentaje basado en el crecimiento de células M109 en ausencia de fármaco y cisteína, en función de la cantidad de mitomicina C, en nM, para mitomicina C libre (triángulos en blanco), liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (cuadrados rellenos), y liposomas compuestos por HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos en blanco);

la figura 11A es un diagrama de tasa de crecimiento de células M109, expresada como un porcentaje basado en el crecimiento de células M109 en ausencia de fármaco o cisteína, en función de la concentración de mitomicina C en nM. Se muestran células tratadas con mitomicina C en forma libre (triángulos en blanco) y con mitomicina C en forma libre más cisteína 1000 μM (triángulos rellenos). También se muestran células tratadas con la formulación de liposoma compuesta por HSPC/PEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos en blanco) y con la formulación de liposoma con cisteína adicional añadida a concentraciones de 150 μM (rombos en blanco), 500 μM (círculos rellenos) y 1000 μM (cuadrados rellenos);

la figura 11B es un diagrama de tasa de crecimiento de células M109, expresada como un a porcentaje basado en el crecimiento de células M109 en ausencia de fármaco o cisteína, en función de la concentración de mitomicina C en nM. Se muestran células tratadas mitomicina C en forma libre (triángulos en blanco) y con mitomicina C en forma libre más cisteína 1000 μM (triángulos rellenos). También se muestran células tratadas con la formulación de liposoma compuesta por HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos en blanco) y con la formulación de liposoma con cisteína adicional añadida a concentraciones de 150 μM (rombos en blanco), 500 μM (círculos rellenos) y 1000 μM (cuadrados rellenos);

la figura 12 es un diagrama que muestra el porcentaje de aumento en citotoxicidad (tal como se determina mediante ($CI50_{sin\ cisteína}/CI50_{cisteína}$) x100)) de mitomicina C libre (cuadrados rellenos), mitomicina C asociada con liposomas compuestos por HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos), y liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (triángulos en blanco) con respecto a células M109 *in vitro* a diversas concentraciones de cisteína;

la figura 13A es un diagrama que muestra la concentración de mitomicina C en la sangre de ratas en función del tiempo en horas tras inyección intravenosa de mitomicina C libre (cuadrados rellenos), liposomas compuestos por HSPC/colesterol/mPEGDSPE/lípido-DTB-mitomicina C (rombos rellenos), y liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos);

la figura 13B es un diagrama que muestra el porcentaje de dosis inyectada que permanece en la sangre de ratas en función del tiempo en horas tras inyección intravenosa de mitomicina C libre (cuadrados rellenos), liposomas compuestos por HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (rombos rellenos), y liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos);

la figura 14 es un diagrama que muestra el peso corporal medio, en gramos, en función del tiempo, en días, tras la inyección de mitomicina C libre (cuadrados rellenos) o de mitomicina C en forma de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos);

la figura 15A es un diagrama que muestra tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función de los días tras la inoculación con células tumorales M109 en la pata de ratones, en el que los ratones se dejaron sin tratar (ratones control; (cuadrados rellenos)) o se trataron con mitomicina C libre (triángulos en blanco) o con liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos);

la figura 15B es un diagrama que muestra el tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función de los días tras la inoculación con células tumorales M109 en la pata de ratones, en el que los ratones se dejaron sin tratar (ratones control; (cuadrados rellenos)) o se trataron con mitomicina C libre (triángulos en blanco) a 2 mg/kg (línea discontinua) o 4 mg/kg (línea continua), o con liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos) a 2 mg/kg (línea discontinua) o 4 mg/kg (línea continua);

la figura 16A es un diagrama que muestra el tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función de los días tras la inoculación con células tumorales M109 en la pata de ratones, en el que los ratones se dejaron sin tratar (ratones control; (cuadrados rellenos)) o se trataron con mitomicina C libre (triángulos en blanco) a 6 mg/kg o con tres dosis administradas en los días 5, 12, y 19 de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 6 mg/kg (círculos rellenos, rombos rellenos), en el que los animales representados mediante los rombos rellenos recibieron inyecciones de cisteína administradas en los días 6-8, 14-16 y 21-23;

la figura 16B es un diagrama que muestra el porcentaje de ratones vivos con un tamaño de tumor de almohadilla de la pata inferior a 4 mm, en función de los días tras la inoculación del tumor, para los ratones tratados tal como se expone en la figura 16A;

la figura 17 es un diagrama de porcentaje de supervivencia en función del tiempo tras la inoculación con células tumorales C26 en ratones dejados sin tratar (cuadrados), tratados con mitomicina C libre (triángulos) a 6 mg/kg, o tratados con liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a una única dosis de 6 mg/kg (círculos) o dos dosis de 6 mg/kg y cisteína (rombos);

la figura 18 es un diagrama del tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función del tiempo tras la inoculación con células tumorales M109-R en ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos), tratados con mitomicina C libre (triángulos en blanco) a 8 mg/kg, tratados con una dosis (círculos rellenos, línea continua) o dos dosis (círculos rellenos, línea discontinua) de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 8 mg/kg;

la figura 19A es un diagrama del peso medio, en gramos, en función de los días tras la inoculación del tumor, para ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos), tratados con dos dosis de 10 mg/kg de doxorubicina encerrada en liposomas que tienen un recubrimiento de cadenas de polietilenglicol (Stealth®, triángulos en blanco), tratados con dos dosis de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 10 mg/kg (círculos rellenos) sin cisteína (círculos rellenos, línea continua) o con cisteína 5 mg/kg (círculos rellenos, línea discontinua);

la figura 19B es un diagrama del espesor de la almohadilla de la pata medio, en mm, en función de los días tras la inoculación del tumor, para ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos), tratados con dos dosis de 10 mg/kg de doxorubicina encerrada en liposomas que tienen un recubrimiento de cadenas de polietilenglicol (Stealth®, triángulos en blanco), tratados con dos dosis de liposomas compuestos por HSPC/mPEGDSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 10 mg/kg (círculos rellenos) sin cisteína (línea continua) o con 5 mg/kg cisteína (línea discontinua); y

la figura 19C es un diagrama del porcentaje de ratones vivos con un tumor de la almohadilla de la pata inferior a 5 mm en función de los días tras la inoculación del tumor de células M109R, para ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos), tratados con dos dosis de 10 mg/kg de doxorubicina encerrada en liposomas que tienen un recubrimiento de cadenas de polietilenglicol (Stealth®, triángulos en blanco), tratados con dos dosis de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 10 mg/kg (círculos rellenos) sin cisteína (línea continua) o con cisteína 5 mg/kg (línea discontinua).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

La expresión “resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica” quiere decir cualquier material que comprende una parte hidrófoba que puede integrarse con la región de bicapa hidrófoba de una bicapa lipídica liposómica. Tales restos hidrófobos son normalmente lípidos, incluyendo lípidos antipáticos que tienen una cola lipídica hidrófoba y una cabeza polar hidrófila, tal como los fosfolípidos y diacilgliceroles. También se contemplan triglicéridos, esteroles, derivados de fosfolípidos, diacilgliceroles, esteroles y triglicéridos y otros lípidos derivados de una fuente natural o preparados sintéticamente.

El término “residuo” tal como en “residuo de fármaco terapéutico” quiere decir una molécula de fármaco que se ha hecho reaccionar para formar un enlace con otra molécula en la que al menos un átomo de la molécula de fármaco se sustituye o se ha sacrificado para formar el enlace.

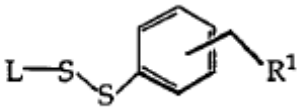
La referencia a “lípido-DTB-mitomicina C” es al compuesto XVIII de la figura 6A.

"Polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica un polímero de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína y enzima están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término incluye también modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones,

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas: PEG, poli(etilenglicol); mPEG, metoxi-PEG; DTB, ditiobencilo; DSPE, diestearoil-fosfatidiletanolamina; HSPC, fosfatidilcolina de soja hidrogenada; MMC, mitomicina C.

II. Composición de conjugado y procedimiento de preparación

En un aspecto, la invención incluye un conjugado de fórmula:



en la que L es un resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica, R^1 representa un residuo de fármaco terapéutico covalentemente unido al resto ditiobencilo, y en la que la orientación del grupo CH_2R^1 se selecciona entre la posición orto y la posición para. El resto hidrófobo, L, es normalmente un lípido tal como un diacilglicerol, un esterol, un fosfolípido, derivados de estos lípidos, otros lípidos que se producen de manera natural y sus análogos sintéticos.

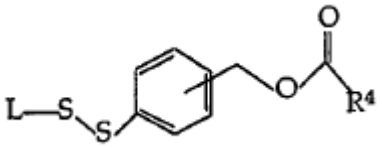
En el conjugado, un fármaco terapéutico está unido al resto ditiobencilo mediante un enlace covalente, formando así un residuo de fármaco, representado por R^1 en la estructura. El enlace variará según el fármaco y la química de reacción, tal como apreciarán los expertos en la técnica. En realizaciones preferidas, el fármaco terapéutico está covalentemente unido al resto ditiobencilo mediante un enlace seleccionado del grupo que consiste en uretano, amina, amida, carbonato, tiocarbonato, éter y éster.

Un enlace uretano adopta la forma de $O(C=O)NH-R^4$ u $O(C=O)N=R^4$, en las que R^4 representa el residuo de fármaco terapéutico. Por ejemplo, un fármaco que contiene una amina primaria o secundaria, es decir mitomicina C, se hace reaccionar para formar un enlace uretano con el resto amina en el fármaco.

Un enlace carbonato adopta la forma de $O(C=O)O-R^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco y el enlace carbonato se deriva de un resto fenol o alcohol o hidroxilo en el fármaco. Un tio-carbonato adopta la forma de $O(C=O)SR^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco y el enlace se deriva de un resto en el fármaco.

Un enlace éster adopta la forma de $O(C=O)-R^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco. El enlace se deriva de reacción con un resto ácido carboxílico en el fármaco terapéutico.

Los conjugados que tienen un enlace uretano, carbonato o éster que une el fármaco al resto ditiobencilo pueden representarse generalmente mediante la siguiente estructura:



en la que R^4 representa un residuo del fármaco terapéutico.

En otra realización, el conjugado incluye un enlace éter que adopta la forma de $O-R^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco terapéutico. El enlace se deriva normalmente de la reacción con una funcionalidad alcohol en el fármaco.

Un enlace amina tiene la forma $N=R^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco y el enlace es una unión directa con el resto CH_2 del ditiobencilo con un N en el fármaco. Un conjugado con el fármaco 5-fluorouracilo en el que se forma un enlace amina es un ejemplo que se expone en la patente de los Estados Unidos Nº 6.342.244.

Un enlace amida adopta la forma de $NH(C=O)-R^4$, en la que R^4 representa el residuo de fármaco.

La figura 1 muestra un esquema de reacción sintético para la preparación de conjugados a modo de ejemplo de acuerdo con la invención. En esta realización, la síntesis de de un compuesto intermedio, para-diacildiglicerolditiobenzalcohol (compuesto IV), se prepara para la reacción adicional con un fármaco terapéutico seleccionado. El compuesto IV se prepara, tal como se describe en el ejemplo 1, haciendo reaccionar 3-mercapto-1,2-propanodiol (compuesto I) con peróxido de hidrógeno para formar rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiol) (compuesto II). Rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiol) se acila con un resto hidrófobo R. Por ejemplo, R puede ser un ácido graso que

tiene desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 24 átomos de carbono. El ejemplo 1 detalla el procedimiento de reacción en el que R es ácido esteárico. En otra realización, R es un ácido graso que tiene desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 22 átomos de carbono. La acilación del compuesto II proporciona Rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiestearoil) (compuesto III), que se hace reaccionar con cloruro de sulfurilo y 4-mercaptobenzalcohol para formar el producto intermedio deseado, para-diacildiglicerol-ditiobenzalcohol (compuesto IV). El compuesto IV se hace reaccionar fácilmente con un fármaco que contiene un resto carboxilo reactivo ($R'CO_2H$) para formar un conjugado de lípido-ditiobencilo (DTB)-fármaco en el que el fármaco está unido al DTB a través de un enlace éster (compuesto V). El compuesto IV se hace reaccionar también fácilmente con un fármaco que contiene un resto amina reactivo ($R'\text{-}NH_2$) para proporcionar un conjugado de lípido-DTB-fármaco en el que el fármaco está unido al DTB mediante un enlace uretano (compuesto VI). El compuesto IV se hace reaccionar también fácilmente con un fármaco que contiene un resto hidroxilo reactivo (R'OH) para formar un conjugado de lípido-DTB en el que el fármaco está unido al DTB mediante un enlace carbonato (compuesto VII).

El fármaco contemplado para su uso en el conjugado de la invención, mitomicina C, tiene una amina reactiva (grupo aziridina). La síntesis de conjugados usando mitomicina C se trata con respecto a las figuras 2-6.

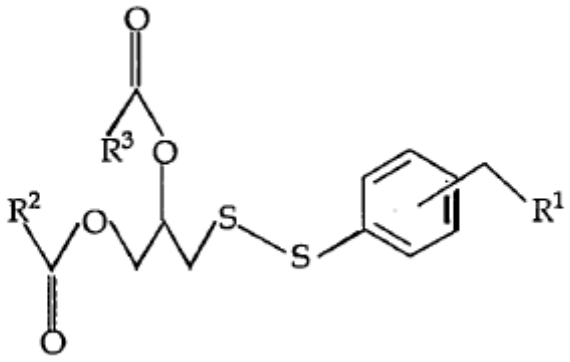
El ejemplo 1 también detalla las condiciones de reacción para la preparación de orto-diacildiglicerolditiobenzalcohol, que puede servir como compuesto intermedio para formar el conjugado.

Las figuras 2A-2B muestran la preparación de un conjugado de lípido-DTB-fármaco (figura 2A), y la escisión tiolítica del conjugado en presencia de un agente reductor (figura 2B). Tal como se muestra en la figura 2A, el compuesto VII de la figura 1, en el que el resto hidrófobo R se deriva de un ácido graso R"(CO)OH, tal como ácido esteárico ($CH_3(CH_2)_{16}CO_2H$), se hace reaccionar con un fármaco que contiene amina, H_2N-fármaco, en presencia de fosgeno ($COCl_2$). Esta reacción proporciona el conjugado de lípido-DTB-fármaco ilustrado en la figura 2A. El conjugado, tras la exposición a condiciones reductoras, es decir, un agente reductor tal como cisteína o glutatión, se descompone para proporcionar los productos mostrados en la figura 2B. Tal como se muestra, la escisión tiolítica del conjugado da como resultado la regeneración del fármaco en un estado natural, no modificado. Esto es una característica deseable, puesto que, tal como se mostrará a continuación, el fármaco en el conjugado puede incorporarse fácilmente en liposomas para su administración *in vivo* a un sujeto. Además, el fármaco en forma del conjugado no es tóxico, tal como se mostrará también a continuación. Tras la administración y tras la exposición a agentes reductores endógenos o la exposición a un agente reductor exógeno, el conjugado se descompone para proporcionar el fármaco en su estado nativo y con actividad biológica.

La figura 3A muestra la síntesis del conjugado de profármaco de mitomicina C. En el esquema de reacción mostrado, la mitomicina C (compuesto XVII, figura 3B), un fármaco que contiene un resto amina reactivo, se hace reaccionar con para-diacil-diglicerol-ditiobenzalcohol (compuesto IV) en presencia de fosgeno para formar un conjugado de diacildiglicerol-ditiobencil-mitomicina C (compuesto XVIII). Los detalles de la síntesis se proporcionan en el ejemplo 2.

La figura 3B muestra la descomposición tiolítica de un conjugado de diacildiglicerol-DTB-mitomicina C. En presencia de un agente reductor, el conjugado se descompone para regenerar mitomicina C (compuesto XVII) y los otros productos mostrados.

Tal como se indicó anteriormente, el resto hidrófobo en el conjugado puede seleccionarse de cualquiera de varios restos hidrófobos, por ejemplo, lípidos. En una realización, puede usarse un lípido de diacildiglicerol para formar conjugados que tienen la estructura:



en la que R^2 y R^3 son hidrocarburos que tienen entre aproximadamente 8 y aproximadamente 24 átomos de carbono.

Además de diacilgliceroles como el resto hidrófobo, se contemplan otros lípidos. La figura 4 muestra otra realización en la que se usa colesterol como el resto hidrófobo en el conjugado. Colesterol (compuesto XIV) se hace reaccionar

con cloruro de metanosulfonilo en diclorometano en presencia de trietilamina (TEA). El producto intermedio resultante se convierte entonces en el derivado de tiol y en última instancia en el alcohol ditiobencílico principal, que se usa para unir la mitomicina C de una manera similar a la descrita anteriormente para diacilglicerol.

Un esquema de reacción alternativo para la preparación de un conjugado de colesterol-DTB-mitomicina C se muestra en la figura 5. Metoxicarbonilditioetil-amina se hace reaccionar directamente con cloroformiato de colesterol formando un enlace uretano. Luego se usa mercaptobencilalcohol para obtener el compuesto de DTB-colesterol. La mitomicina C se une tal como se describió anteriormente y en el ejemplo 2.

En estudios realizados para apoyar la invención, que se describen a continuación, se usó el conjugado preparado tal como se describe en la figura 3A, compuesto XVII, para-diestearoil-DTB-mitomicina C. Por facilidad de referencia, este conjugado se muestra en la figura 6A. Ha de apreciarse que pueden usarse otros lípidos de diacilo, tales como un lípido de dipalmitoílo, y la figura 6B muestra un conjugado de para-dipalmitoil-DTB-mitomicina C. Se apreciará también que el conjugado puede tener también un enlace isomérico. Esto es evidente en el conjugado de orto-dipalmitoil-DTB-mitomicina C tal como se muestra en la figura 6C.

III. Preparación de liposomas que comprenden conjugado

En la invención, el conjugado de profármaco de mitomicina C se proporciona en forma de una composición de liposoma compuesta por un lípido formador de vesículas y el conjugado de profármaco de mitomicina C. Los liposomas son vesículas de lípido cerradas que se usan para diversos fines terapéuticos, y en particular, para portar agentes terapéuticos hasta una célula o región diana mediante la administración sistémica de liposomas. En particular, los liposomas que tienen un recubrimiento superficial de cadenas de polímero hidrófilo, tales como polietilenglicol (PEG), son deseables como portadores de fármaco ya que estos liposomas ofrecen una vida en circulación sanguínea prolongada con respecto a los liposomas que carecen del recubrimiento de polímero. El polímero actúa como una barrera para las proteínas de la sangre, impidiendo de ese modo la unión de la proteína y el reconocimiento de los liposomas para su captación y eliminación por los macrófagos y otras células del sistema retículo-endotelial.

Los liposomas, según la invención, incluyen un conjugado en combinación con un lípido, que en una realización es un lípido formador de vesículas, y, opcionalmente, otros componentes de bicapa. Los “lípidos formadores de vesículas” son lípidos que forman espontáneamente vesículas de bicapa en agua. Los lípidos formadores de vesículas tienen preferiblemente dos cadenas de hidrocarburo, normalmente cadenas de acilo, y un grupo de cabeza polar. Existen diversos lípidos formadores de vesículas sintéticos y lípidos formadores de vesículas que se producen de manera natural conocidos en la técnica, en los que las dos cadenas de hidrocarburo tienen normalmente desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 24 átomos de carbono de longitud, y tienen grados de instauración variables. Los ejemplos incluyen los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), y esfingomielina (SM). Un lípido preferido para su uso en la presente invención es fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC). Otra familia de lípidos preferida son los diacilgliceroles. Estos lípidos pueden obtenerse comercialmente o prepararse según procedimientos publicados.

El lípido formador de vesículas puede seleccionarse para conseguir un grado de fluidez o rigidez, para controlar la estabilidad del liposoma en suero, y para controlar la tasa de liberación de un agente encerrado en el liposoma. Los liposomas que tienen una bicapa lipídica más rígida, o una bicapa cristalina líquida, pueden prepararse mediante la incorporación de un lípido relativamente rígido, por ejemplo, un lípido que tiene una temperatura de transición de fases relativamente alta, por ejemplo, hasta aproximadamente 80 ºC. Los lípidos rígidos, es decir, saturados, contribuyen a una mayor rigidez de la membrana en la bicapa lipídica. Se sabe también que otros componentes lipídicos, tales como el colesterol, contribuyen a la rigidez de la membrana en estructuras de bicapa lipídica.

La fluidez del lípido se consigue mediante la incorporación de un lípido relativamente fluido, normalmente uno que tenga una fase de lípido con una temperatura de transición de fases de líquida a cristalina-líquida relativamente baja, por ejemplo, a o por debajo de la temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 ºC).

El liposoma puede incluir también otros componentes que pueden incorporarse en bicapas lipídicas, tales como esteroles. Estos otros componentes tienen normalmente un resto hidrófobo en contacto con la región hidrófoba interior de la membrana de bicapa, y un resto de grupo de cabeza polar orientado hacia la superficie exterior polar de la membrana.

Otro componente lipídico en los liposomas de la presente invención, es un lípido formador de vesículas derivatizado con un polímero hidrófilo. En este componente lipídico, un lípido derivatizado da como resultado la formación de un recubrimiento superficial de cadenas de polímero hidrófilo en las superficies de la bicapa lipídica tanto interna como externa. Normalmente, en la composición de lípido se incluye entre el 1-20 por ciento en moles del lípido derivatizado.

Los polímeros hidrófilos adecuados para la derivatización con un lípido formador de vesículas incluyen polivinilpirrolidona, polivinilmetil éter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, poli(metacrilato de hidroxipropilo), poli(acrilato de hidroxietilo), hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, y poliaspartamida. Los polímeros

pueden emplearse como homopolímeros o como copolímeros de bloque o al azar.

Una cadena polímero hidrófilo preferida es polietilenglicol (PEG), preferiblemente como una cadena de PEG que tiene un peso molecular entre 500 y 10.000 Daltons, preferiblemente entre 1.000 y 5.000 Daltons. Los análogos tapados con metoxilo o etoxilo de PEG son también polímeros hidrófilos preferidos. Estos polímeros se encuentran comercialmente disponibles en diversos tamaños de polímero, por ejemplo, desde 12 hasta 220.000 Daltons.

Los liposomas de la presente invención incluyen normalmente entre el 1 y el 30 por ciento en moles del conjugado de lípido-DTB-fármaco, preferiblemente entre el 5 y el 30 por ciento en moles, más preferiblemente entre el 5 y el 20 por ciento en moles. En estudios realizados para apoyar la invención, los liposomas compuestos por el lípido formador de vesículas fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), diestearoil-fosfatidiletanolamina derivatizada con metoxi-polietilenglicol (mPEG-DSPE) y el conjugado mostrado en la figura 6A, para-diestearoil-DTB-mitomicina C (compuesto XVIII) se prepararon tal como se describe en los ejemplos 4A-4B. Una de las formulaciones de liposoma incluía colesterol (ejemplo 4A), con los lípidos HSCP/colesterol/mPEG-DSPE/para-diestearoil-DTB-mitomicina C (compuesto XVIII) presentes a una relación molar de 60/30/5/5. Una segunda formulación, que no contenía colesterol, se preparó y se caracterizó (ejemplo 4B). En esta formulación, los lípidos HSCP/mPEG-DSPE/para-diestearoil-DTB-mitomicina C (compuesto XVII) estaban presentes a una relación molar de 90/5/5.

IV. Caracterización *in vitro* de liposomas que contienen un conjugado

A. Liberación de fármaco *in vitro*

Los liposomas se prepararon tal como se describe en los ejemplos 4A-4B y se caracterizaron *in vitro* para determinar la tasa de liberación de mitomicina C tras la exposición a agente reductor. Para los estudios *in vitro*, se indujeron condiciones reductoras mediante la adición de cisteína, normalmente a una concentración de aproximadamente 150 μM, la medio de prueba. Se apreciará que *in vivo*, las condiciones reductoras endógenas pueden ser suficientes para efectuar la descomposición tiolítica del conjugado de lípido-DTB-fármaco para la liberación del fármaco. Se contempla además que las condiciones reductoras *in vivo* pueden inducirse artificialmente mediante la administración de un agente reductor adecuado, tal como cisteína o glutatión.

Las formulaciones de liposoma, por ejemplo, conjugado de HSPC/colesterol/mPEG-DSPE, compuesto XVIII (a continuación en el presente documento la “formulación que contiene colesterol”) y conjugado de HSPC/mPEG-DSPE, compuesto XVIII (a continuación en el presente documento la “formulación de liposoma libre de colesterol”) se incubaron a 37 ºC en presencia de cisteína 150 μM durante 24 horas. Las muestras se retiraron en los momentos seleccionados y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar la cantidad de conjugado y de mitomicina C libre. Las condiciones de HPLC se describen en el ejemplo 5.

Las figuras 7A-7B muestran cromatogramas de HPLC para dos formulaciones de liposoma. En la figura 7A se muestran los resultados para la formulación de liposoma libre de colesterol. En el tiempo cero, no hay mitomicina C libre detectable y todo el fármaco medible está en forma de un conjugado de lípido-DTB-fármaco que está unido a liposoma. A medida que aumenta el tiempo de incubación, aumenta la cantidad de mitomicina C liberada a partir de los liposomas y detectable en forma libre, con una disminución correspondiente en presencia de mitomicina C unida a conjugado.

La figura 7B muestra los resultados para la formulación de liposomas que contienen colesterol. En la primera muestra tomada en el tiempo cero, no había mitomicina C libre detectable. Tras 1 hora de incubación en cisteína 150 μM se detectó una pequeña cantidad de fármaco libre, lo que indicaba la descomposición de conjugado de lípido-DTB-mitomicina unido a liposoma. En comparación con la figura 7A, los liposomas que contienen colesterol proporcionan una tasa de descomposición de conjugado más lenta y en consecuencia, una liberación más lenta del fármaco.

La figura 8 es un diagrama que muestra el porcentaje de mitomicina C liberada a partir de las dos formulaciones de liposoma, tal como se determina a partir de los cromatogramas de las figuras 7A-7B. Los liposomas libres de colesterol (rombos rellenos) tenían una tasa de liberación mayor que los liposomas que contenían colesterol (círculos rellenos). Más del 50 % de la mitomicina C se liberó a partir del conjugado unido a liposoma tras 2 horas para la formulación libre de colesterol. Para ambas formulaciones, se liberó más del 80 % del fármaco al final del periodo de incubación de 24 horas.

En otro estudio, las dos formulaciones de liposoma se incubaron en cisteína 1,5 mM. El análisis se realizó tal como se describe en el ejemplo 5 y los resultados se muestran en las figuras 9A-9B. La figura 9A muestra el porcentaje de mitomicina C liberada a partir del conjugado de lípido-DTB-fármaco incorporado en los liposomas libres de colesterol liposomas (HSPC/PEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C). El porcentaje de liberación durante la incubación con 150 μM se muestran también (rombos rellenos) para comparación. Tal como se observa, la incubación a una concentración mayor de agente reductor (1,5 mM, rombos en blanco) provoca un aumento en la tasa de descomposición de conjugado y la tasa de liberación de fármaco.

La figura 9B muestra los resultados para la formulación de liposomas que contienen colesterol. Los liposomas incubados en 1,5 mM (círculos en blanco) tienen una tasa de descomposición significativamente mayor que los

mismos liposomas incubados en cisteína 150 μM (círculos rellenos).

B. Citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* de liposomas que contenían el conjugado de lípido-DTB-mitomicina C (compuesto XVIII) se evaluó usando células M-109, una línea de carcinoma de pulmón de ratón. Tal como se describe en el ejemplo 6, las células M109 se incubaron en presencia de mitomicina C libre o liposomas que contenían el conjugado de diestearoil-DTB-mitomicina C. Se sometieron a prueba los liposomas preparados tal como se describe en los ejemplos 4A-4B con las relaciones molares especificadas en el ejemplo 6A. Se añadió cisteína a concentraciones de 150 μM, 500 μM y 1000 μM a algunas de las células de prueba para efectuar la descomposición tiolítica del conjugado y la liberación de mitomicina C.

Los valores de CI50 se consideraron como la concentración de fármaco que provocaba una inhibición del 50 % de la tasa de crecimiento control (CI50), tal como se describe en el ejemplo 6. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Valores de CI50 para células tumorales M109 tras cultivo de 72 horas con exposición continua a formulación

Formulación	Concentración de cisteína			
	0	150 μM	500 μM	1000 μM
MMC[1] libre	285 ± 92	n.d.[4]	n.d.	300 ± 71
liposomas con colesterol[2]	1750 ± 356	1140 ± 368	650 ± 42	510 ± 113
liposomas libres de colesterol[3]	5400 ± 1414	4550 ± 1484	3600 ± 1272	2550 ± 778

[1]MMC=mitomicina C
[2]HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/diestearoil-DTB-MMC (90/45/5/5)
[3]HSPC/mPEG-DSPE/diestearoil-DTB-MMC (90/5/5)
[4]n.d.= no determinado

El porcentaje de tasa de crecimiento de células de carcinoma de ratón M109 determinado a partir de los estudios de citotoxicidad se muestra en la figura 10. El porcentaje de tasa de crecimiento se expresa como un porcentaje basado en la tasa de crecimiento de células M109 en ausencia de mitomicina C y de cisteína y se muestra en función de la concentración de mitomicina C, en nM. La tasa de crecimiento de células se determinó tal como se describe en el ejemplo 6. Tal como se observa, el porcentaje de tasa de crecimiento celular disminuye a medida que se aumenta la concentración de cisteína tanto parar los liposomas que contienen colesterol (círculos en blanco) como para la formulación de liposomas libres de colesterol (cuadrados rellenos). También puede observarse que la cisteína no tiene ningún efecto sobre la actividad de la mitomicina C libre y que la mitomicina C se libera a partir del conjugado para inhibir de forma eficaz el crecimiento celular.

La tasa de crecimiento *in vitro* de células de carcinoma de ratón M109 tratadas con mitomicina C en forma libre o con mitomicina C en forma de un conjugado unido a liposoma de lípido-DTB-fármaco se muestra en las figuras 11A-11B. En la figura 11A se muestran los resultados para la formulación de liposoma que no contiene colesterol. En el diagrama, la tasa de crecimiento de células M109 se expresa como un porcentaje basado en el crecimiento de células M109 en ausencia de fármaco y cisteína y se muestra en función de la concentración de mitomicina C en nM. Las células tratadas con mitomicina C en forma libre (triángulos en blanco) y con mitomicina C en forma libre más cisteína 1000 μM (triángulos rellenos) muestran una disminución en la tasa de crecimiento debido a la toxicidad del fármaco en forma libre. Las células tratadas con la formulación de liposoma compuesta por HSPC/PEG-DSPE/DSPE-DTB-mitomicina C (círculos en blanco) y con la formulación de liposoma con cisteína adicional añadida a concentraciones de 150 μM (rombos en blanco), 500 μM (círculos rellenos) y 1000 μM (cuadrados rellenos) mostraron citotoxicidad celular de una manera dependiente de la dosis de cisteína.

La figura 11B es un diagrama similar para la formulación de liposomas que contienen colesterol. El mismo patrón se observó para las células tratadas con la composición de liposoma que contiene colesterol más cisteína adicional a concentraciones de 150 μM (rombos en blanco), 500 μM (círculos rellenos) y 1000 μM (cuadrados rellenos). Es decir, a medida que aumenta la concentración de cisteína, disminuye la tasa de crecimiento celular. Esto indica una liberación inducida por cisteína de mitomicina C en correlación directa con la concentración de cisteína. A diferencia de las formulaciones de liposoma, la tasa de crecimiento *in vitro* de células tratadas con mitomicina C en forma libre (triángulos en blanco) era la misma que la tasa de crecimiento de células tratadas con mitomicina C en forma libre más cisteína 1000 μM (triángulos rellenos).

La figura 12 muestra el porcentaje de aumento en citotoxicidad en función de la concentración de cisteína, en μM, de mitomicina C libre y de las formulaciones de liposoma. Aumento en la citotoxicidad se determinó mediante el porcentaje de caída en CI50, por ejemplo, CI50 en presencia de cisteína con respecto a CI50 en ausencia de cisteína por 100 (($CI50_{sin\ cisteína}/CI50_{cisteína}$)X100)). Tal como se observa, el porcentaje de citotoxicidad aumenta

significativamente a medida que se aumenta la concentración de cisteína tanto para los liposomas que contienen colesterol (triángulos en blanco) como para la formulación de liposomas libres de colesterol (círculos rellenos). La citotoxicidad de mitomicina C libre (cuadrados rellenos) no se efectúa por la presencia de cisteína.

Los datos de citotoxicidad muestran que la formulación de liposomas libres de colesterol se ve más afectada por la cisteína. La CI50 de la formulación de liposomas libres de colesterol a ciertas concentraciones de cisteína es sólo 2 veces inferior que la del fármaco libre solo. La formulación de liposomas que contienen colesterol es menos citotóxica que la formulación de liposomas libres de colesterol. Los datos también muestran que la cisteína no tiene ningún efecto citotóxico de las células tumorales y ningún efecto sobre la citotoxicidad de la mitomicina C libre. Es también evidente, a partir de los datos que la cisteína aumenta de manera dependiente de la dosis la citotoxicidad de mitomicina C unida a liposoma. Por lo tanto, los efectos citotóxicos observados para las formulaciones liposómicas se deben principalmente a la liberación mediada por cisteína de mitomicina C a partir del conjugado de lípido-DTB-fármaco.

C. Farmacocinética *in vivo*

La farmacocinética *in vivo* de los liposomas que contenían colesterol y la formulación de liposomas libres de colesterol se determinó en ratas. Tal como se describe en el ejemplo 7, los animales se trataron con una única inyección intravenosa en bolo de mitomicina C en forma libre aproximadamente 0,1 mg/ml o incorporada en liposomas en forma del conjugado de lípido-DTB-mitomicina C de acuerdo con la invención. Tras la inyección, se extrajeron muestras de sangre y se analizaron para determinar la cantidad de mitomicina C. Los resultados se muestran en las figuras 13A-13B.

La figura 13A muestra la concentración (μg/ml) de mitomicina C en la sangre de ratas en función del tiempo en horas tras inyección intravenosa. Tal como se observa, la mitomicina C libre (cuadrados rellenos) administrada por vía intravenosa en forma libre se aclara rápidamente de la sangre. La mitomicina C en forma de un conjugado de lípido-DTB-fármaco unido a liposoma permanece en circulación durante un periodo de tiempo sustancialmente más largo. La mitomicina C asociada con liposomas que contienen colesterol (rombos rellenos) y con liposomas libres de colesterol (círculos rellenos) se detectó en la sangre a más de 10 μg/ml durante 20-25 horas.

La figura 13B muestra el porcentaje de dosis inyectada que permanece en la sangre en función del tiempo en horas tras inyección intravenosa de las formulaciones de prueba. Prácticamente ninguna de las dosis de mitomicina C libre (cuadrados rellenos) permanece en la sangre en tiempos superiores a aproximadamente 5 minutos. Sin embargo, a las 20 horas tras la inyección de las formulaciones de liposoma, aproximadamente el 15-18 de porcentaje de la dosis de mitomicina C permanece en circulación. Esto indica que el conjugado de mitomicina C-DTB-lípido permanece estable en el liposoma mientras está en circulación y que se produce una escisión tiolítica mínima en plasma. Por lo tanto, este sistema parece ser compatible con liposomas de larga circulación (liposomas Stealth®) que tienen una vida en sangre prolongada y una acumulación potenciada en tumores.

La reducción en la toxicidad de mitomicina C cuando el fármaco se incorpora en liposomas en forma de un conjugado de profármaco de fármaco-DTB-lípido se ilustra en la figura 14. Los liposomas estaban compuestos por HSPC, mPEG-DSPE y paradiestearoil-DTB-mitomicina C en una relación molar de 90/5/5 (la formulación libre de colesterol descrita anteriormente). Tres dosis de liposomas 10 mg/kg se inyectaron en ratones Balb/c hembra ratones a una dosis de 10 mg de fármaco/kg. Los animales control recibieron mitomicina C libre, a una dosis de 10 mg/kg. El peso de los animales se tomó 3, 7 y 11 días tras la administración de la sustancia de prueba, tal como se muestra en la figura 14. Los animales tratados con mitomicina C en forma libre tuvieron una pérdida significativa de peso corporal y no sobrevivieron pasado el día de prueba 11. Los animales que recibieron mitomicina C en forma de un conjugado de profármaco incorporado en liposomas tuvieron una pérdida mínima en el peso corporal y todos los animales estaban vivos en el día de prueba 19.

En otros estudios, los liposomas preparados tal como se describe en el ejemplo 4 se sometieron a prueba en dos modelos de carcinoma de ratón: un modelo de inoculación en la almohadilla de la pata con M109 con el tamaño del tumor como criterio de valoración, y un modelo de tumor intraperitoneal C26 con la supervivencia como criterio de valoración. Los ratones de prueba se inocularon con células tumorales (ejemplo 8) y posteriormente se trataron con mitomicina C libre o mitomicina C en forma de un conjugado de profármaco incorporado en liposomas.

Para el estudio ilustrado en la figura 15A, siete días tras la inoculación del tumor (células tumorales M109) los ratones se trataron con un compuesto de prueba por vía intravenosa, a una dosis de 2 mg/kg. Una segunda dosis intravenosa se administró 13 días tras la inoculación del tumor. El tamaño de la almohadilla de la pata se midió a intervalos regulares. Los resultados se muestran en la figura 15A para los ratones control dejados sin tratar (cuadrados rellenos) y para los animales tratados con mitomicina C libre (triángulos en blanco) o con la formulación liposómica (HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C; círculos rellenos). El tamaño del tumor de los animales control no tratados aumento de forma continua a lo largo de este periodo de prueba. Los animales tratados con mitomicina C experimentaros un crecimiento tumoral más lento, proporcionando la formulación liposómica una mayor eficacia con respecto a la mitomicina C en forma libre, tal como se demuestra por un tamaño menor de la almohadilla de la pata para los animales tratados con mitomicina C en forma de un conjugado de profármaco incorporado en liposomas.

La figura 15B muestra los resultados de un estudio similar pero con dosis de mitomicina C de 2 mg/kg y 4 mg/kg. El tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, se determinó en función de los días tras la inoculación con células tumorales M109 en la pata de ratones. Los ratones dejados sin tratar (ratones control; (cuadrados rellenos)) tuvieron un aumento continuo en el espesor de la almohadilla de la pata medio. Los ratones tratados con mitomicina C libre (triángulos en blanco) a 2 mg/kg (línea discontinua) o 4 mg/kg (línea continua) en los días 7, 14 y 21, o con liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos) a 2 mg/kg (línea discontinua) o 4 mg/kg (línea continua) en los días 7, 14 y 21 tuvieron perfiles de crecimiento tumoral similares a dosis correspondientes. Sin embargo, los animales tratados con mitomicina C en forma libre tuvieron una tasa de supervivencia más baja, con una tasa de muerte tóxica del 80 % para los animales a los que se administraron dosis de 4 mg/kg de mitomicina C libre. Por lo tanto, la mitomicina C administrada en forma de un conjugado de profármaco incorporado en liposomas ofrece una eficacia similar a la del fármaco libre pero a menor toxicidad. En otro estudio se evaluó el efecto de la administración conjunta de cisteína exógena sobre la formulación liposómica. Los ratones se inocularon con células tumorales M109 y se dejaron sin tratar o se trataron con mitomicina C 6 mg/kg en forma de fármaco libre o conjugado de profármaco liposómico 5 días tras la inoculación. El tratamiento con profármaco liposómico 6 mg/kg se repitió en los días 12 y 19. El tratamiento con MMC libre no se repitió debido a que los ratones no pudieron tolerar más de una inyección de 6 mg/kg. Un grupo de ratones de prueba tratados con el profármaco liposómico también recibieron 5 mg/ratón de cisteína. Los resultados se muestran en las figuras 16A-16B. La figura 16A muestra el tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función de los días tras la inoculación con células tumorales M109 en la pata de ratones. Los ratones control, dejados sin tratar, (cuadrados rellenos) tuvieron un aumento continuo en el espesor de la almohadilla de la pata. Los ratones tratados con liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 6 mg/kg en los días 5, 12, y 19 (círculos rellenos, rombos rellenos) tuvieron una tasa de crecimiento tumoral más lenta que los ratones tratados con mitomicina C libre (triángulos en blanco). La cisteína se administró por vía subcutánea en los días 6-8, 14-16 y 21-23. La administración de cisteína a los ratones tratados con la formulación liposómica (rombos rellenos) proporcionó una mayor eficacia, mostrando estos animales de prueba aumento en espesor de la almohadilla de la pata más lento, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.

La figura 16B muestra el porcentaje de ratones vivos con un tamaño de tumor de almohadilla de la pata inferior a 4 mm, en función de los días tras la inoculación del tumor, para los ratones tratados tal como se expone en la figura 16A. Este diagrama registra como etapas descendentes tipos de acontecimientos: muertes (muertes tóxicas) y medidas de tumor superiores a 4 mm. Todos los ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos) tenían tumores mayores de 4 mm tras aproximadamente el día de prueba 23. Los ratones tratados con la formulación liposómica (círculos rellenos, rombos rellenos) tenían tumores inferiores a 4 mm sin muertes tóxicas durante un periodo de tiempo más largo que aquéllos tratados con el fármaco en forma libre (triángulos en blanco).

En otro estudio, los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con 10^6 células tumorales C26. Cinco días tras la inoculación, los ratones se trataron con 6 mg/kg por vía intravenosa en forma libre o como conjugado de fármaco-DTB-lípido incorporado en liposomas. Los resultados se muestran en la figura 17, en la que se representa gráficamente el porcentaje de supervivencia en función del tiempo tras la inoculación con células tumorales C26 en ratones. Los ratones dejados sin tratar (cuadrados) no sobrevivieron pasado el día de prueba 23. En el día de prueba 40, sólo el 10 % de los ratones tratados con mitomicina C libre 6 mg/kg (triángulos) estaban vivos. Por el contrario, en el día de prueba 40, más del 30 % de los ratones tratados con mitomicina C 6 mg/kg en forma de un profármaco en un liposoma (círculos), y más del 40 % de los ratones tratados con 6 mg/kg (dos dosis) de la formulación liposómica (rombos) estaban vivos. Cabe mencionar que los ratones tratados con la formulación liposómica pudieron tolerar una dosis sustancialmente mayor, por ejemplo, aproximadamente de 2 veces y en algunos casos 3 veces mayor, de mitomicina C que cuando el fármaco estaba en forma libre.

En otro estudio se usó una sublínea de células M109 seleccionadas por su resistencia a múltiples fármacos, células M109R. Los ratones se inocularon con las células resistentes a fármaco de carcinoma M109R y después se trataron en los días 5 y 12 por vía intravenosa con una sustancia de prueba. Los resultados se muestran en las figuras 18-19.

La figura 18 muestra el tamaño de almohadilla de la pata medio, en mm, en función del tiempo tras la inoculación con células M109R tumorales. Los ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos) tenían un aumento continuo en el tamaño del tumor. Los ratones tratados con 8 mg/kg de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos, línea continua) tenían un tamaño de la almohadilla de la pata menor que los ratones tratados con una dosis similar de mitomicina C libre (triángulos en blanco), hasta aproximadamente el día 130. Los ratones tratados con dos dosis de 8 mg/kg de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos, línea discontinua) tuvieron de poco a ningún aumento medible en el tamaño de la almohadilla de la pata a lo largo del periodo de prueba de 168 días.

Las figuras 19A-19B muestran los resultados de ratones de prueba similares pero la dosis de mitomicina C era de 10 mg/kg y la cisteína se administró a uno de los grupos de prueba. La figura 19A muestra el peso medio de los ratones de prueba, en gramos, en función de los días tras la inoculación del tumor, para los ratones dejados sin tratar (cuadrados rellenos), tratados con dos dosis de 10 mg/kg de doxorubicina encerrada en liposomas que tenía un recubrimiento de cadenas de polietilenglicol (Stealth®, triángulos en blanco), tratados con dos dosis de liposomas compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C a 10 mg/kg (círculos rellenos) sin cisteína (círculos rellenos línea continua) o con cisteína 5 mg/ratón (círculos rellenos, línea discontinua). Los ratones tratados con

doxorubicina liposómica tuvieron una pérdida de peso, lo que indicaba que ésta era, en efecto, la dosis máxima tolerada que podían tolerar. Por el contrario, no se observó pérdida de peso con profármaco de MMC liposómica con o sin cisteína.

La figura 19B muestra el espesor de la almohadilla de la pata medio para los animales de prueba. Los ratones tratados con mitomicina C (dos dosis de 10 mg/kg en los días 5 y 12) en forma de liposomas compuestos por función HSPC/mPEG-DSPE/lípido-DTB-mitomicina C (círculos rellenos) con (círculos rellenos, línea discontinua) y sin (círculos rellenos, línea continua) cisteína tuvieron de poco a ningún crecimiento del tamaño de la almohadilla de la pata. De hecho, en una base individual de ratones, 11 de 15 ratones con tumores medibles tuvieron una regresión tumoral completa. Dejados sin tratar (cuadrado en blanco) o tratados con doxorubicina encerrada en liposomas (triángulos en blanco), el espesor de la almohadilla de la pata aumentó. Los datos de este estudio se representan también en la figura 19C como el porcentaje de ratones vivos con un espesor de la almohadilla de la pata inferior a 5 mm en función de los días tras la inoculación del tumor.

Los datos mostrados en las figuras 18-19 indican que la mitomicina C administrada en forma de conjugado de fármaco-lípido incorporado en liposomas puede captarse por células resistentes a múltiples fármacos, y acumularse en las células hasta una cantidad suficiente para la citotoxicidad. Las células M109R no respondieron a doxorubicina encerrada en liposomas (figura 19B), tal como se esperaba para este modelo de carcinoma resistente a fármaco.

A partir de lo anterior son evidentes varios aspectos y características de la invención. Los estudios en el presente documento muestran que la mitomicina C, cuando se formula como un profármaco de lípido-DTB-mitomicina C puede administrarse *in vivo*. Este hallazgo es significativo dado el hecho de que la mitomicina C en forma libre es extremadamente tóxica y, por lo tanto, con frecuencia inadecuada para su uso *in vivo*. Más aún, cuando se administra a animales en forma de un lípido, conjugado de profármaco, la mitomicina C puede administrarse a 2 veces o 3 veces la dosis del fármaco en forma libre. Los estudios en el presente documento también muestran que las células resistentes a múltiples fármacos pueden captar la mitomicina C cuando se administra en forma del conjugado de lípido-DTB-fármaco. La bibliografía de investigación indicaba que varios tumores primarios tienen un nivel aumentado de tiorredoxina, una enzima reductora de disulfuro, con respecto al tejido sano (Powis y col., Free Radical Biology & Med., 29:312 (2000); Engman, L., y col., Bioorganic and Medicinal Chemistry 11:5091, (2000)). El nivel aumentado de tiorredoxina en células tumorales ofrece una sinergia única con el conjugado de mitomicina C descrito en el presente documento, puesto una fuente natural de una enzima reductora se concentra en el tejido diana.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención descrita en el presente documento.

Materiales

Todos los materiales se obtuvieron de proveedores comercialmente adecuados, tales como Aldrich Corporation.

EJEMPLO 1

Síntesis de para-diacildigliceroldithiobenzalcohol (compuesto IV) y orto-diacildigliceroldithiobenzalcohol

A. para-Diacildigliceroldithiobenzalcohol

Esta reacción se ilustra en la figura 1. Se siguió el procedimiento de Snyder, W.R. (Joumal of Lipid Research, 28:949 (1987) para preparar los compuestos II y III.

Un matraz de fondo redondo de 100 ml que contiene 3-mercapto-1,2-propanodiol (**compuesto I**, 1 g, 9,26 mmol) en 5 ml de agua se colocó en un baño de hielo. A este matraz con agitación rápida, se le añadió gota a gota peróxido de hidrógeno (exactamente 0,5 equivalentes en moles, 525 µl, 4,63 mmol) mientras se mantenía la temperatura entre 30-40 ºC. Al final del proceso exotérmico se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente. El agua se sometió a destilación azeotrópica con evaporación rotatoria mediante la adición sucesiva de acetonitrilo en alícuotas e 20 ml. El proceso de adición de acetonitrilo se repitió 3-4 veces o hasta que se eliminó toda el agua, proporcionando un aceite transparente. Tras raspar el matraz con una espátula de metal y enfriar durante la noche a -20 ºC, el producto aceitoso solidificó (**compuesto II**, rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiol)). El sólido calcáreo se secó a vacío sobre P_2O_5. Rendimiento: 630 mg, 63 %. RMN de ^1H (CD_3OD, 360 MHz) δ 2,77, 2,95 (2xd, CH_2OH, 2H), 3,59 (M, SCH_2, 2H), 3,87 (m, CH, 1 H) ppm.

El producto de rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiol) (**compuesto II**) se aciló añadiendo el compuesto (980 mg, 4,6 mmol) a un matraz de fondo redondo de 100 ml secado en el horno y disolviendo en cloruro de metileno seco (40 ml). A esto se añadió ácido esteárico (4,92 g, 17,1 mmol) y 4-toluenosulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (1,38 g, 4,6 mmol) como catalizador y se agitó a temperatura ambiente (25 ºC) durante 20 minutos. Después se pipeteó diisopropilcarbodiimida (3,1 ml, 20 mmmol) y se hizo reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. La CCF sobre sílice GF (10 % de acetato de etilo en hexano) mostró la reacción completa del grupo diol. (rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiol) R_f=0,60; rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiestearoil) R_f=0,35). Se añadieron Amberlyst® A-21,

resina de intercambio iónico ligeramente básica (~3 g) y Amberlyst® 15, resina de intercambio iónico fuertemente ácida (~3 g) se añadieron a la mezcla de reacción. Tras 30 minutos de agitación, se filtraron las resinas y el filtrado se llevó a sequedad. El residuo se recristalizó en isopropanol tres veces (100 ml cada una). El producto sólido, rac-3,3'- ditiobis(1,2-propanodiestearoil) (**compuesto III**), se recogió y se secó sobre P_2O_5. Rendimiento: 70 %, 4,1 g. Punto de fusión 54-55 ºC. RMN de ^1H ($CDCl_3$, 360 MHz) δ 0,86, (t, CH_3, 6H), 1,22 (s, lípido, 56H), 1,48 (m, $CH_2CH_2(CO)O$, 4H), 2,26 (2xt, $CH_2(CO)O$, 4H), 2,87 (d, CH_2S, 2H), 4,03 & 4,22 (2xd, CH_2CH de lípido, 2H), 4,97 (m, $CHCH_2$ de lípido)ppm.

En la etapa siguiente, se disolvió una solución de rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiestearoilo) (**compuesto III**) (2,97 g, 2,33 mmol) en tolueno (30 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se pipeteó cloruro de sulfurilo (1,9 ml, 23,2 mmol) en un matraz y la mezcla se agitó a la temperatura del baño de hielo frío durante 30 minutos. El matraz se puso después a temperatura ambiente y se agitó durante otros 30 minutos. El exceso de cloruro de sulfurilo se eliminó en un evaporador rotatorio. Se añadió una alícuota (20 ml) nueva de tolueno al matraz de reacción y se colocó en un baño de hielo. A esto se le añadió una solución de 4-mercaptobenzalcohol (780 mg, 5,6 mmol) en tolueno con una velocidad lenta. Tras 5 horas de tiempo de reacción, se evaporaron todos los disolventes con evaporación rotatoria hasta sequedad. Se añadió acetato de etilo caliente (10 ml) al matraz de reacción para disolver el sólido y se filtró la materia insoluble. A la solución de acetato de etilo se le añadieron 50 ml de éter para precipitar y el producto sólido (para-diacil-diglicerol-ditiobenzalcohol, **compuesto IV**) se recogió mediante filtración. Este proceso se repitió dos veces. Rendimiento: 75 %.

Para purificar el producto (para-diacil-diglicerol-ditiobenzal-alcohol, **compuesto IV**), se preparó una columna de gel de sílice (20 x 2,5 cm) en cloroformo. La muestra se disolvió en una cantidad mínima de cloroformo y se sometió a cromatografía con la adición de dos fases móviles diferentes. En primer lugar, se eluyó $CHCl_3$ al 100 % (100 ml). Esta fracción contenía la impureza de alcohol ditiobencílico. La confirmación se realizó mediante RMN de ^1H. Después, al cambiar la fase móvil a metanol al 15 % en cloroformo, se recogió el producto puro mediante cromatografía ultrarrápida. Eluyendo 500 ml de CH_3OH:$CHCl_3$ (15:85) se recogió DGTBA puro (una punto mediante CCF). Tras la evaporación de los disolventes, el sólido se liofilizó en t-BuOH y se secó a vacío sobre P_2O_5. La purificación final redujo el rendimiento hasta el 40 %, 1,4 g. RMN de ^1H: ($CDCl_3$, 360MHz) δ 0,86 (t, CH_3, 6H), 1,22 (s, lípido, 56H), 1,48 (m, $CH_2CH_2(CO)O$, 4H), 2,26 (2xt, $CH_2(CO)O$, 4H), 2,87 (d, CH_2S, 2H), 4,03 & 4,22 (2xd, CH_2CH de lípido, 2H), 4,69 (s, CH_2, bz, 2H), 4,97 (m, $CHCH_2$ de lípido), 7,36 &7,56 (d, CH_2, aromático, 4H) ppm.

Se presentaron 5 mg de muestra a un laboratorio para el análisis elemental (Midwest Micro Lab).

Análisis	Teórico	Medido
Carbono	70,93 %	70,67 %
Hidrógeno	10,50 %	10,41 %
Azufre	8,25 %	8,31 %

B. orto-Digliceroldítiobenzalcohol

Una solución de rac-3,3'-ditiobis(1,2-propanodiestearoilo (**compuesto III**) (200 mg, 0,156 mmol) se disolvió en tolueno (30 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se pipeteó cloruro de sulfurilo (39 µl, 0,47 mmol) en el matraz y la mezcla se agitó a la temperatura del baño de hielo temperatura frío durante 30 minutos. El matraz se puso después a temperatura ambiente y se agitó durante otros 30 minutos. El exceso de cloruro de sulfurilo se eliminó con un evaporador rotatorio. Se añadió una alícuota (20 ml) reciente de tolueno al matraz de reacción y se colocó sobre un baño de hielo. A esto se le añadió una solución de 2-mercaptobenzalcohol (48 mg, 35 mmol) en tolueno con una velocidad lenta. Tras 5 horas de tiempo de reacción, se evaporaron todos los disolventes con evaporación rotatoria hasta sequedad. Se añadió acetato de etilo caliente (10 ml) al matraz de reacción para disolver el sólido y se filtró la materia insoluble. A la solución de acetato de etilo, se le añadieron 50 ml de éter para precipitar, y el procuro sólido (orto-diacil-diglicerol-ditiobenzalalcohol) se recogió mediante filtración. Este proceso se repitió dos veces. El sólido se secó a vacío sobre P_2O_5. Rendimiento. 75 %, 190 mg. RMN de ^1H: ($CDCl_3$, 360 MHz) δ 0,86 (t, CH_3, 6H), 1,25 (s, lípido, 56H), 1,58 (m, $CH_2CH_2(CO)O$, 4H), 2,28 (2xt, $CH_2(CO)O$, 4H), 2,91 (d, CH_2S, 2H), 4,14 & 4,35 (2xd, CH_2CH de lípido, 2H), 4,86 (s, CH_2, bz, 2H), 5,26 (m, $CHCH_2$ de lípido), 7,31 (m, aromático, 2H), 7,48 & 7,75 (d, aromático, 2H) ppm.

EJEMPLO 2

Síntesis de para-diacildiglicerolditiobenzal-mitomicina C (compuesto XVIII)

Esta reacción se ilustra en la figura 3A.

Un matraz de fondo redondo de 50 ml se cargó con fosgeno (3,1 mmol) y tolueno (5 ml) y la solución se enfrió hasta 0 ºC. Se preparó una solución de para-diacil-diglicerol-ditiobenzal-alcohol, (**compuesto IV**), preparada tal como se describe en el ejemplo 1, 0,31 mmol) en tolueno (2,5 ml). La solución de alcohol se añadió después gota a gota a la solución de fosgeno. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante la noche. Tras 18 horas, se concentró la solución a vacío para eliminar el fosgeno en exceso. El cloruro de acilo bruto se redisolvió en tolueno (5

ml).

Se preparó una solución de mitomicina C (0,31 mmol), dimetilaminopiridina (0,031 mmol) y DMF (1 ml). A la solución de mitomicina C se le añadió gota a gota la solución de cloruro de acilo. Tras 1 hora, se separó por evaporación el tolueno y se sometió a cromatografía el producto bruto (hexano:acetato de etilo 1:1) sobre sílice. El producto purificado se llevó a t-BuOH (50 ml) y se liofilizó. El producto era un sólido violeta (183 mg, 53 %). R_f = 0,38 (50 % hexano: acetato de etilo); RMN de ^{1}H (360 MHz, $CDCl_3$) δ 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 1,26 (s, 58 H), 1,58 - 1,63 (m, 4H), 1,76 (s, 3H), 2,29 (t, J = 7,6 Hz, 4H), 2,93 - 2,96 (m, 2H), 3,19 (s, 3H), 3,29 (dd, J = 4,7 y 2,9 Hz, 1 H), 3,41 (dd, J = 5,0 y 2,2 Hz, 1 H), 3,48 (dd, J = 13,7 y 2,5 Hz, 1 H), 3,67 (dd, J = 11,5 y 4,7 Hz, 1 H), (ddd, J = 12,2 y 5,8 y 2,5 Hz, 1H), 4,27-4,36 (m, 2H), 4,43 (d, J = 13,3Hz, 1 H), 4,61 (s, 2H), 4,90 (ddd, J = 10,4 y 5,0 y 2,2 Hz, 1 H), 5,00 - 5,12 (m, 3H), 5,26 - 5,30 (m, 1 H), 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 7,9 Hz, 2H); MALDI EM calculado para $C_{62}H_{99}N_4O_{11}S_2Na$: 1164, hallado m/z 1164 (M + Na).

EJEMPLO 4

Preparación de liposomas

A. Liposomas que contienen colesterol

1. Preparación de liposomas

59 mg de HSPC, 14,4 mg de colesterol, 17,4 mg de mPEG-DSPE, y 7,4 mg de para-diestearoil-DTB-mitomicina C (relación molar de 60/30/5/5) se añadieron a 1 ml de etanol deshidratado a 60-65 ºC y se mezclaron hasta disolverse, aproximadamente 10 minutos.

Un medio de hidratación compuesto por histidina 10 mM y NaCl 150 mM en agua destilada se calentó hasta 70 ºC.

La solución de lípido caliente se añadió rápidamente al medio de hidratación calentado (63-67 ºC), mezclando, para formar a suspensión de liposomas que tenía tamaños heterogéneos. La suspensión se mezcló durante una hora a 63-67 ºC.

2. Extrusión

Los liposomas se dimensionaron al diámetro de partícula medio deseado mediante extrusión controlada a través de cartuchos de filtro de policarbonato alojados en recipientes de acero inoxidable recubiertos por teflón. La suspensión de liposomas se mantuvo a 63-65 ºC a lo largo de todo el proceso de extrusión, un periodo de 6-8 horas.

3. Diafiltración

El etanol se eliminó de la suspensión de liposomas mediante diafiltración. Se preparó una solución de histidina/cloruro de sodio disolviendo histidina (10 mM) y cloruro de sodio (150 mM) en agua estéril. El pH de la solución se ajustó a aproximadamente 7. La solución se filtró a través de un filtro de 0,22 μm Durapore. La suspensión de liposomas se diluyó en aproximadamente una relación de 1:1 (v/v) con la solución de histidina/cloruro de sodio y se diafiltró a través de un ultrafiltro de fibra hueca de polisulfona. Se realizaron ocho intercambios de volumen frente a la solución de histidina/cloruro de sodio para eliminar el etanol. La temperatura de fluido de proceso se mantuvo a aproximadamente 20-30 ºC. El tiempo de diafiltración total fue de aproximadamente 4,5 horas.

4. Esterilización por filtración

La suspensión de liposomas se calentó hasta 33-38 ºC y se filtró a través de un filtro de polietersulfona de 0,2 μm Gelman Supor. El tiempo de filtración total fue de aproximadamente 10 minutos.

Después de cada etapa de procesamiento (hidratación, extrusión, diálisis y filtración) se determinaron mediante HPLC la concentración de lípido y la concentración de conjugado/fármaco. El tamaño de partícula de liposoma se midió mediante dispersión de luz dinámica y se midió la cantidad de mitomicina C “libre”, no unida en el medio de suspensión externo.

	Conjugado de lípido-DTB-MMC[1,2] (μg/ml)	Lípido (mg/ml)	Relación conjugado/lípido	Tamaño de liposoma (nm)		MMC libre[2] (%)
				90°	30°	
Tras la hidratación	699	12,50	56	-	-	2
Tras la extrusión	369	8,49	43	105	186	4

(continuación)

	Conjugado de lípido-DTB-MMC[1,2] (μg/ml)	Lípido (mg/ml)	Relación conjugado/lípido	Tamaño de liposoma (nm)		MMC libre[2] (%)
				90°	30°	
Tras la diálisis	311	7,78	40	-	-	0
Tras la filtración	315	7,22	44	103	120	0
[1]Conjugado = compuesto XVIII, para-diestearoil-DTB-mitomicina C [2]MMC = mitomicina C						

B. Formulación de liposomas libres de colesterol

Los liposomas se prepararon tal como se describió anteriormente con una composición de lípido de HSPC, mPEG-DSPE y para-diestearoil-DTB-mitomicina C en un relación molar de 90/5/5. Específicamente, se disolvieron en 1 ml etanol 88,5 mg de HPSC, 17,9 mg de mPEG-DSPE (PEG MW 2000 Daltons) y 7,3 mg del conjugado. El tamaño de liposoma, la concentración de lípido y de fármaco y la concentración de mitomicina C libre en el medio de suspensión externo se determinaron tras cada etapa de procesamiento.

	Conjugado de lípido-DTB-MMC[1,2] (μg/ml)	Lípido (mg/ml)	Relación conjugado/lípido	Tamaño de liposoma (nm)		MMC libre[2] (%)
				90°	30°	
Tras la hidratación	525	10,94	48	-	-	3
Tras la extrusión	466	9,95	47	85	110	6
Tras la diálisis	404	8,35	48	-	-	0
Tras la filtración	378	7,92	48	82	93	0
[1]Conjugado = compuesto XVIII, para-diestearoil-DTB-mitomicina C [2]MMC = mitomicina C						

EJEMPLO 5

Condiciones de HPLC para la caracterización *in vitro*

Liposomas preparados tal como se describe en los ejemplos 4A-4B se diluyeron en 0,6 M octailglucopiranósido. Los liposomas se incubaron en presencia de cisteína 150 mM a 37 ºC. Se extrajeron muestras en los tiempos cero, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas. Se analizó un volumen de 20 μl mediante HPLC usando una columna Water Symmetry C8 de 3,5 x 5 cm. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y el gradiente de la fase móvil tal como sigue:

inicio	10 % de MEOH	90 % de $NaPO_4$ 10 mM, pH=7
5 min.	25 % de MeOH	75 % de$NaPO_4$ 10 mM, pH=7
10 min	25 % de MEOH	75 % de $NaPO_4$ 10 mM, pH=7
15 min	100 % de MeOH	--
25 min	100 % de MeOH	--
30 min	10 % de	90 % de $NaPO_4$ 10 mM, pH=7
35 min	10 % de MEOH	90 % de $NaPO_4$ 10 mM, pH=7

EJEMPLO 6

Estudios de citotoxicidad

A. Preparación de liposomas

Liposomas, preparados tal como se describe en el ejemplo 4A-4B, estaban compuestos por HSPC/mPEG-DSPE/diestearoil-DTB-mitomicina C (90/5/5) o HSPC/colesterol/mPEG-DSPE/diestearoil-DTB-mitomicina C (90/45/5/5). Las preparaciones de liposomas se esterilizaron por filtración a través de membranas de celulosa de 0,45 μm y no se redujo su tamaño a través de extrusión. Tras la formación de liposomas, se determinó la

concentración de mitomicina C mediante absorbancia a 360 nm en liposomas solubilizados mediante dilución de 10-20 veces en isopropanol y se determinó la concentración de fosfolípidos mediante ensayo de fosfato inorgánico.

Los liposomas que contienen colesterol tenían un diámetro promedio de 275 ± 90 nm. Los liposomas libres de colesterol tenían un diámetro promedio de 150 ± 50 nm. La concentración de fosfolípidos en ambas formulaciones de liposoma fue de 10 μM/ml y la concentración de mitomicina C en ambas formulaciones fue de 120 μg/ml.

B. Ensayo de quimiosensibilidad y determinación de la tasa de crecimiento

El efecto citotóxico de mitomicina C libre o mitomicina C en forma de un conjugado de diestearoil-DTB-mitomicina C incorporado en liposomas se sometió a ensayo colorimétrico mediante un procedimiento de tinción con azul de metileno descrito anteriormente (Horowitz, A.T. y col., Biochim. Biophys. Acta, 1109:203-209 (1992)) con ligeras modificaciones. Tras completarse el ensayo, las células se fijaron y se evaluaron usando el ensayo de tinción con azul de metileno.

En el ensayo, 1500 células de carcinoma de ratón M109 de cultivos con crecimiento exponencial en alícuotas de 200 μl (medio RPMI-1640 + 10 % de suero bovino fetal) se sembraron en placa en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Tras 20 horas en cultivo, durante lo cual las células se unieron y se reanudó el crecimiento, se añadieron a cada pocillo 20 μl de las formulaciones de prueba (mitomicina C libre o formulaciones de liposoma). Para cada aumento de 10 veces en la concentración de fármaco, se sometieron a prueba cuatro puntos de concentración de fármaco. Cada prueba se realizó en pocillos por triplicado y en dos placas paralelas. Las células se trataron de forma continua durante 72 horas.

Tras el periodo de tratamiento de 72 horas, se fijaron los cultivos mediante la adición de 50 μl de glutaraldehído al 2,5 % a cada pocillo durante 10 minutos. Las placas se lavaron tres veces con agua desionizada, una vez con 0,1 M tampón borato 0,1 M (pH 8,5) y después se tiñeron durante 60 minutos con 100 μl de azul de metileno (1 % en tampón borato 0,1 M, pH 8,5) a temperatura ambiente (20-25 ºC). Las placas se enjuagaron en cinco baños de agua desionizada para eliminar el colorante no unido a células y después se seó. El colorante se extrajo con 200 μl de HCl 0,1 N durante 60 minutos a 37 ºC y se determinó la densidad óptica usando un espectrofotómetro de microplacas.

El número de células determinado contando las células con un hemocitómetro estaba bastante correlacionado con la absorbancia espectrofotométrica. La densidad de siembra en placa de células inicial se seleccionó para garantizar una relación lineal entre el número de células y la absorbancia al final del estudio. En cada estudio, se fijaron seis pocillos antes de añadirse el fármaco para determinar la absorbancia promedio inicial. Este valor se usó para calcular la tasa de crecimiento (GR) y los tiempos de duplicación (DT) de células control y tratadas con fármaco usando la siguiente ecuación: $DT = \ln 2/\ln[(OD_t/OD_c)/h]$; en la que DT = tiempo de duplicación en horas; OD_t = densidad óptica de pocillo de prueba al final del estudio; OD_c = densidad óptica de pocillo control al inicio del estudio; h = duración de incubación en horas.

La tasa de crecimiento se calculó como GR = (ln 2/DT). El porcentaje de inhibición del crecimiento o porcentaje de tasa de crecimiento del control se obtuvo dividiendo la tasa de crecimiento de células tratadas con fármaco entre la tasa de crecimiento de las células control, no tratadas. La concentración de fármaco que provocó una inhibición del 50 % de la tasa de crecimiento del control (CI_{50}) se calculó mediante la interpolación de los dos valores más próximos de la curva de inhibición del crecimiento.

La mitomicina C se sometió a ensayo en el intervalo de 10^{-8} - 10^{-5} M. Las formulaciones liposómicas unidas con conjugado se sometieron a ensayo en el intervalo de 10^{-8} - 3 X 10^{-5} M. Para estudios de interacción se añadió cisteína (SIGMA, St. Louis, MO) junto con la mitomicina C o formulaciones de liposoma hasta una concentración final de 150, 500 ó 1000 μM.

Los resultados se muestran en la tabla 1 y en las figuras 10, 11A-11B y 12.

EJEMPLO 7

Estudio farmacocinético *in vivo*

A. Formulaciones de liposoma

Se prepararon liposomas que contienen colesterol y liposomas libres de colesterol tal como se describe en el ejemplo 5A y 5B.

Se preparó una solución de mitomicina C en forma libre disolviendo 11,9 mg de mitomicina C en 119 μl de etanol. Tras la disolución, se añadieron aproximadamente 11,8 μl de una solución de histidina 10 mM/solución salina 150 mM. Antes de su uso, se diluyó la solución de mitomicina C hasta 100 μg/ml con la solución de histidina/solución salina y se filtró.

B. Animales

Se aleatorizaron ocho ratas en grupos de tratamiento tal como sigue:

Rata Nº	Peso (mg)	Formulación	Conc. de MMC (mg/ml)	Dosis (ml)	Dosis (mg/kg)
1	262,9	liposomas con col.	0,088	1,5	0,50
2	268,2	liposomas con col.	0,088	1,5	0,49
3	264,0	liposomas libres de col.	0,106	1,5	0,53
4	238,1	liposomas libres de col.	0,106	1,5	0,67
5	226,0	MMC libre	0,1	2,26	0,66
6	232,0	MMC libre	0,1	2,32	0,88
7	250,0	MMC libre	0,1	2,60	0,80
8	263,0	MMC libre	0,1	2,63	0,59

Se administró una única inyección intravenosa de la formulación de prueba como una dosis en bolo. Se extrajeron muestras de sangre de cada animal en los siguientes tiempos tras la inyección: 30 segundos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas. La cantidad de mitomicina C en las muestras de sangre se determinó mediante el procedimiento de HPLC indicado a continuación. Se preparó una solución de yodoacetamina 200 mM poniendo 199,3 mg de yodoacetamida en 5,1 ml de EDTA al 7,5 %. Se pusieron 15 µl de la solución de yodoacetamida 200 mM en cada muestra de sangre de 1 µl.

C. Procedimiento de HPLC para medir mitomicina C en plasma

1. Preparación de solución

Se preparó un tampón acuoso que contenía fosfato de amonio 10 mM, pH=7 colocando 1,321 g de fosfato de amonio en un matraz volumétrico de 1 l lleno de agua desionizada. La mezcla se agitó y el pH se ajustó a 7,0 con ácido o-fosfórico. El tampón se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 µm antes de su uso.

Se mezclaron una fase móvil de metanol y el tampón acuoso a través de un programa de gradiente usando una bomba binaria de Waters Alliance.

2. Preparación de solución patrón y muestras de control de calidad

Se prepararon dos pesos separados de mitomicina C y conjugado de mitomicina C como patrones y muestras de control de calidad. Se pesaron un mg de mitomicina C y de conjugado de mitomicina C y se disolvieron en 1 ml de diluyente (20 % de cloroformo y 80 % de mezcla de metanol) por separado. La concentración de la solución madre para ambos compuestos fue de 1 mg/ml. Se realizaron varias diluciones en diluyente para obtener concentraciones de desde 5 µg/ml hasta 100 µg/ml para el patrón y muestras de control de calidad.

A una alícuota de 0,1 ml de plasma de rata se le añadieron adiciones de volúmenes apropiados (10 µl-50 µl) de disoluciones patrón de mitomicina C y conjugado de mitomicina C. Los intervalos de concentración fueron de 0,05-5,0 µg/ml y 0,1-5 µg/ml para mitomicina C y conjugado de mitomicina C, respectivamente. El volumen final se ajustó a 1 ml con metanol. Se siguió un procedimiento similar para preparar muestras de control de calidad. Las concentraciones de las muestras de control de calidad fueron 0,1, 0,5 y 5 µg/ml para mitomicina C y 0,1, 1 y 5 µg/ml para el conjugado de mitomicina C en plasma de rata. Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 300 µl de sobrenadante a viales para HPLC que contenían 300 µl de inserto para inyección.

3. Preparación de muestras

Se desnaturalizaron 100 µl de muestra de plasma con 900 µl de metanol seguido de centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm. Se transfirió una alícuota de 300 µl de sobrenadante a un vial para HPLC que contenía un inserto de 300 µl para inyección.

4. Condiciones cromatográficas

Se usó una columna Supelco® C-8, 5 µ, 4,6 mm x 5 cm. La fase móvil A era fosfato de amonio 10 mM, pH 7. La fase móvil B era metanol. La velocidad de flujo era de 1 ml/min y la detección fue mediante UV a 360 nm. El volumen de inyección fue de 40 µl y el tiempo de pase típico fue de 15 minutos. El programa de gradiente fue tal como sigue:

Tiempo (minutos)	Cantidad de fase móvil A (%)	Cantidad de fase móvil B (%)
0	90	10
4	70	30
8	0	100
12	90	10
15	90	10

5. Ensayo y cálculos

Se inyectaron los patrones de linealidad preparados (seis niveles de concentración) desde concentración baja hasta alta. Las muestras de control de calidad y de plasma se inyectaron entonces para su análisis.

Se determinaron el área de pico y los tiempos de retención mediante el sistema PE-Nelson Turbochrom (Versión 4.1). Las concentraciones de mitomicina C y conjugado de mitomicina C se calcularon usando un programa de regresión lineal. La linealidad del procedimiento se evaluó usando respuestas patrón de seis niveles de concentración. Los datos se ajustaron a la ecuación de regresión lineal y=B*x + A con un factor de ponderación de $1/x^2$. La precisión y la exactitud del procedimiento se evaluaron a partir de las concentraciones calculadas de nuevo de los patrones así como a partir de las muestras de control de calidad.

Los resultados se muestran en las figuras 13A-13B.

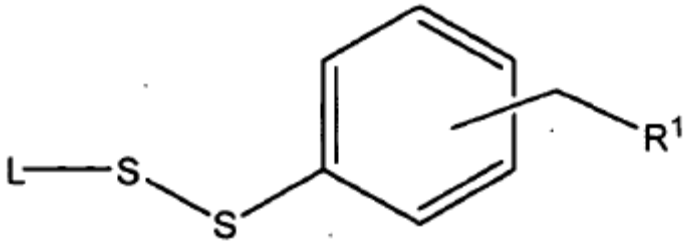
EJEMPLO 8

Estudios *in vivo*

Se mantuvieron ratones BALB/c hembra de 10 semanas de edad en una instalación libre de patógenos específica. Las células M109 o células M109R se hicieron crecer en suspensión *in vitro*. Se inyectó a los ratones en la almohadilla de la pata trasera derecha 50 µl (10^6 células). El espesor de la almohadilla de la pata se midió con calibres hasta que se completó el estudio, cuando se sacrificaron los ratones, se registró el número final de tumores, y se seccionaron las almohadillas de la pata control e inoculadas con tumor al nivel del tobillo y se pesaron. El peso del tumor se estimó como la diferencia entre el peso de la almohadilla de la pata normal y que portaba tumor. La significación estadística de diferencias en la incidencia final de tumores por grupo se analizó mediante tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher. Los resultados se muestran en las figuras 15A-15B y las figuras 16A-16B, la figura 18, las figuras 19A-19C.

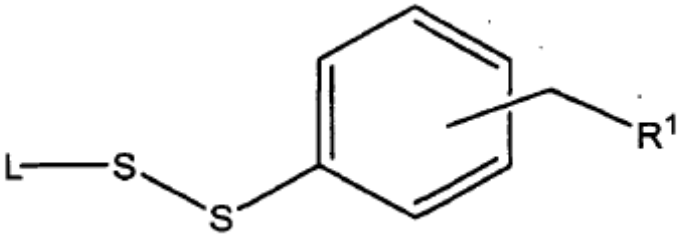
REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende liposomas formados por un lípido formador de vesículas y de entre el 1 y el 30 por ciento en moles de un conjugado que tiene la fórmula general:



en la que L es un resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica, R^1 es mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo, y en la que la orientación del grupo CH_2R^1 se selecciona entre la posición orto y la posición para, para la fabricación de un medicamento para administrar mitomicina C *in vivo* para tratar un tumor resistente a múltiples fármacos.

2. Una composición que comprende liposomas formados por un lípido formador de vesículas y de entre el 1 y el 30 por ciento en moles de un conjugado que tiene la fórmula general:

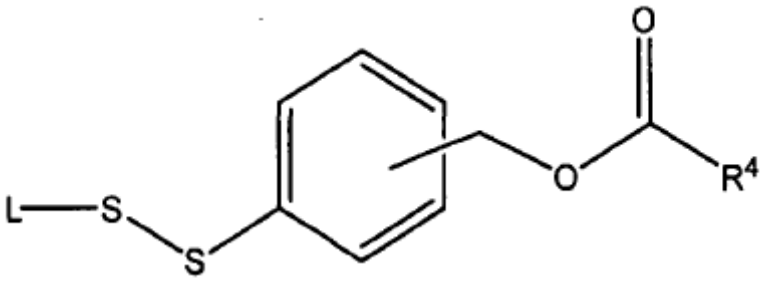


en la que L es un resto hidrófobo adecuado para la incorporación en una bicapa lipídica liposómica, R^1 es mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo, y en la que la orientación del grupo CH_2R^1 se selecciona entre la posición orto y la posición para, para su uso en la administración de mitomicina C *in vivo* para tratar un tumor resistente a múltiples fármacos.

3. Una composición para su uso o uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, estando la mitomicina C covalentemente unida mediante un enlace uretano.

4. Una composición para su uso o uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, seleccionándose L del grupo que consiste en colesterol, un diacilglicerol y un fosfolípido.

5. Una composición para su uso o uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo dicho conjugado mitomicina C covalentemente unida al resto ditiobencilo para formar un conjugado que tiene la estructura:



en la que R^4 representa un residuo de mitomicina C.

6. Una composición para su uso o uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 5, formando un resto de amina secundaria de R^4 un enlace uretano entre el ditiobencilo y la mitomicina C.

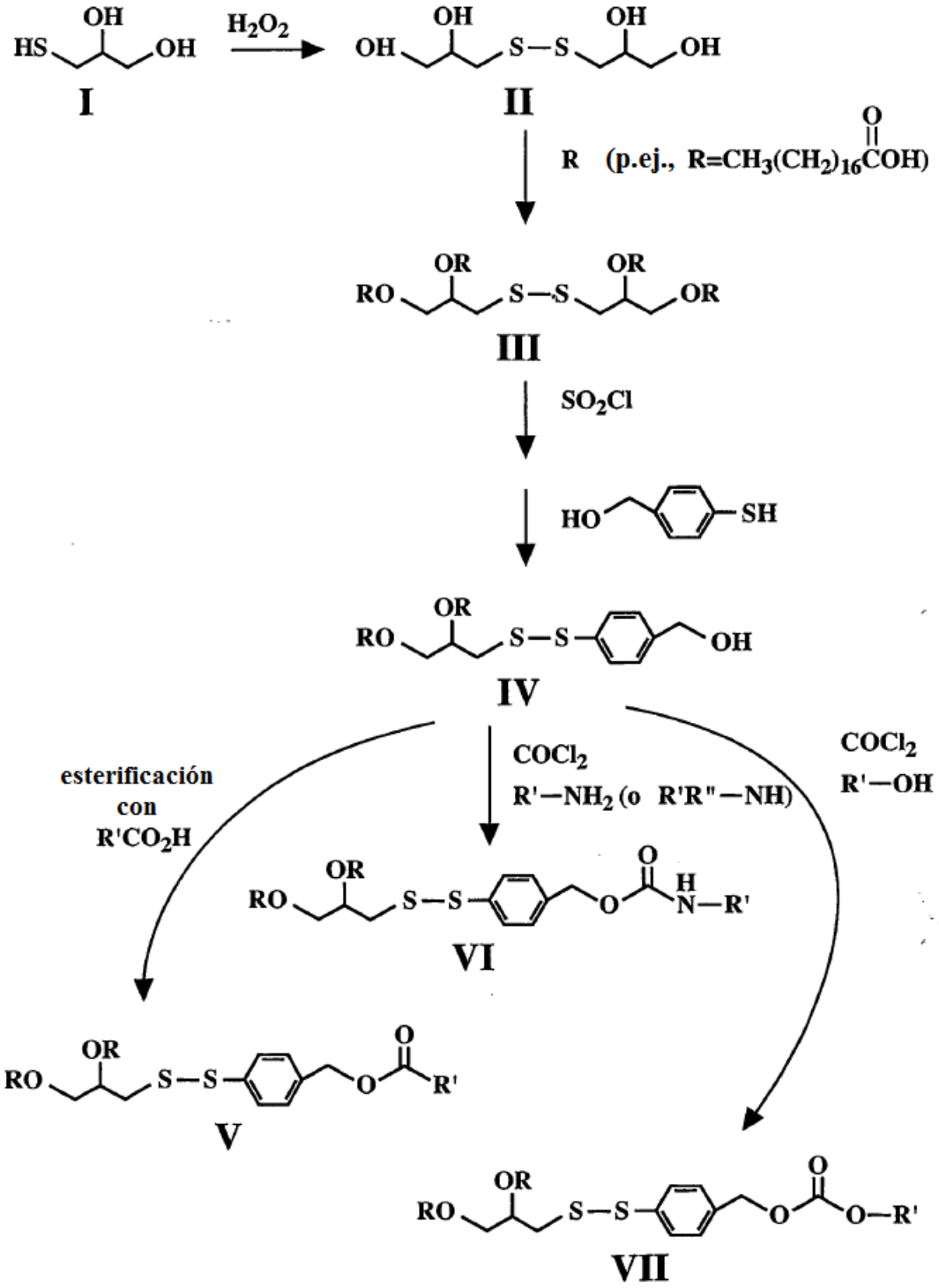

OH
HS
OH
I
H_2O_2
OH
OH
S—S
OH
OH
II
R (p.ej., R=$CH_3(CH_2)_{16}$COH)
OR
RO
S—S
OR
OR
III
SO_2Cl
HO
SH
OR
RO
S—S
OH
IV
$COCl_2$
R'—NH_2 (o R'R"—NH)
esterificación
con
R'CO_2H
$COCl_2$
R'—OH
OR
RO
S—S
O
H
N—R'
VI
OR
RO
S—S
O
R'
V
OR
RO
S—S
O
O
O—R'
VII

Fig. 1

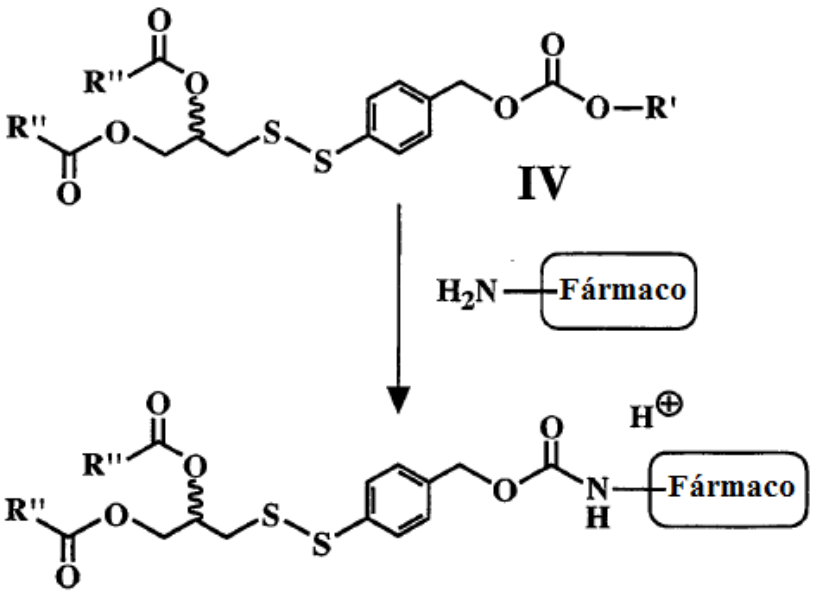


Fig. 2A

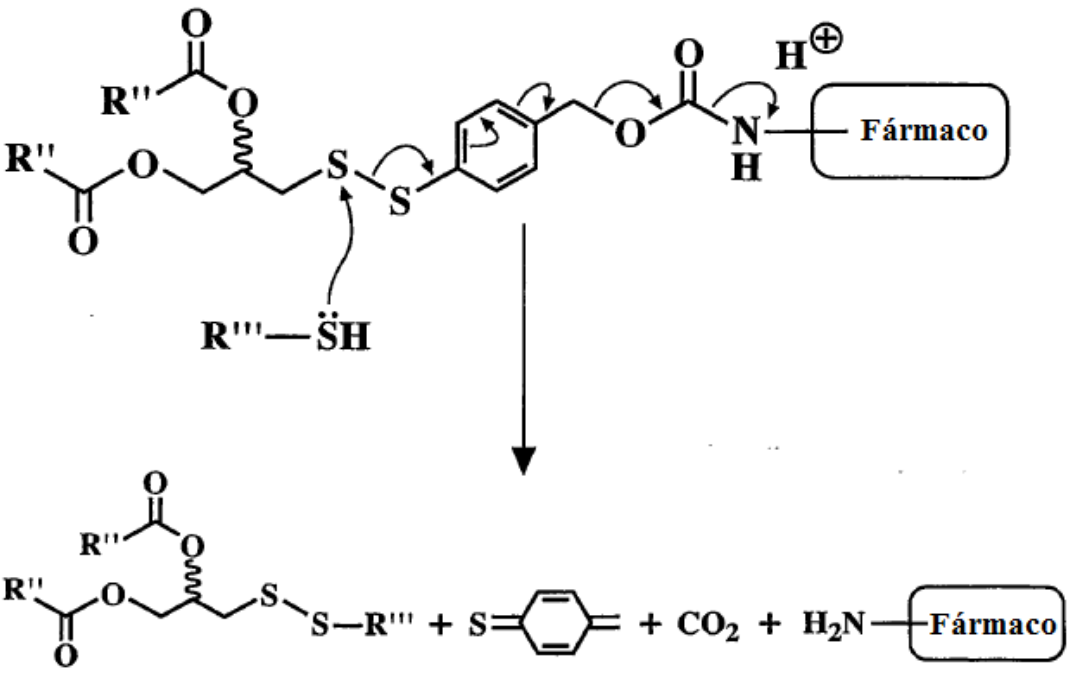


Fig. 2B

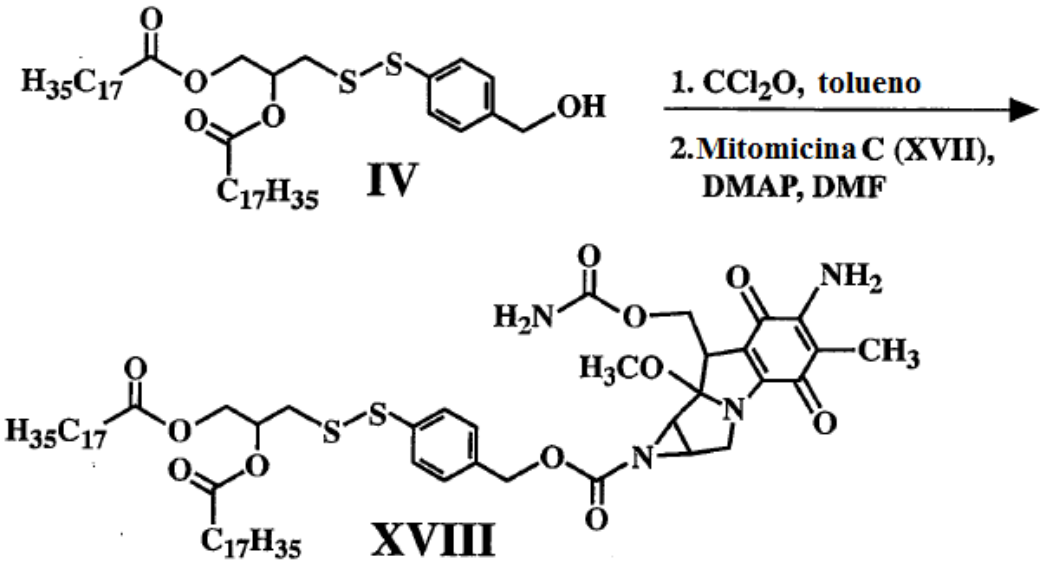

1. CCl2O, tolueno
2. Mitomicina C (XVII), DMAP, DMF
IV
XVIII

Fig. 3A

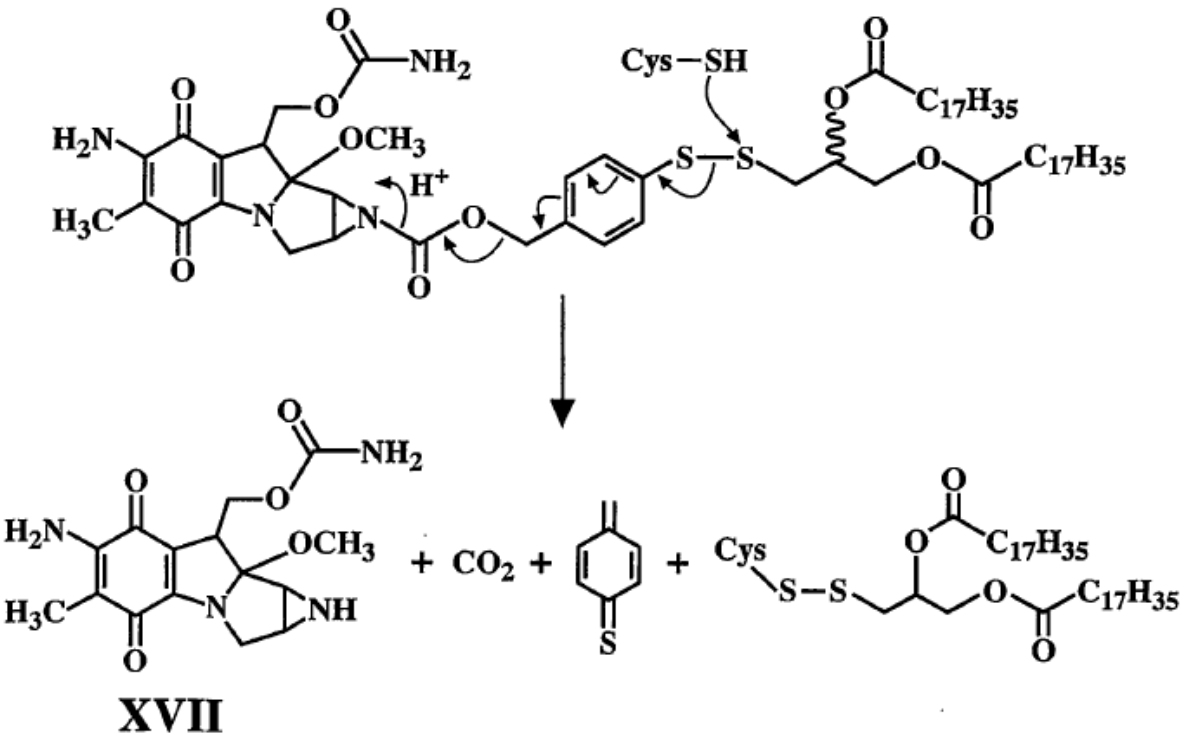

Cys—SH
H+
+ CO2 +
+
XVII

Fig. 3B

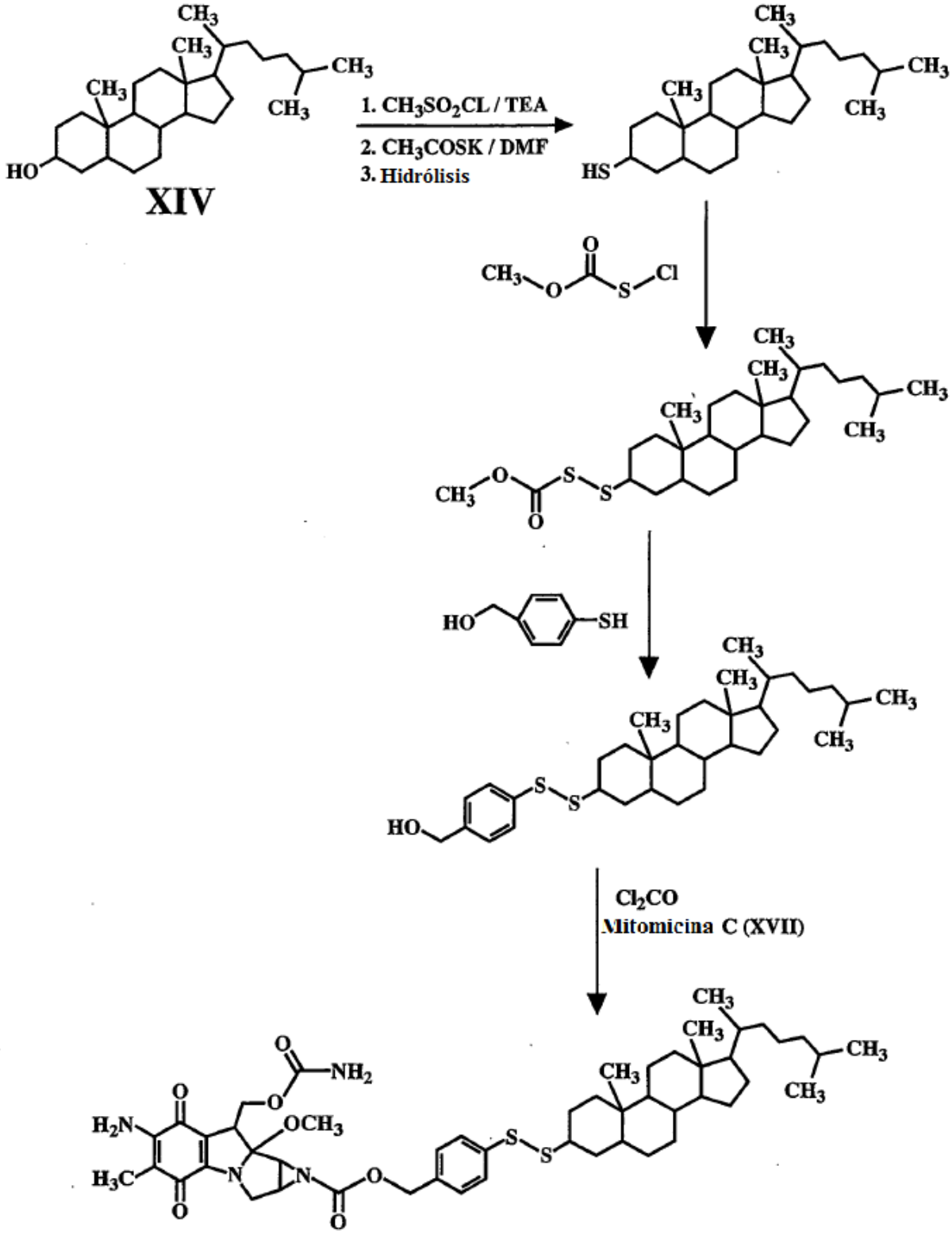

XIV
1. CH_3SO_2CL / TEA
2. CH_3COSK / DMF
3. Hidrólisis
Cl2CO
Mitomicina C (XVII)

Fig. 4

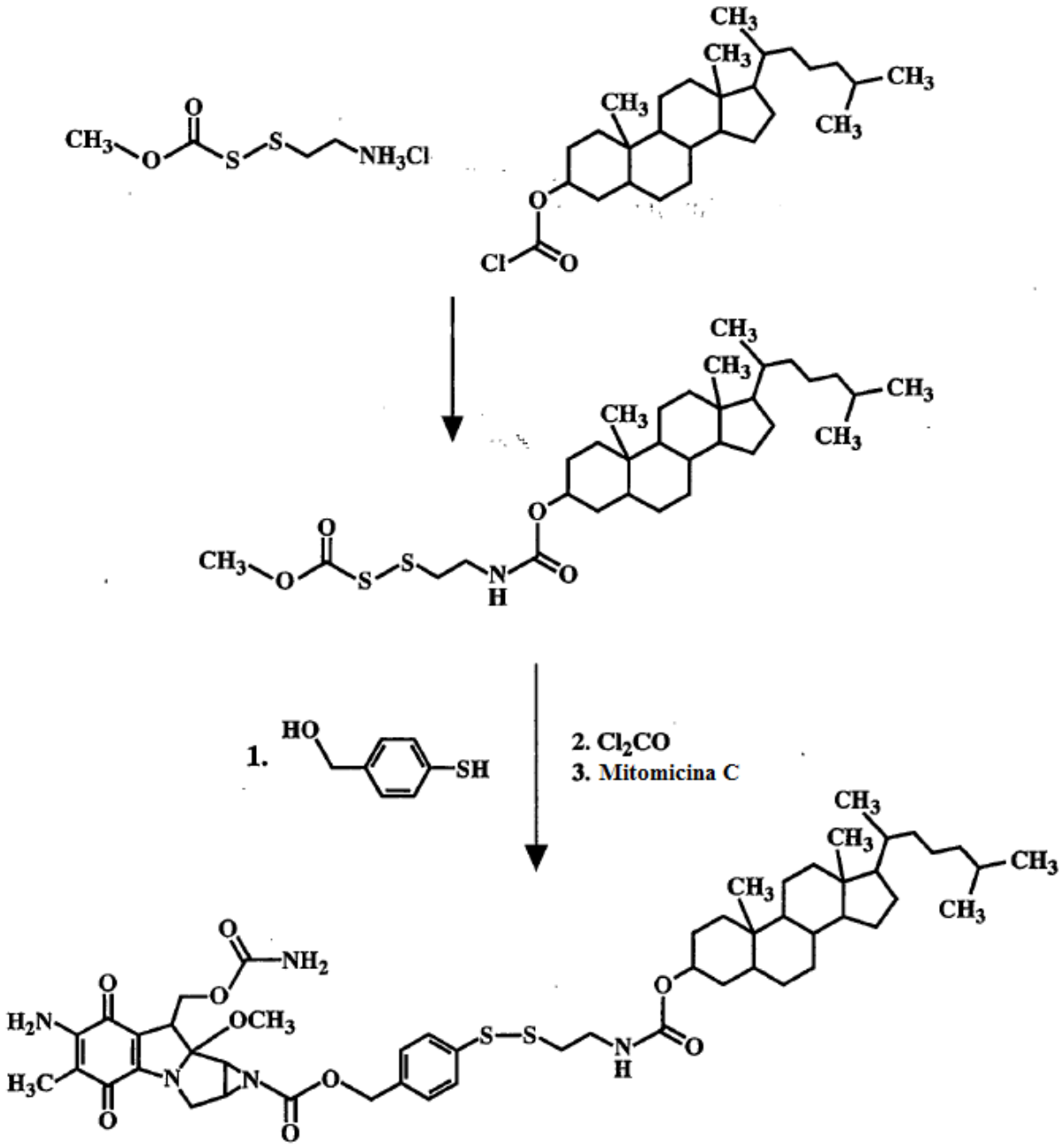


Fig. 5

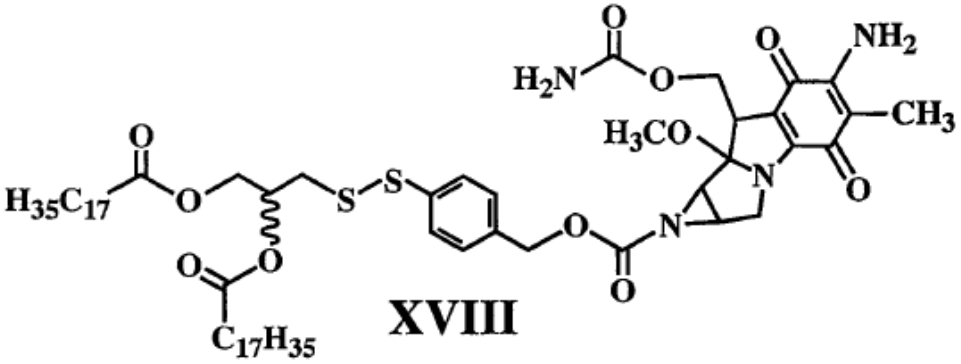


Fig. 6A

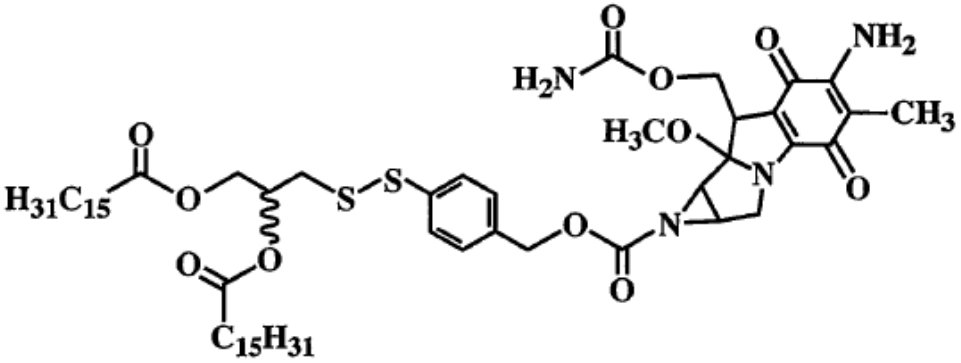


Fig. 6B

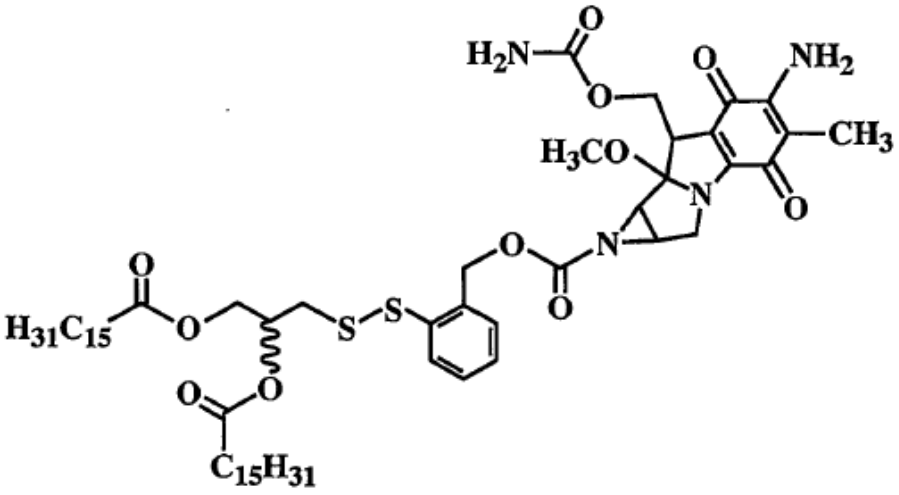


Fig. 6C

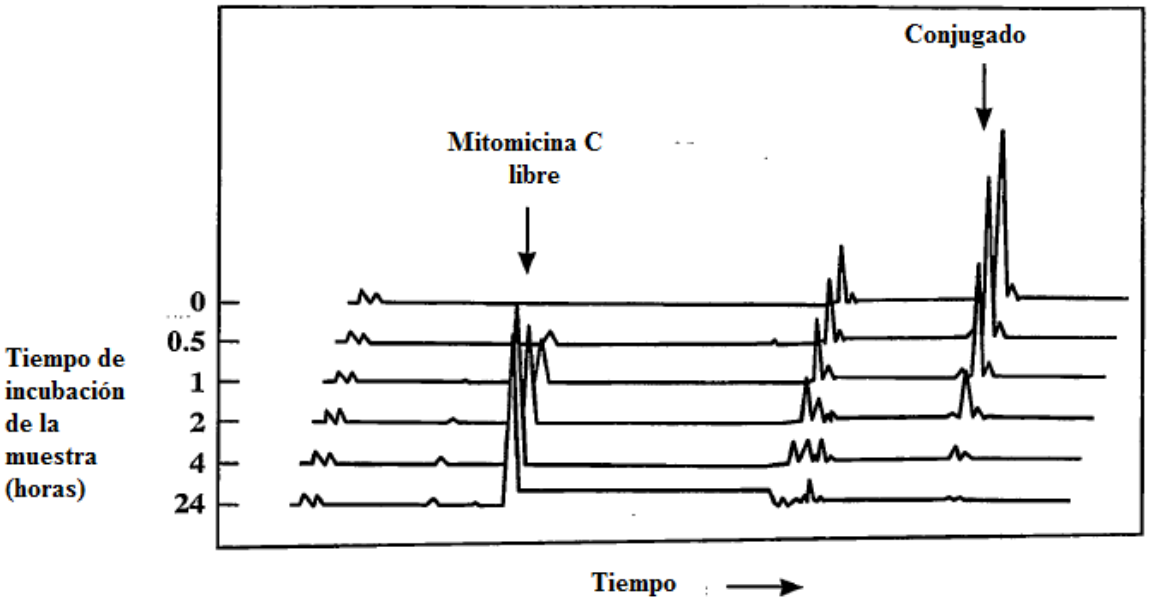

Conjugado
Mitomicina C libre
Tiempo de incubación de la muestra (horas)
0
0.5
1
2
4
24
Tiempo

Fig. 7A

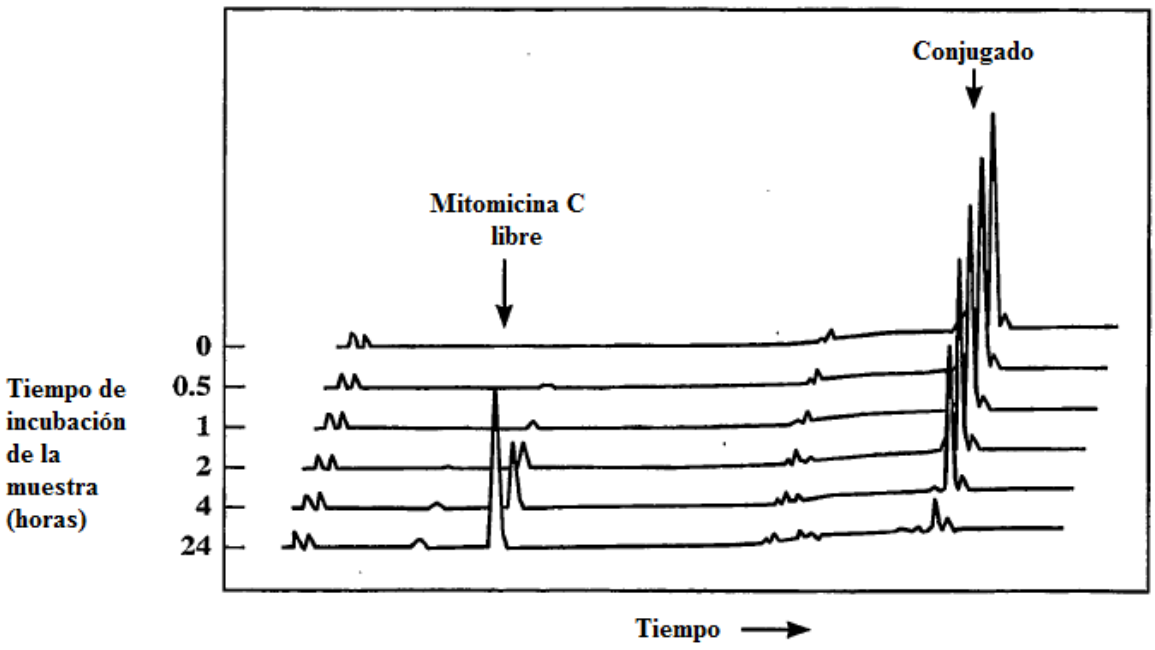

Conjugado
Mitomicina C libre
Tiempo de incubación de la muestra (horas)
0
0.5
1
2
4
24
Tiempo

Fig. 7B

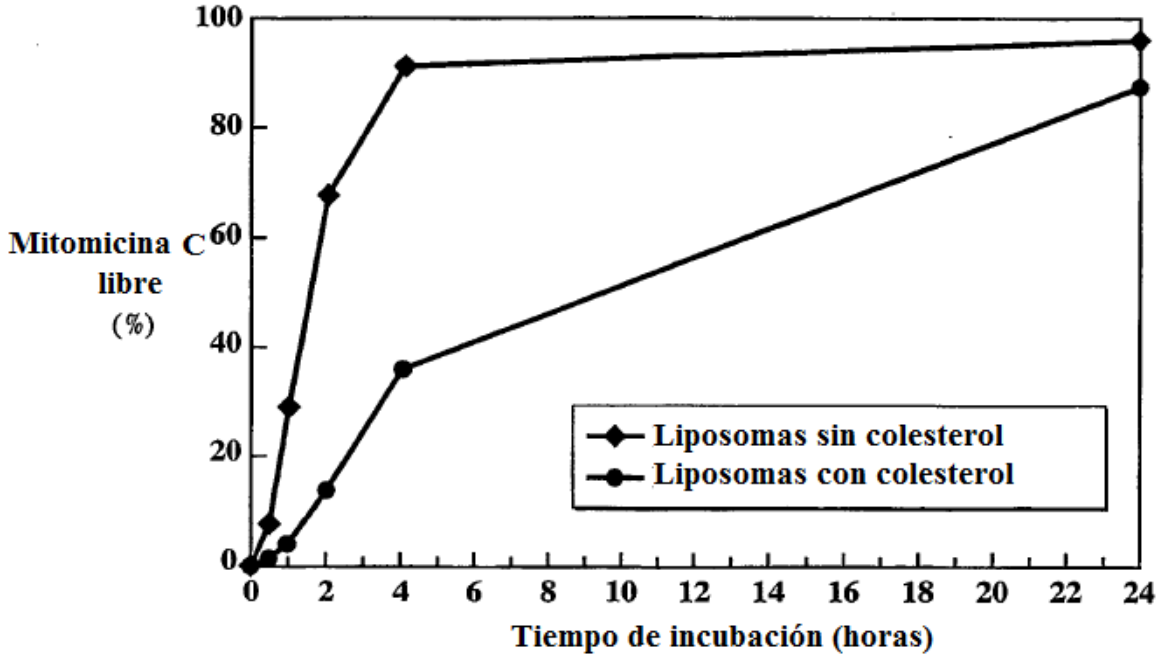

Mitomicina C libre (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tiempo de incubación (horas)
Liposomas sin colesterol
Liposomas con colesterol

Fig. 8

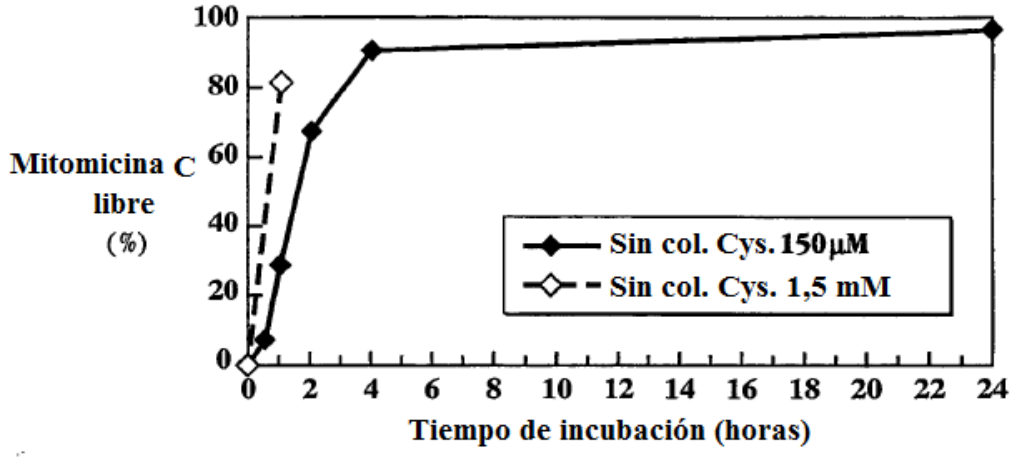

Mitomicina C
libre
(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tiempo de incubación (horas)
Sin col. Cys. 150µM
Sin col. Cys. 1,5 mM

Fig. 9A

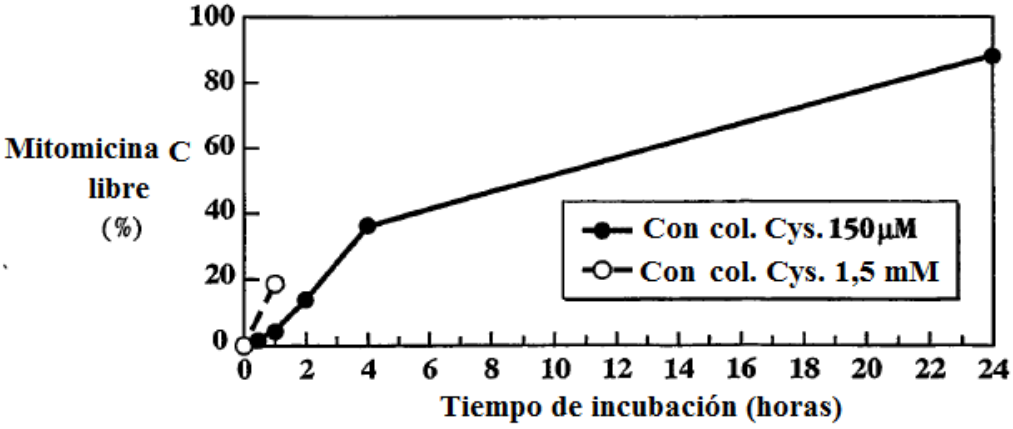

Mitomicina C
libre
(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tiempo de incubación (horas)
Con col. Cys. 150µM
Con col. Cys. 1,5 mM

Fig. 9B

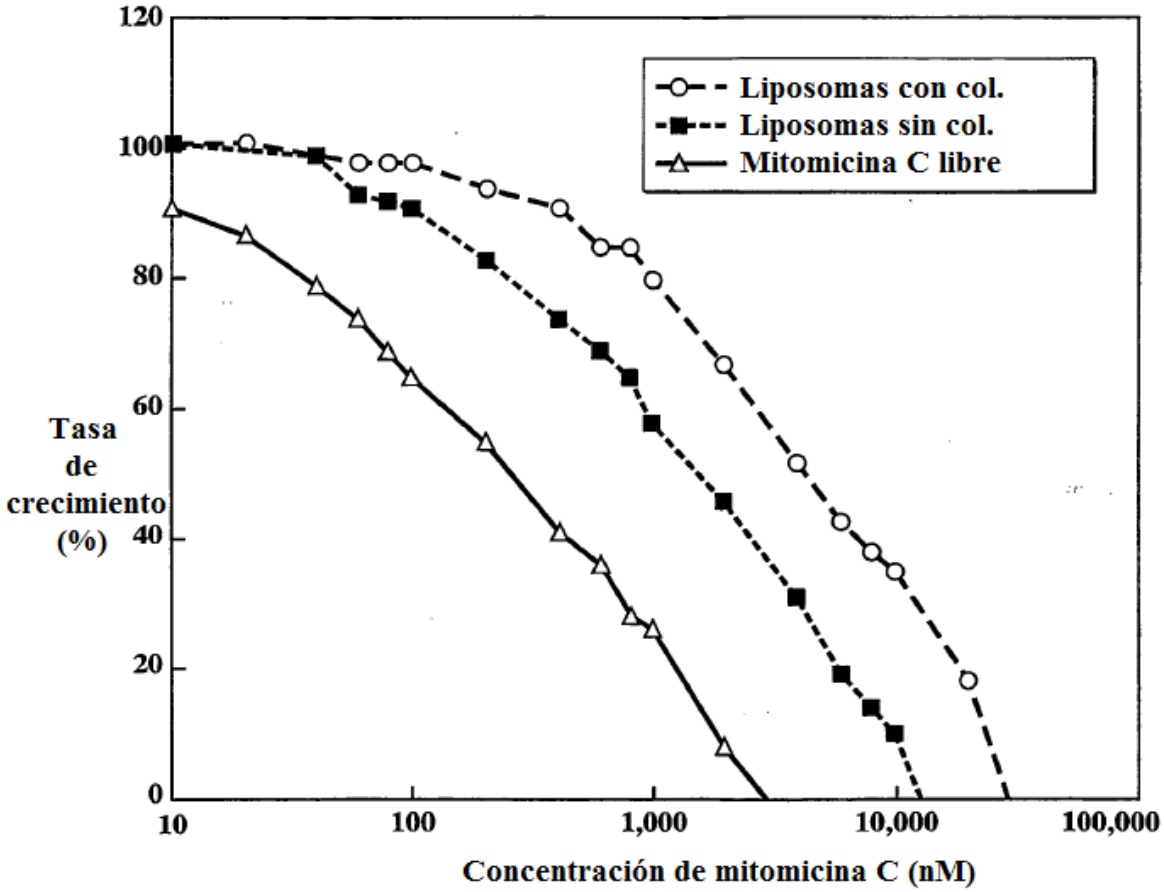

120
100
80
60
40
20
0
Tasa de crecimiento (%)
10
100
1,000
10,000
100,000
Concentración de mitomicina C (nM)
Liposomas con col.
Liposomas sin col.
Mitomicina C libre

Fig. 10

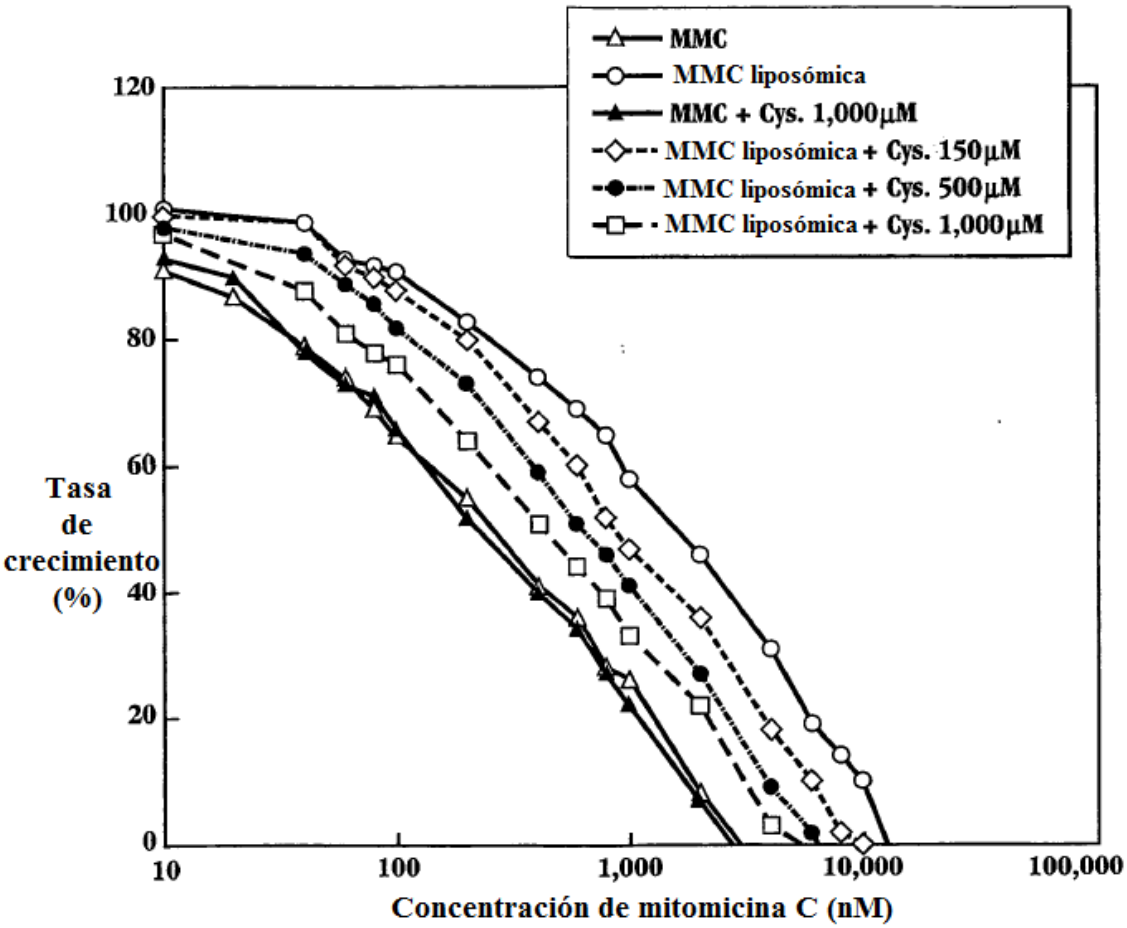

MMC
MMC liposómica
MMC + Cys. 1,000µM
MMC liposómica + Cys. 150µM
MMC liposómica + Cys. 500µM
MMC liposómica + Cys. 1,000µM
120
100
80
60
40
20
0
Tasa de crecimiento (%)
10
100
1,000
10,000
100,000
Concentración de mitomicina C (nM)

Fig. 11A

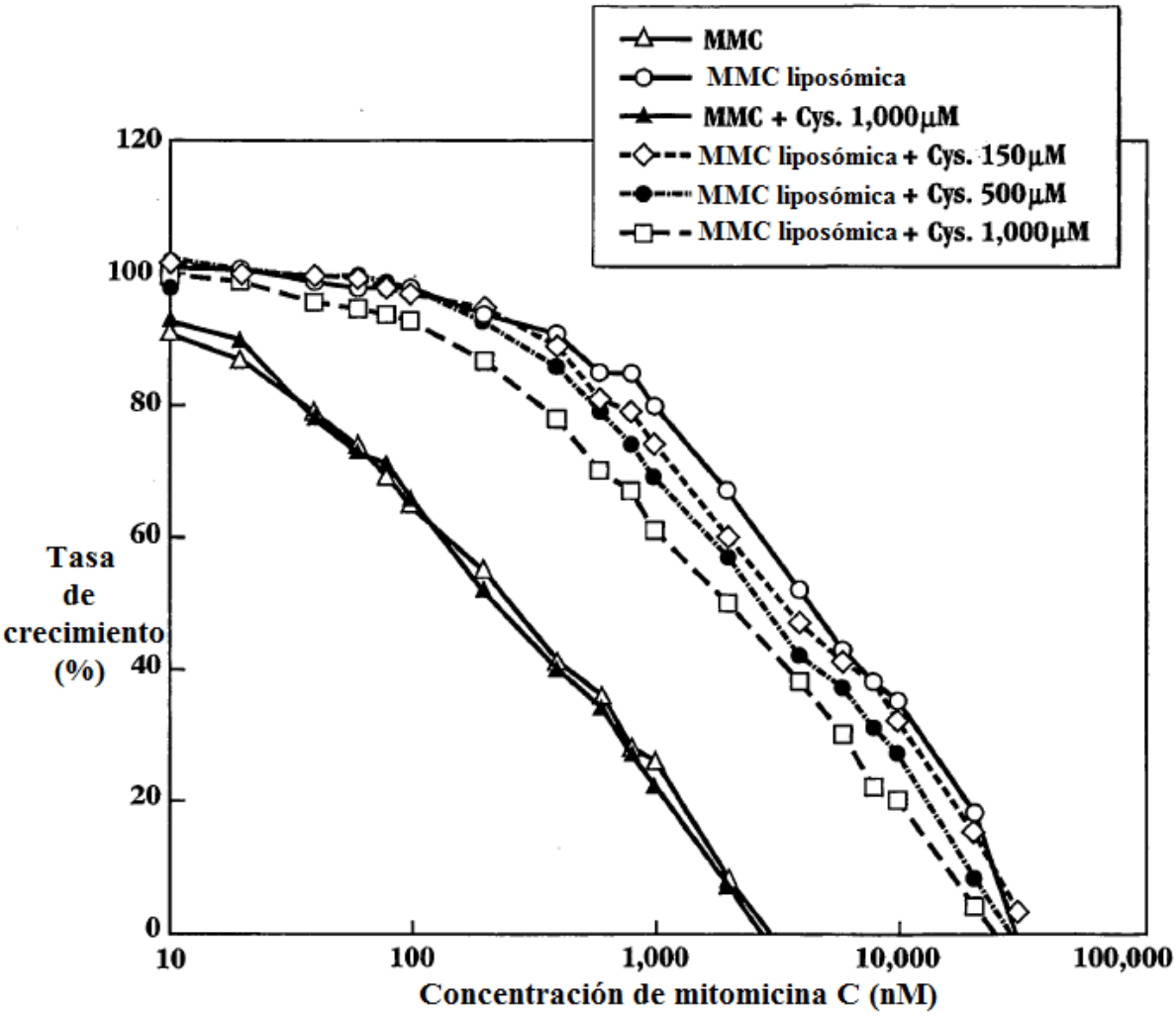

MMC
MMC liposómica
MMC + Cys. 1,000µM
MMC liposómica + Cys. 150µM
MMC liposómica + Cys. 500µM
MMC liposómica + Cys. 1,000µM
120
100
80
60
40
20
0
Tasa de crecimiento (%)
10
100
1,000
10,000
100,000
Concentración de mitomicina C (nM)

Fig. 11B

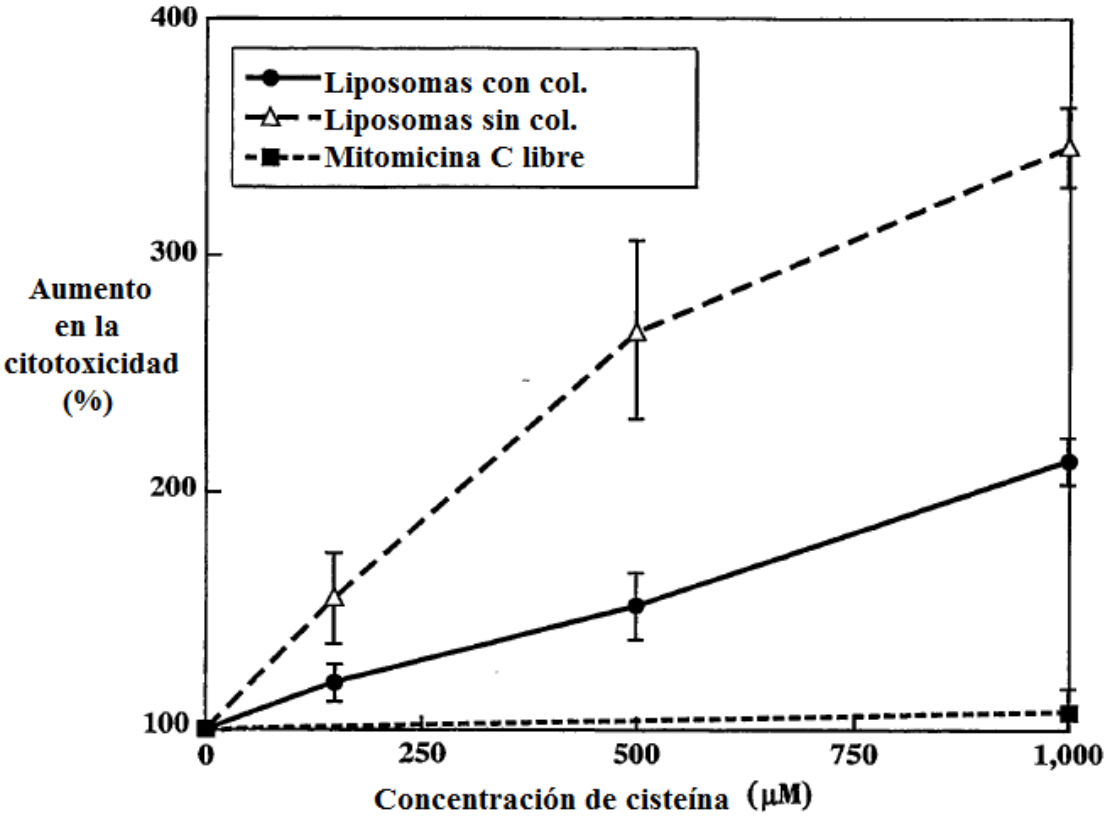

400
300
200
100
Aumento en la citotoxicidad (%)
Liposomas con col.
Liposomas sin col.
Mitomicina C libre
0
250
500
750
1,000
Concentración de cisteína (μM)

Fig. 12

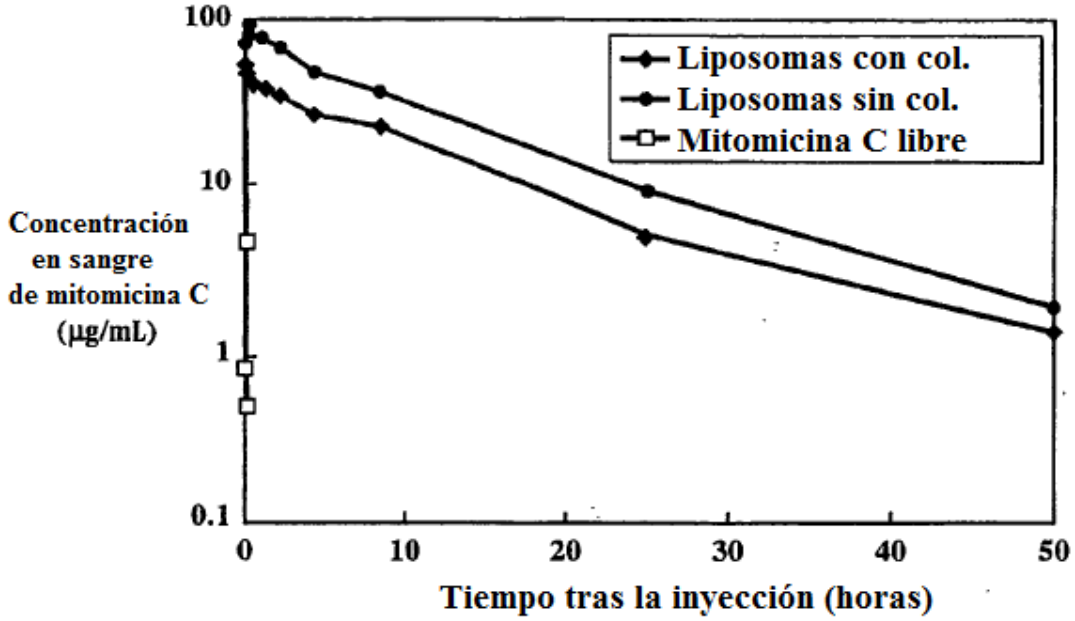


Fig. 13A

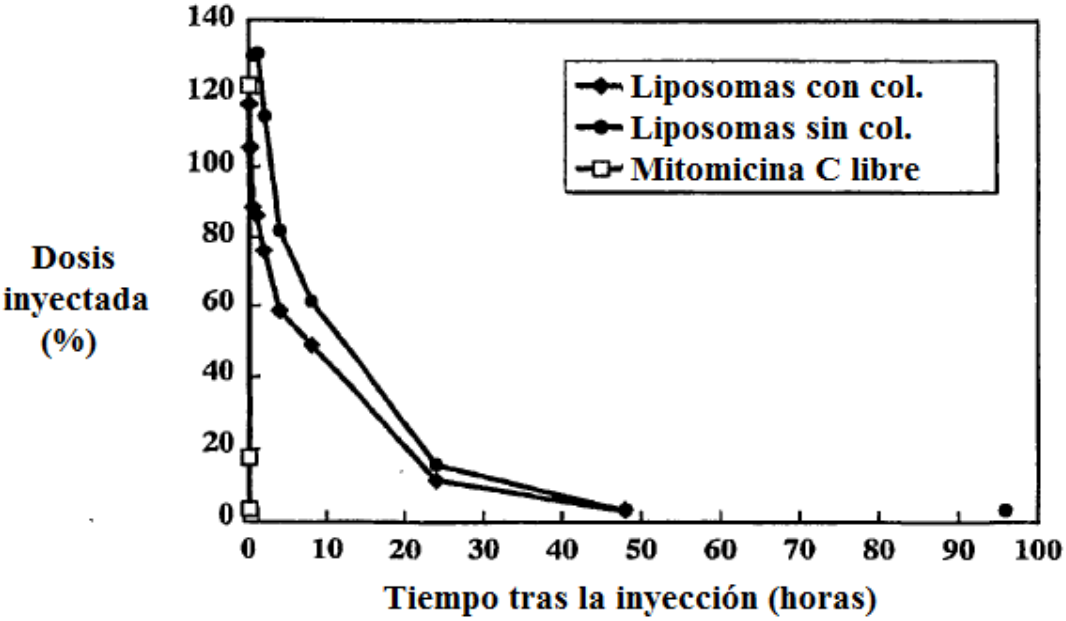


Fig. 13B

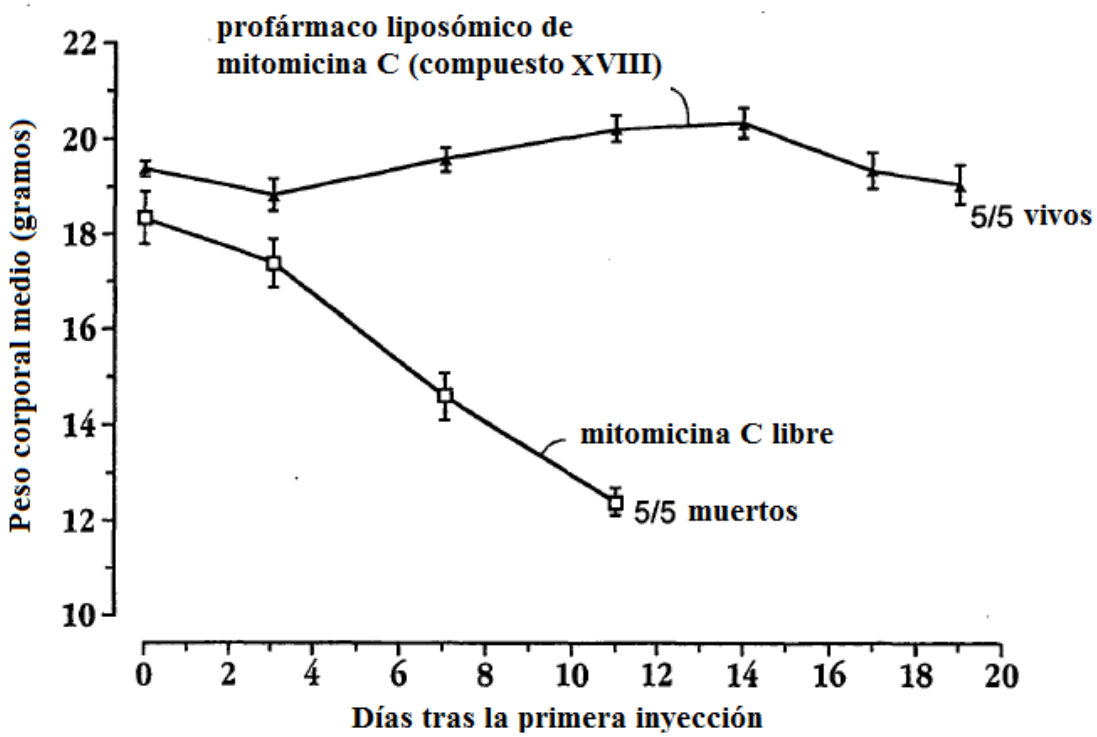

profármaco liposómico de
mitomicina C (compuesto XVIII)
5/5 vivos
mitomicina C libre
5/5 muertos
Peso corporal medio (gramos)
22
20
18
16
14
12
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Días tras la primera inyección

Fig. 14

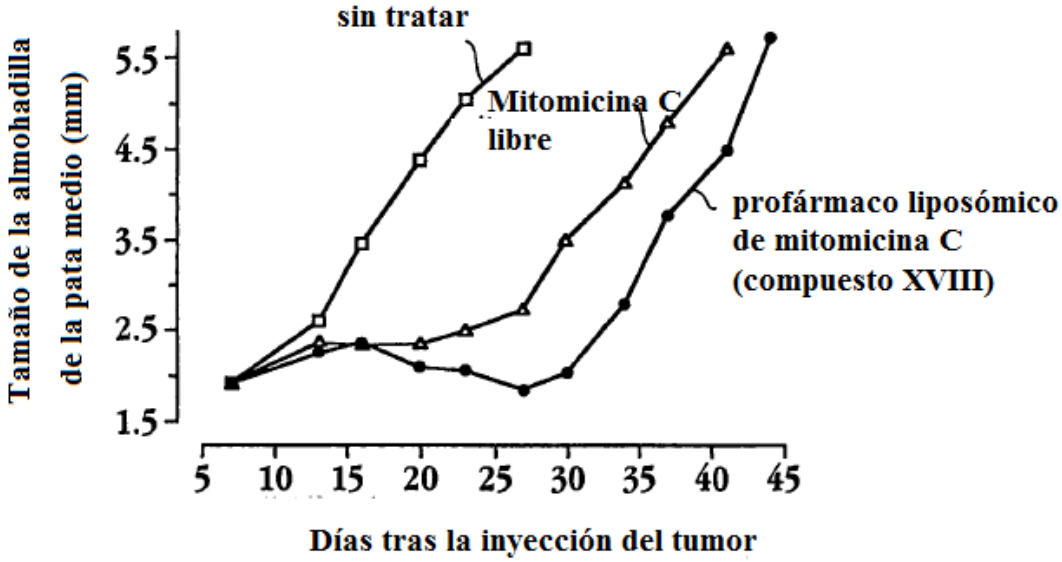

sin tratar
Mitomicina C libre
profármaco liposómico de mitomicina C (compuesto XVIII)
Tamaño de la almohadilla de la pata medio (mm)
5.5
4.5
3.5
2.5
1.5
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Días tras la inyección del tumor

Fig. 15A

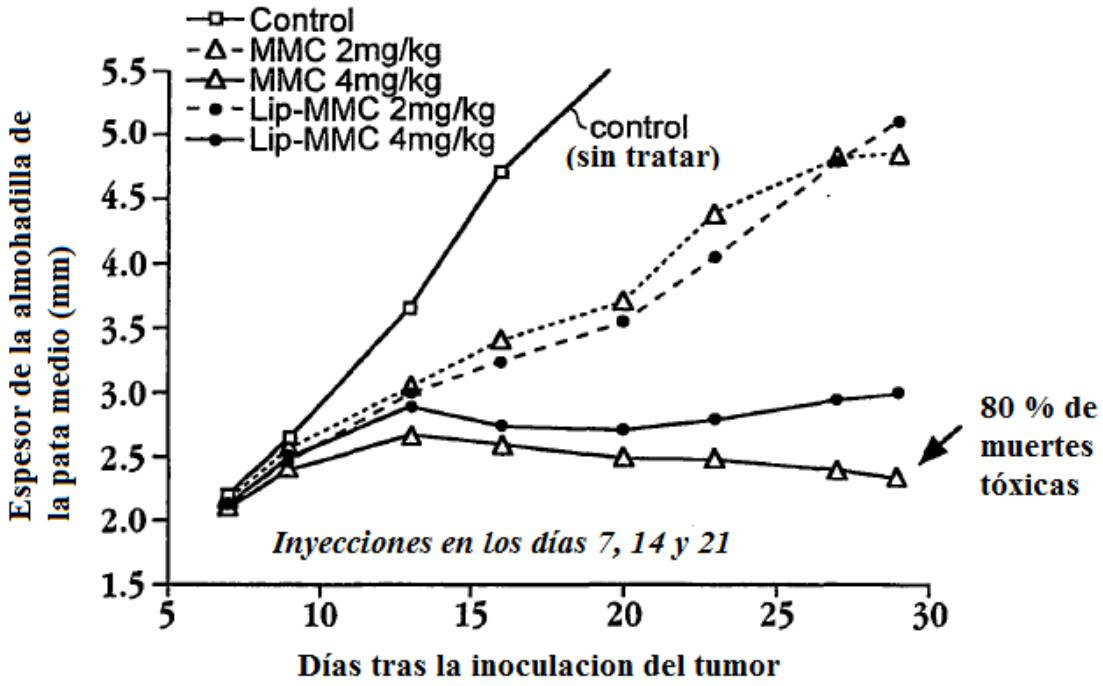

Control
MMC 2mg/kg
MMC 4mg/kg
Lip-MMC 2mg/kg
Lip-MMC 4mg/kg
control
(sin tratar)
80 % de
muertes
tóxicas
Inyecciones en los días 7, 14 y 21
Espesor de la almohadilla de
la pata medio (mm)
Días tras la inoculacion del tumor
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
5
10
15
20
25
30

Fig. 15B

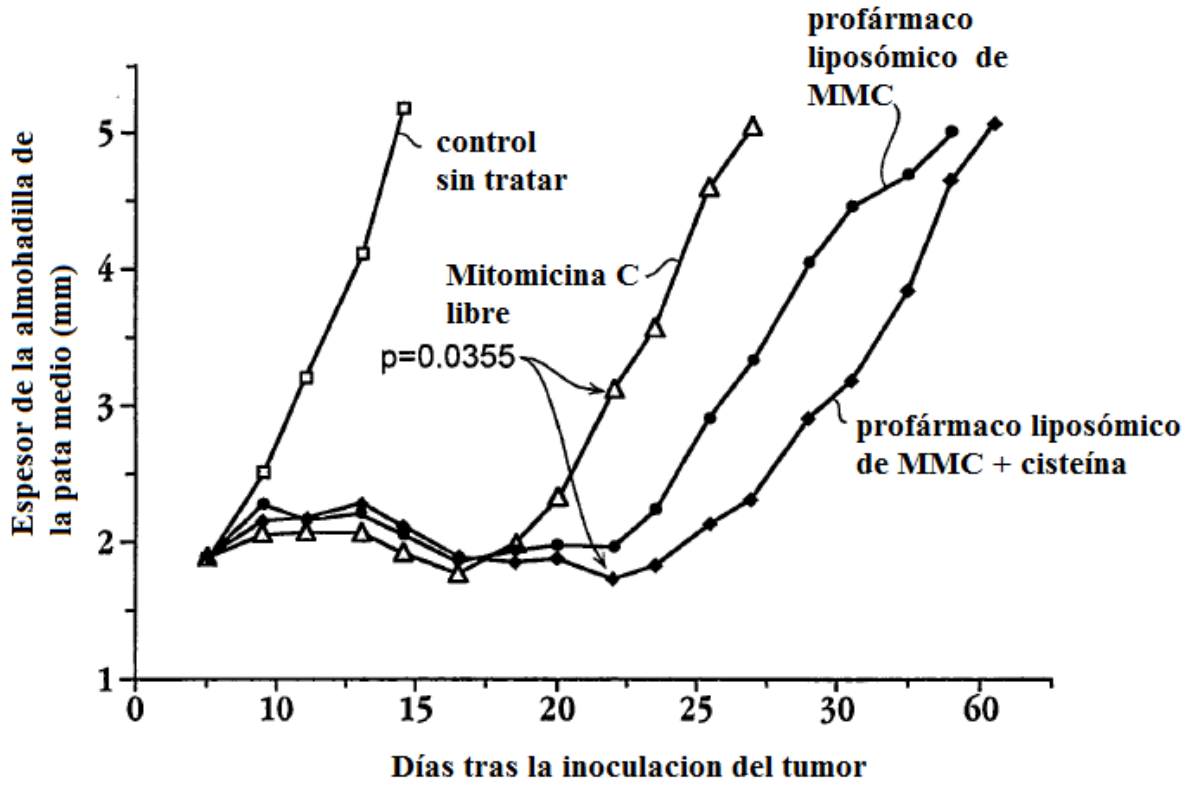

profármaco liposómico de MMC
control sin tratar
Mitomicina C libre
p=0.0355
profármaco liposómico de MMC + cisteína
Espesor de la almohadilla de la pata medio (mm)
1
2
3
4
5
0
10
15
20
25
30
60
Días tras la inoculacion del tumor

Fig. 16A

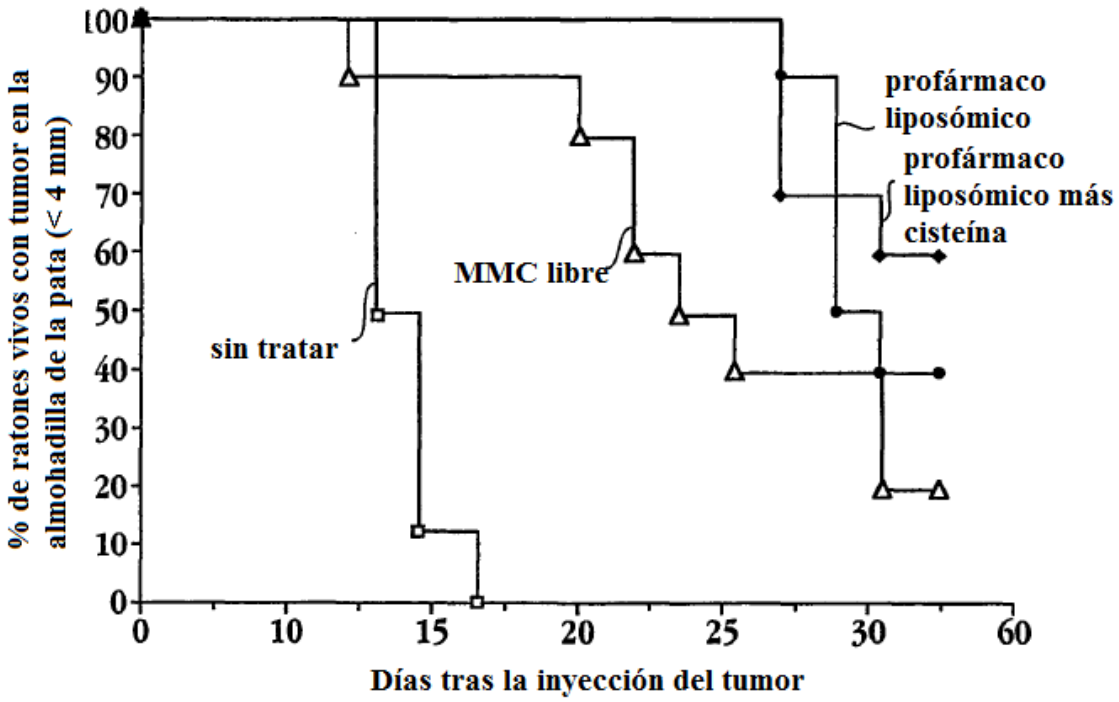

% de ratones vivos con tumor en la almohadilla de la pata (< 4 mm)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
15
20
25
30
60
Días tras la inyección del tumor
profármaco liposómico
profármaco liposómico más cisteína
MMC libre
sin tratar

Fig. 16B

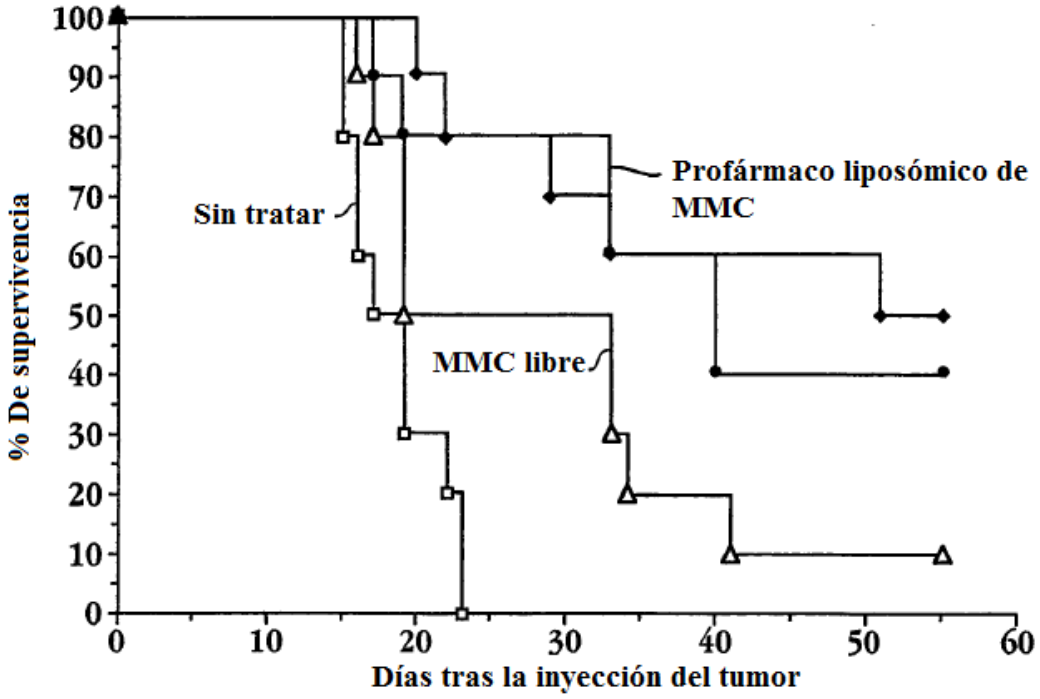

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% De supervivencia
Sin tratar
Profármaco liposómico de MMC
MMC libre
0
10
20
30
40
50
60
Días tras la inyección del tumor

Fig. 17

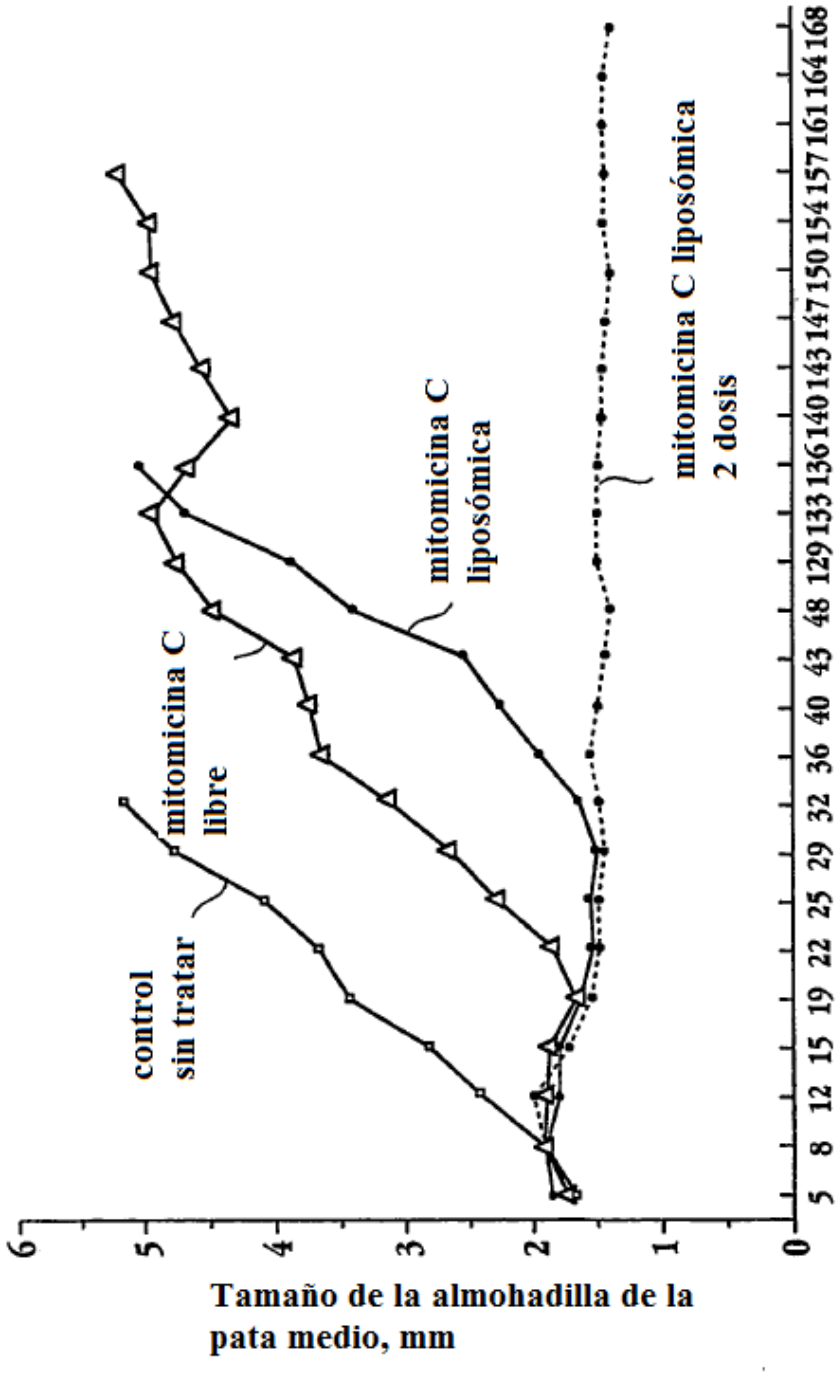

control
sin tratar
mitomicina C
libre
mitomicina C
liposómica
mitomicina C liposómica
2 dosis
Tamaño de la almohadilla de la pata medio, mm
Días tras la inoculación del tumor
0
1
2
3
4
5
6
5 8 12 15 19 22 25 29 32 36 40 43 48 129 133 136 140 143 147 150 154 157 161 164 168

Fig. 18

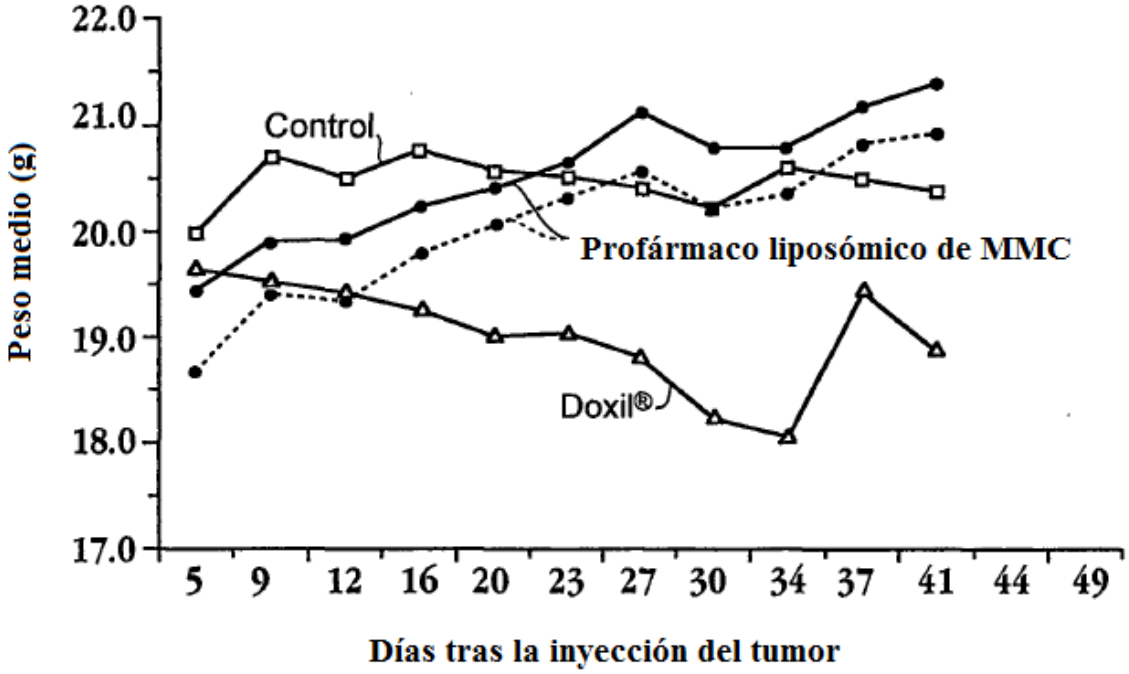

22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
Peso medio (g)
Control
Profármaco liposómico de MMC
Doxil®
5
9
12
16
20
23
27
30
34
37
41
44
49
Días tras la inyección del tumor

Fig. 19A

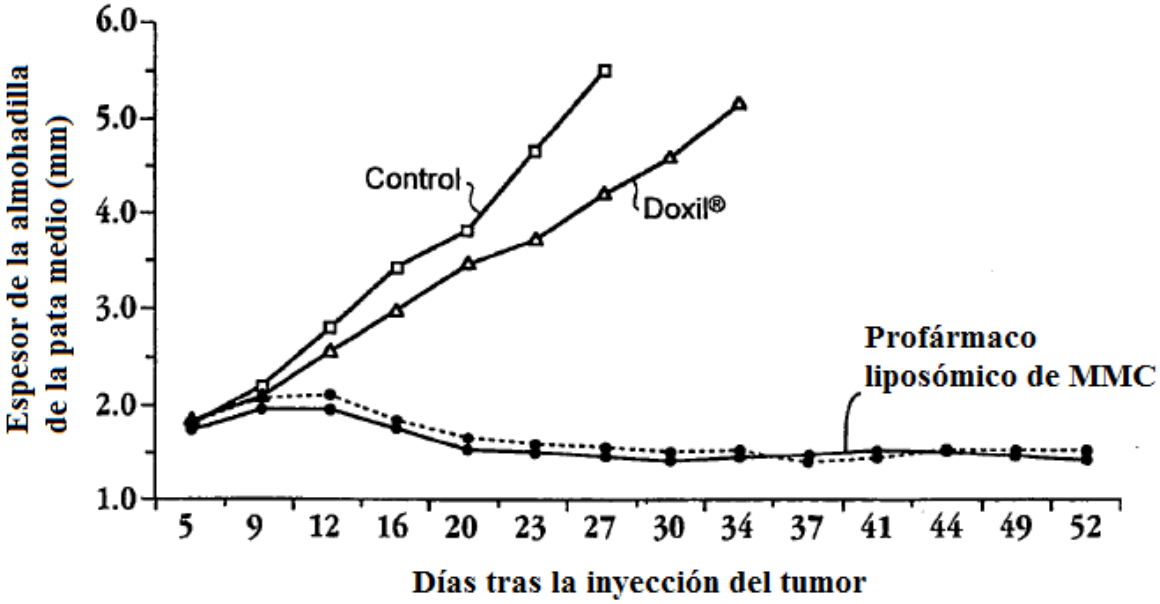

Espesor de la almohadilla de la pata medio (mm)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
Control
Doxil®
Profármaco liposómico de MMC
5
9
12
16
20
23
27
30
34
37
41
44
49
52
Días tras la inyección del tumor

Fig. 19B

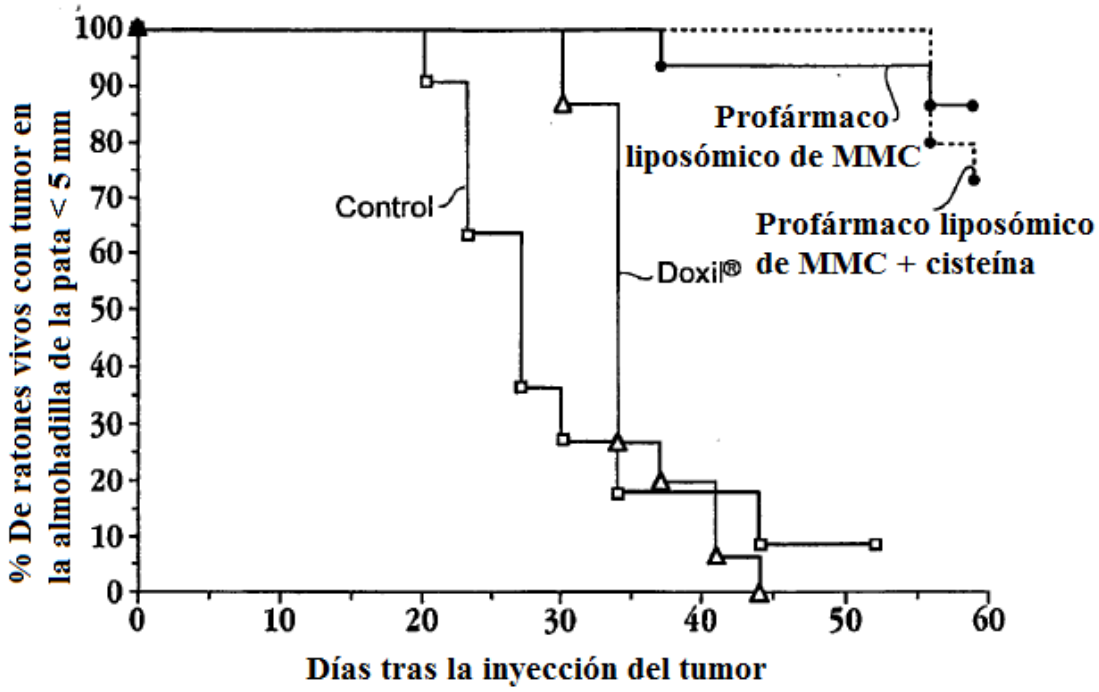

% De ratones vivos con tumor en la almohadilla de la pata < 5 mm
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
Días tras la inyección del tumor
Control
Doxil®
Profármaco liposómico de MMC
Profármaco liposómico de MMC + cisteína

Fig. 19C