

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 230**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06012171 .2**
96 Fecha de presentación: **07.06.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1704864**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Formulación farmacéutica inyectable que consiste en un agente citostático y una maleimida que se unen por medio de un espaciador**

30 Prioridad:
09.06.1999 DE 19926154

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.07.2012

73 Titular/es:
**KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH
BREISACHER STRASSE 17
79106 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:
Kratz, Felix

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 385 230 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación farmacéutica inyectable que consiste en un agente citostático y una maleimida que se unen por medio de un espaciador

5 El presente invento se refiere a una sustancia, que se compone de una sustancia activa, a saber un agente citostático, y de por lo menos un radical de molécula que fija covalentemente proteínas, a saber un grupo maleimido, que está unido a la sustancia activa mediante un espaciador,

en la que el espaciador o la unión entre el espaciador y la sustancia activa es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos de un modo dependiente del pH, para la utilización como un medicamento inyectable.

10 Después de haberse reunido con el cuerpo, la sustancia se fija covalentemente a componentes de líquidos corporales o de tejidos a través de la molécula que fija proteínas, de tal manera que se presenta una forma de transporte de la sustancia activa, que es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, de un modo dependiente del pH, mediando liberación de la sustancia activa.

15 La mayor parte de los fármacos empleados hoy en día son compuestos de bajo peso molecular y, después de su aplicación por vía sistémica, tienen un alto aclaramiento del plasma así como un alto aclaramiento total. Por lo demás, debido a procesos de difusión, ellos penetran en las estructuras tisulares del cuerpo y tienen, por lo general, una biodistribución uniforme. Ambas propiedades conducen a que sólo pequeñas cantidades del fármaco alcancen el sitio de acción, y a que el fármaco, debido a su distribución sobre el tejido sano del cuerpo, provoque efectos secundarios. Estas desventajas son especialmente pronunciadas en el caso de los fármacos que poseen un alto potencial citotóxico, tales como por ejemplo agentes citostáticos, inmunosupresores o virustáticos.

20 A fin de mejorar la selectividad de fármacos de bajo peso molecular, se siguen varias estrategias, por ejemplo la derivatización química de estructuras directoras, la formulación como profármacos o el acoplamiento de los fármacos a moléculas de vehículo y soporte. El presente invento parte de aquellos conceptos, en los que ciertos fármacos se habían fijado químicamente a macromoléculas propias del cuerpo. Se conocen conjugados, en los que, por lo general, unos agentes citostáticos se fijan a proteínas séricas, predominantemente a determinadas moléculas de vehículo, tales como albúmina sérica humana y transferrina sérica humana, y luego se administran. Estos conocidos conjugados de proteínas se preparan mediante el recurso de que o bien *ex vivo* en un "procedimiento de un solo recipiente" (es decir, sin aislamiento de los productos intermedios), el agente citostático se acopla a la proteína sérica (véase el documento de solicitud de patente alemana DE 41 22 210.A1) y se obtiene el resultante conjugado de una albúmina y del agente citostático, o bien en primer lugar el agente citostático se derivatiza con una molécula espaciadora apropiada, el producto resultante se aísla y en una segunda etapa el agente citostático derivatizado de esta manera se acopla a través de un grupo maleimido a la proteína (véanse el documento DE 196.36.889. A1 y el documento de solicitud de patente internacional PCT/DE 97/02000) y el resultante conjugado de una albúmina y del agente citostático se aísla. Ambos procedimientos tienen la desventaja de que se utilizan proteínas plasmáticas, que pueden contener agentes patógenos. Otras desventajas de los descritos conjugados de una proteína y de una sustancia activa las constituyen su estabilidad y su resistencia en almacenamiento que son insatisfactorias, y el esfuerzo técnico para su preparación.

El invento está basado en la misión de superar las desventajas antes citadas.

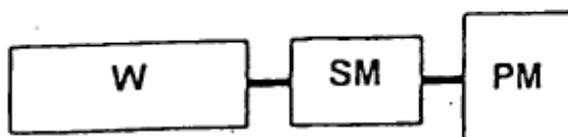
40 El problema planteado por esta misión se resuelve mediante una sustancia, que se compone de una sustancia activa, a saber un agente citostático, y de por lo menos un radical de molécula que fija covalentemente proteínas, a saber un grupo maleimido, que está unido a la sustancia activa mediante un espaciador, en la que el espaciador o la unión entre el espaciador y la sustancia activa es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos de un modo dependiente del pH, para la utilización como un medicamento inyectable.

45 Al realizarse la disociación, se pone en libertad la sustancia activa o un derivado de la sustancia activa. Por un derivado de la sustancia activa se entienden unas sustancias, que comprenden la sustancia activa, pero que pueden contener adicionalmente partes del espaciador o de los grupos, a través de los cuales estaba unida la sustancia activa con la molécula que fija proteínas. La actividad de la sustancia activa no debería ser perjudicada por su liberación como un derivado. Preferiblemente, la sustancia activa o su derivado desarrollan su actividad tan sólo después de la liberación.

50 El invento está basado en la sorprendente comprobación de que no es necesario, tal como se había supuesto hasta ahora, unir una sustancia activa con un determinado vehículo o soporte en condiciones definidas y administrar el producto, sino que es posible emplear directamente como medicamentos inyectables unas sustancias eficaces terapéuticamente y/o para diagnóstico, que se componen de una sustancia activa farmacológica, y de por lo menos una parte de una molécula que fija proteínas, las cuales están unidas entre sí a través de un espaciador, puesto que estos medicamentos, después de haber sido reunidos con el cuerpo, se fijan covalentemente a través de la molécula que fija proteínas, a componentes de líquidos corporales o de tejidos, predominantemente a proteínas séricas, de tal manera que se forma *in vivo* una forma de transporte de la sustancia activa, que llega a las células diana o respectivamente al tejido diana de la sustancia activa. Puesto que,

conforme al invento, en el caso de la sustancia eficaz terapéuticamente, el enlace en la molécula espaciadora o entre la sustancia activa y la molécula espaciadora es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, en dependencia del valor del pH, la sustancia activa es puesta en libertad, a pesar de todo de una manera deliberada en el sitio de destino deseado.

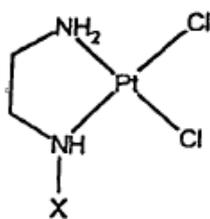
- 5 Las sustancias obtenidas conforme al invento modifican y mejoran de manera decisiva el perfil farmacocinético de las sustancias activas debido a sus propiedades de fijación de proteínas. Cuando estas sustancias eficaces terapéuticamente llegan a líquidos corporales, se fijan covalentemente a componentes de líquidos corporales o de tejidos, preferiblemente a proteínas séricas, de manera más preferida a una albúmina sérica, para presentarse de esta manera como profármacos macromoleculares, que transportan la sustancia activa al sitio de destino y/o la liberan en una forma dosificada.
- 10 La sustancia eficaz terapéuticamente, obtenida conforme al invento, se compone de una sustancia activa W, de una molécula espaciadora SM y de por lo menos una molécula que fija proteínas PM, con la siguiente estructura general:



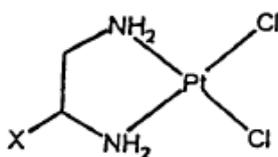
15 Adicionalmente la sustancia obtenida tiene grupos de marcación o respectivamente elementos o moléculas marcados/as, siendo apropiada la sustancia entonces en particular para finalidades de diagnóstico. Unos marcadores preferidos son uno o varios radionúclidos, uno o varios ligandos que comprenden radionúclidos, uno o varios radiadores de positrones, uno o varios agentes de contraste para RMN, uno o varios compuesto(s) fluorescente(s) o/y uno o varios agentes de contraste en la región próxima de los IR.

Un agente de diagnóstico es, por ejemplo, una sustancia activa marcada tal como se ha descrito anteriormente, o uno o varios compuesto(s) fluorescente(s) o/y uno o varios agente(s) de contraste en la región próxima de los IR.

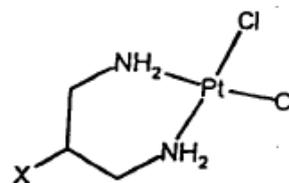
25 Unos agentes citostáticos preferidos para la preparación de sustancias inyectables eficaces terapéuticamente de acuerdo con el presente invento, son las antraciclina doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona y ametantrona así como derivados afines, los agentes alquilantes clorambucil, bendamustin, melfalán y oxazafosforinas así como derivados afines, los antimetabolitos metotrexato, 5-fluoro-uracilo, 5'-desoxi-5-fluoro-uridina y tioguanina así como derivados afines, los taxanos paclitaxel y docetaxel así como derivados afines, las camptotecinas topotecán, irinotecán, 9-amino-camptotecina y camptotecina así como derivados afines, los derivados de podofilotoxinas etopósido, tenipósido y mitopodozid así como derivados afines, los alcaloides de vinca vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, así como derivados afines, las caliqueamicinas, los maitansinoides y un compuesto de la fórmulas generales I a XII:



fórmula I



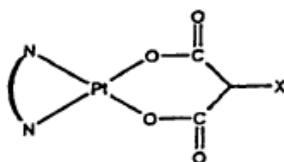
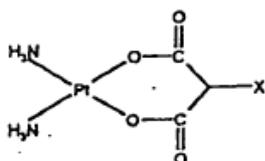
fórmula II



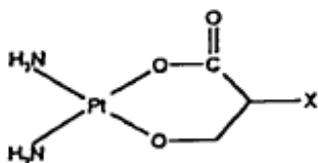
fórmula III

fórmula IV

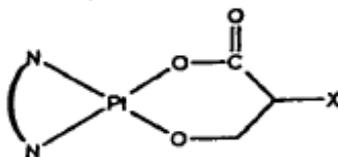
fórmula V



fórmula VI

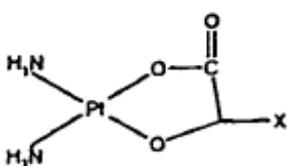


fórmula VII

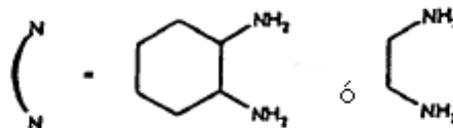


5

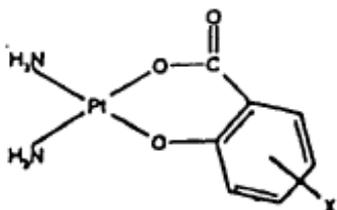
fórmula IX



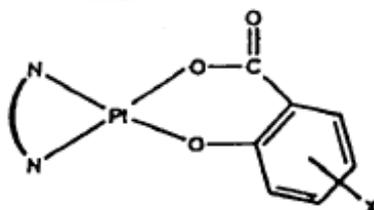
fórmula X



fórmula XI



fórmula XII



significando **X** la molécula espaciadora SM o la molécula que fija proteínas PM.

- 10 Unas preferidas citocinas como sustancia activa para la preparación de sustancias eficaces terapéuticamente son interleucina 2, interferón α -2a, interferón α -2b, interferón β -1a, interferón β -1b, interferón γ -1b y derivados afines. Las citocinas utilizadas son, por regla general, medicamentos preparados por tecnología genética.

- 15 La molécula espaciadora SM es una molécula orgánica que se compone de una cadena alifática de carbonos y/o de un anillo alifático de carbonos y/o de por lo menos un radical aromático. La/el cadena/anillo alifática/o de carbonos se compone de manera preferida de 1-12 átomos de carbono, que pueden estar reemplazados parcialmente por átomos de oxígeno, y puede estar eventualmente sustituida/o, en particular con uno o varios grupos solubles en agua, tales como grupos de ácido sulfónico, aminoalquilo o hidroxilo. El radical aromático es preferiblemente un anillo de benceno, que puede estar eventualmente sustituido, tal como ilustrativamente con los grupos solubles en agua antes citados. La cadena alifática de carbonos puede contener átomos de oxígeno para la mejor solubilidad en agua, y para esto convenientemente se puede derivar de una cadena de un oligo-(óxido de etileno u óxido de propileno), p.ej. puede ser una cadena de di(etilenglicol), tri(etilenglicol) o di(propilenglicol).

- 25 La molécula que fija proteínas PM es un grupo maleimido. Un grupo de halógeno-acetamida, un grupo de halógeno-acetato, un grupo piridilditio, un grupo de éster de N-hidroxi-succinimida o un grupo de isotiocianato se describen como la molécula que fija proteínas. Puede ser también un grupo de disulfuro, un grupo vinilcarbonilo, un grupo de aziridina o un grupo de acetileno. El grupo de disulfuro puede ser activado, por regla general mediante el recurso de que un ácido tionitrobenzoico (p.ej. el ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico) constituye el grupo intercambiable. Los grupos pueden estar eventualmente sustituidos. El grupo maleimido puede estar eventualmente sustituido con alquilo o con los grupos solubles en agua antes mencionados. La PM posee propiedades de fijación de proteínas, es decir que se fija en el medio fisiológico covalentemente a determinados aminoácidos sobre la superficie de las proteínas. En este caso, el grupo maleimido reacciona preferiblemente

con grupos HS de cisteínas sobre la superficie de las proteínas.

La sustancia eficaz terapéuticamente llega, después de una aplicación por vía parenteral, al torrente sanguíneo y se puede fijar a través de una PM a proteínas. Preferiblemente, se efectúa la fijación a proteínas séricas, en particular a una albúmina sérica. Se ha encontrado que, en el medio fisiológico, la sustancia eficaz terapéuticamente reacciona a través del grupo maleimido en particular con la cisteína-34 libre de la albúmina, y es fijada covalentemente por esta vía. Las proteínas séricas, tales como una albúmina o transferrina, tienen un periodo de tiempo de semidesintegración manifiestamente largo en la circulación sistémica (de hasta 19 días – véase la cita de Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin (Albúmina sérica). Adv. Protein. Chem. 37, 161 - 245). A causa de una permeabilidad aumentada de paredes vasculares del tejido maligno, infectado o respectivamente inflamado para macromoléculas, la albúmina sérica llega preferiblemente a este tejido diana (véase la cita de Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). De esta manera, una sustancia activa acoplada a una albúmina puede alcanzar más deliberadamente el sitio de acción. Por lo demás, el acoplamiento covalente de la sustancia activa a proteínas séricas en el torrente sanguíneo impide que la sustancia activa se difunda en estructuras de tejidos sanos del cuerpo o que sea eliminada a través del riñón, o bien que dañe a éste en la medida en que lo hace la sustancia activa no fijada. De esta manera se modifica y mejora el perfil farmacocinético de la sustancia activa, puesto que su acción es aumentada por medio de un enriquecimiento en el sitio de acción, y simultáneamente se disminuyen los efectos tóxicos sobre sistemas sanos del cuerpo.

Las sustancias eficaces terapéuticamente, utilizadas según el presente invento, contienen en la molécula espaciadora o entre SM y W un enlace químico definido. Este enlace es disociable o respectivamente disociable hidrolíticamente, dependiendo del pH, preferiblemente de modo inestable frente a ácidos, o contiene por lo menos un enlace, que es disociado enzimáticamente en el cuerpo, preferiblemente un enlace peptídico.

Los enlaces, que son disociados por medio de una hidrólisis mediando liberación de la sustancia activa, son por ejemplo enlaces de ésteres o enlaces de complejos con metales, como los que se presentan en complejos de platino y dicarboxilato, liberándose un complejo de diamino-diacuo-platino(II). Los enlaces disociables, inestables frente a ácidos, son enlaces de acetal, cetel, imina, hidrazona, carboxilhidrazona o sulfonilhidrazona, o enlaces de cis-aconitilo o enlaces que contienen un grupo tritilo, pudiendo el grupo tritilo estar sustituido o sin sustituir. Preferidos enlaces inestables frente a ácidos relevantes terapéuticamente, se han descrito, por ejemplo, en la cita de Kratz y colaboradores (1990) *Crit. Rev. Ther. Drug. Car. Sys* 16 (3), 245-288. La secuencia peptídica en los enlaces peptídicos realizados se compone, por regla general, de aproximadamente 2-30 aminoácidos. La secuencia peptídica está concebida en el cuerpo, en este caso preferiblemente para obtener la especificidad para substratos de determinadas enzimas, seguidamente designadas como enzimas diana, de tal manera que la secuencia peptídica, o una parte de esta secuencia, sea reconocida por una enzima en el cuerpo, y que el péptido sea disociado. De acuerdo con otra forma de realización del presente invento, el enlace disociable enzimáticamente consiste en un enlace, que no es ningún enlace peptídico. Ejemplos de ello son enlaces de carbamato, que por medio de enzimas específicas para ciertas enfermedades, p.ej. glutatión-S-transferasas, glucuronidasas, galactosidasas, liberan la sustancia activa o un derivado de la sustancia activa. También es posible sin dificultades que un enlace disociable enzimáticamente esté constituido por una secuencia peptídica y por uno de los enlaces antes mencionados, que no es ningún enlace peptídico. Las enzimas diana pueden ser tanto enzimas propias del cuerpo como enzimas que se presentan en microorganismos o respectivamente son formadas por éstos.

Las enzimas diana son, por regla general, proteasas, serina-proteasas, activadoras del plasminógeno y peptidasas, por ejemplo, metaloproteasas de la matriz (MMP) o cisteína-proteasas, que son formadas o activadas de manera acrecentada en el caso de enfermedades tales como una artritis reumatoide o un cáncer, lo que conduce a la degradación tisular excesiva, a inflamaciones y a la formación de metástasis. Enzimas diana son en particular MMP 2, MMP 3 y MMP 9, que como proteasas participan en los citados procesos patológicos (véanse las citas de Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, y de Brown, P.D. (1995), *Advan Enzym Regul.* 35, 291-301).

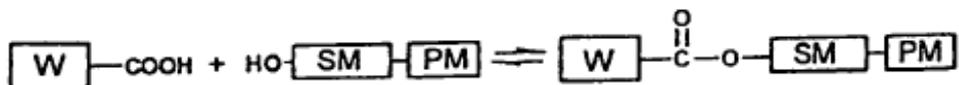
Otras proteasas, que constituyen enzimas diana para sustancias eficaces terapéuticamente del presente invento, son catepsinas, en particular las catepsinas B, H y L, que se han identificado como enzimas claves en los casos de enfermedades inflamatorias y malignas.

Los tipos de enlaces antes citados garantizan que la sustancia activa o un correspondiente derivado activo se libere junto al sitio de acción extracelular- y/o intracelularmente después de haber sido absorbido el conjugado por la célula, y que pueda desarrollar su efecto terapéutico.

La disociación puede transcurrir también de tal manera que no sea disociada la sustancia activa como tal, sino que se disocie un derivado de la sustancia activa. Un derivado de este tipo contiene por consiguiente la sustancia activa, así como grupos fijados a ella, que proceden de una molécula espaciadora, dependiendo de en qué sitio se haya efectuado la disociación deseada.

La sustancia eficaz se puede preparar de acuerdo con una de las descripciones generales que se encuentran más abajo:

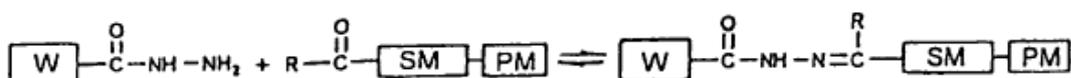
Sustancias activas, que poseen un grupo -HOOC se derivatizan de la siguiente manera:



La esterificación se efectúa en este caso mediante procedimientos usuales, que son habituales para un experto en la especialidad.

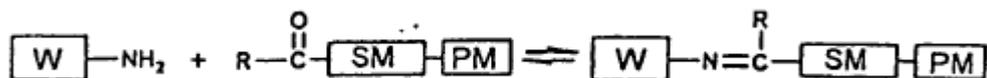
- 5 Además, es posible transformar el grupo -HOOC en un grupo hidrazido, p.ej. mediante una reacción con terc.-alquil-carbazatos y un subsiguiente desdoblamiento con ácidos (como se describe en el documento DE 196 36 889), y hacer reaccionar el fármaco, que tiene un grupo hidrazido, con un espaciador que contiene un componente con carbonilo, que se compone de PM y SM, tal como se ha descrito, entre otros, en el documento DE 196 36 889 A1 o respectivamente en el documento PCT/DE 97/02000:

10



R = H, alquilo, fenilo, fenilo sustituido

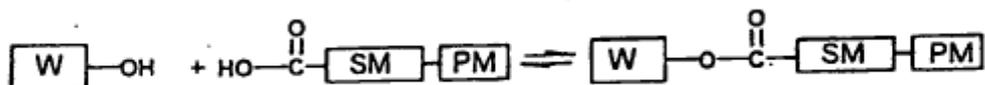
Sustancias activas del presente invento, que poseen un grupo H₂N, se derivatizan de la siguiente manera:



R = H, alquilo, fenilo, fenilo sustituido

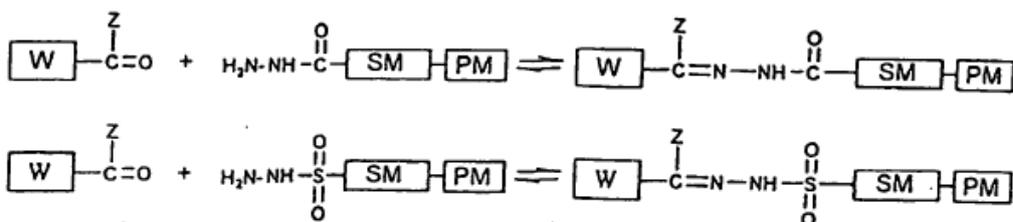
- 15 La reacción para dar los derivados de iminas se efectúa en este caso mediante procedimientos conocidos, que son habituales para un experto en la especialidad.

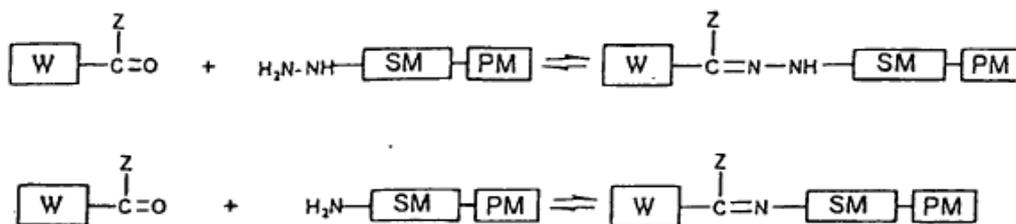
Sustancias activas del presente invento, que poseen un grupo HO, se derivatizan de la siguiente manera:



20 La esterificación se efectúa en este caso mediante procedimientos usuales, que son conocidos para un experto en la especialidad.

Sustancias activas del presente invento, que poseen un componente carbonílico, se derivatizan de la siguiente manera:

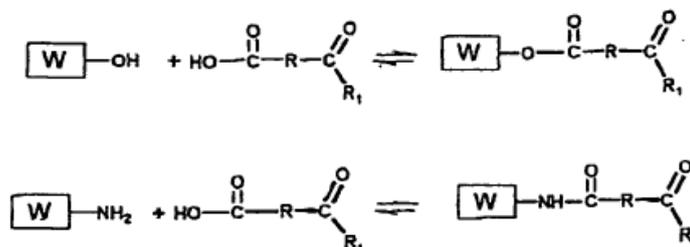




Z = grupo químico de la sustancia activa

- 5 La reacción para dar los derivados de carboxilhidrazona, sulfonilhidrazona, hidrazona o respectivamente de imina se efectúa en este caso según unos procedimientos, que se han descrito, entre otros, en los documentos DE 196 36 889 A1 o bien PCT/DE 97/02000, o mediante procedimientos usuales, que son habituales para un experto en la especialidad.

Además, es posible transformar un grupo HO o un grupo NH₂ de una sustancia activa en un componente carbonílico, p.ej. mediante esterificación o respectivamente formación de una amida con un componente carbonílico que lleva grupos de ácidos carboxílicos, según la siguiente fórmula general:



- 10 en la que **R** es una cadena alifática de carbonos y/o un anillo alifático de carbonos y/o un radical aromático y **R₁** es = H, o un grupo alquilo, fenilo o fenilo sustituido. **R** se compone, por regla general, de 1 a 12 átomos de carbono, que pueden estar eventualmente sustituidos, p.ej. con grupos solubles en agua, tales como grupos de ácido sulfónico, aminoalquilo o hidroxilo. El radical aromático es, por lo general, un anillo de benceno, que puede estar eventualmente sustituido, tal como ilustrativamente con los grupos solubles en agua antes mencionados.
- 15 El componente carbonílico puede ser introducido, por lo demás, a través de otras reacciones químicas, así p.ej. mediante una sustitución electrófila junto al grupo HO o NH₂ de la sustancia activa con un componente carbonílico apropiado.

- Las sustancias activas derivatizadas de esta manera, que tienen ahora un componente carbonílico, se hacen reaccionar análogamente a los procedimientos antes descritos con las moléculas espaciadoras que fijan proteínas, que poseen un grupo amino, hidrazido o hidrazino, para dar los correspondientes derivados de carboxilhidrazona, sulfonilhidrazona, hidrazona o respectivamente imina. La disociación, inestable frente a ácidos, de estos enlaces conduce, por consiguiente, a una liberación de la sustancia activa derivatizada, que posee un componente carbonílico.
- 20

- Los espaciadores, que se componen de la molécula que fija proteínas PM y de la molécula espaciadora SM, se pueden preparar p.ej. según procedimientos, que se han descrito, entre otros, en el documento DE 196 36 889 A1, y en las citas de U. Beyer y colaboradores *Chemical Monthly*, 128, 91, 1997, R. S. Greenfield y colaboradores, *Cancer Res.*, 50, 6.600, 1990, T. Kaneko y colaboradores, *Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991, *Bioconjugate Techniques*, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996, o en el documento de patente de los EE.UU. US 4.251.445.
- 25

- Unas sustancias eficaces terapéuticamente para el presente invento, que contienen un enlace peptídico, se pueden preparar haciendo reaccionar un péptido, que se compone de 2 hasta aproximadamente 30 aminoácidos, con un compuesto que fija proteínas, de tal manera que una molécula que fija proteínas se introduce directamente o a través de una molécula espaciadora SM junto al extremo terminal de N del péptido. La síntesis de tales derivados de péptidos que fijan proteínas se efectúa preferiblemente mediante una síntesis en fase sólida habitual para un experto en la especialidad, fijándose en la última etapa de la constitución del péptido una molécula espaciadora que fija proteínas, que lleva un ácido carboxílico, p.ej. un ácido maleimido-carboxílico, mediante acoplamiento peptídico junto al extremo terminal de N del péptido, y a continuación, separándose el péptido que fija proteínas con respecto de la fase sólida. Los derivados peptídicos obtenidos de esta manera se pueden hacer reaccionar con una sustancia activa, que tiene un grupo H₂N o HO, en la presencia de un agente de condensación, tal como p.ej. N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC) o meto-p-tolueno-sulfonato de N-ciclohexil-N'-2-(2-morfolino-etil)-carbodiimida (CMC), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-pirrolidino-fosfonio (pyBOP) o hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio y eventualmente mediante adición de N-hidroxi-succinimida
- 30
- 35

130.

Por ejemplo, se han identificado octapéptidos ($P_4 - P'_4$) para MMP 2 y MMP 9, que simulan la secuencia de disociación de la cadena de colágeno, y que son disociados de manera especialmente eficiente por las MMP 2 y 9:

péptido

$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \quad P'_1 \quad P'_2 \quad P'_3 \quad P'_4$

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln

5

(Netzel-Arnett y colaboradores, *Biochemistry* 32, 1993, 6.427-6.432).

Los péptidos se disocian enzimáticamente de manera exclusiva junto al enlace $P_1-P'_1$,

Por lo demás, en el caso de la catepsina B se conocen unos dipéptidos específicos para un sustrato con la secuencia -Arg-Arg-, -Phe-Lys-, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu o Ala-Leu-Ala-Leu (véanse las citas de Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

10

La secuencia peptídica, que contiene el sitio relevante de rotura preestablecida del péptido, puede estar estructurada también de tal manera que el sitio de rotura preestablecida del péptido se repita múltiples veces, tal como por ejemplo con:

-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

15 ó

-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

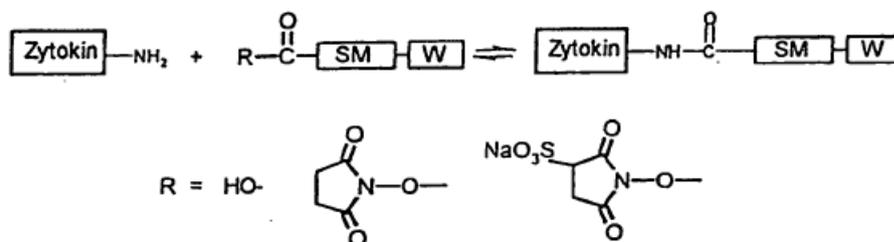
o se puede integrar una secuencia peptídica repetitiva, que aumenta la distancia entre la molécula que fija proteínas y el sitio relevante de rotura preestablecida del péptido, tal como, por ejemplo, con:

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Phe-Lys-Phe-Lys-

Para las sustancias eficaces terapéuticamente destinadas a su utilización en el presente invento es decisivo el hecho de que el sitio relevante de rotura preestablecida del péptido para la respectiva enzima diana se presente por lo menos una vez en un oligopéptido. Los oligopéptidos expuestos anteriormente son ejemplos representativos para la preparación de sustancias eficaces terapéuticamente.

Unas sustancias eficaces terapéuticamente, que contienen una citocina, se pueden preparar haciendo reaccionar la citocina con una molécula espaciadora que contiene un grupo que fija proteínas, que tiene un ácido carboxílico o un ácido carboxílico activado:

25



Zytokin = citocina

Si la molécula espaciadora tiene un grupo de éster de N-hidroxi-succinimida (N-hidroxi-succinimida o la sal de sodio del ácido N-hidroxi-succinimida-3-sulfónico), se hace reaccionar directamente con la citocina. La reacción de la citocina con una molécula espaciadora que contiene un grupo que fija proteínas, que tiene un ácido carboxílico, se efectúa en presencia de

30

un agente de condensación, tal como, por ejemplo, N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC) o meto-p-tolueno-sulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolino-etil)-carbodiimida (CMC), y eventualmente mediando adición de N-hidroxi-succinimida o la sal de sodio del ácido N-hidroxi-succinimida-3-sulfónico, para dar los correspondientes derivados de citocinas que fijan proteínas. La purificación de las citocinas derivatizadas de esta manera se efectúa convenientemente con ayuda de la cromatografía por exclusión. Las reacciones antes descritas son conocidas para un experto en la especialidad (véase la cita Bioconjugate Techniques (Técnicas de bioconjugados), G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

A continuación de la síntesis de la sustancia eficaz terapéuticamente, se prepara una formulación medicamentosa inyectable que contiene la sustancia eficaz terapéuticamente, en el seno de un líquido de vehículo apropiado. La sustancia eficaz terapéuticamente se presenta preferiblemente en forma de un material liofilizado, pudiéndose añadir antes o después de la liofilización usuales vehículos y/o sustancias farmacéuticas auxiliares, tales como ilustrativamente los Polisorbatos, glucosa, lactosa, manosa, ácido cítrico, trometamol, trietanolamina o ácido amino-acético. La formulación medicamentosa inyectable se tiene que preparar de tal manera que la molécula que fija proteínas no sea desactivada, disociada o hidrolizada por la disolución en el líquido de vehículo inyectable. Además, se tiene que garantizar que el enlace inestable frente a ácidos en la sustancia eficaz terapéuticamente, que es un enlace de éster, acetal, cetel, imina, hidrazona, carboxilhidrazona o sulfonilhidrazona, no sea hidrolizado. Las moléculas que fijan proteínas, utilizadas en el marco del presente invento, son sensibles frente a bases, por lo que el valor del pH del líquido de vehículo no debe sobrepasar un valor de pH de 8,0. Preferiblemente, el valor del pH se sitúa en el intervalo de pH de 4,0-7,0, de manera más preferida entre el pH 6,0 y el pH 7,0. Además, el líquido de vehículo tiene que ser, por supuesto, compatible fisiológicamente.

Unos líquidos de vehículo preferidos son tampones salinos aproximadamente isotónicos, p.ej. tampones de fosfato, acetato o citrato, tales como ilustrativamente fosfato de sodio 0,004 M, NaCl 0,15 M – de pH 6,0-7,0, o acetato de sodio 0,01 M, NaCl 0,14 M – de pH 5,0-6,5). El líquido de vehículo utilizado puede ser también una solución isotónica de cloruro de sodio. Los tampones salinos pueden contener usuales vehículos y/o sustancias auxiliares, tales como ilustrativamente los Polisorbatos, glucosa, lactosa, manosa, ácido cítrico, trometamol, trietanolamina o ácido amino-acético.

La solubilidad de la sustancia eficaz terapéuticamente en el líquido de vehículo inyectable se puede mejorar por medio de disolventes farmacéuticos, tales como ilustrativamente etanol, isopropanol, 1,2-propilenglicol, glicerol, los Macrogoles, poli(etilenglicoles) o respectivamente poli(óxidos de etileno), o por medio de agentes solubilizantes, p.ej. Tween, Cremophor o una poli(vinil-pirrolidona). A este fin, o bien la sustancia eficaz terapéuticamente se disuelve en el disolvente o respectivamente agente solubilizante farmacéutico y a continuación se diluye con un tampón salino, o se utiliza directamente un líquido de vehículo, que contiene el tampón salino y por lo menos un disolvente farmacéutico o un agente solubilizante farmacéutico, para la disolución de la sustancia eficaz terapéuticamente. La concentración de los disolventes farmacéuticos o respectivamente agentes solubilizantes farmacéuticos no ha de sobrepasar en este caso las cantidades, que son prescritas por la Ley de Medicamentos (abreviada "AMG" en alemán).

Preferiblemente, el líquido de vehículo se debería escoger de tal manera que el proceso de disolución de la sustancia eficaz terapéuticamente en el líquido de vehículo esté terminado después de unos pocos minutos, de tal manera que se ponga a disposición una formulación medicamentosa inyectable junto a la cama del paciente.

La sustancia eficaz terapéuticamente se adecua, por consiguiente para el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades víricas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias agudas o crónicas y/o enfermedades que son provocadas por bacterias, hongos u otros microorganismos.

Además, se describe una sustancia eficaz en diagnóstico, con un contenido de por lo menos un agente de diagnóstico, que está caracterizada porque contiene por lo menos un radical de una molécula que fija proteínas, que está unido con el agente de diagnóstico a través de un espaciador, siendo disociable el espaciador o el enlace entre el espaciador y el agente de diagnóstico en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, en dependencia del valor del pH, mediando liberación del agente de diagnóstico. El agente de diagnóstico puede comprender uno o varios radionúclidos, uno o varios ligandos que comprenden radionúclidos, uno o varios radiadores de positrones, uno o varios agentes de contraste para RMN (resonancia magnética nuclear), uno o varios compuesto(s) fluorescente(s) o/y uno o varios agentes de contraste en la región próxima de los IR (rayos infrarrojos).

Además se describe un estuche de diagnóstico, que contiene una sustancia eficaz en diagnóstico, que fija proteínas, eventualmente en común con la molécula de vehículo y sustancias auxiliares, sustancias de vehículo y/o agentes diluyentes, aceptables farmacéuticamente, que en particular se escogen entre los/las que antes se han mencionado. El estuche de diagnóstico se puede utilizar para la detección de las enfermedades que antes se han definido o para la detección de moléculas de vehículo y/o su distribución en el organismo.

Se describe un procedimiento para la preparación de una formulación medicamentosa inyectable, que contiene una sustancia eficaz en diagnóstico, que se disuelve en un líquido de vehículo inyectable, el cual está caracterizado porque como sustancia eficaz en diagnóstico se utiliza un compuesto que comprende un agente de diagnóstico y por lo menos un radical de una molécula que fija proteínas. Un agente de diagnóstico puede ser uno de los compuestos antes mencionados, por

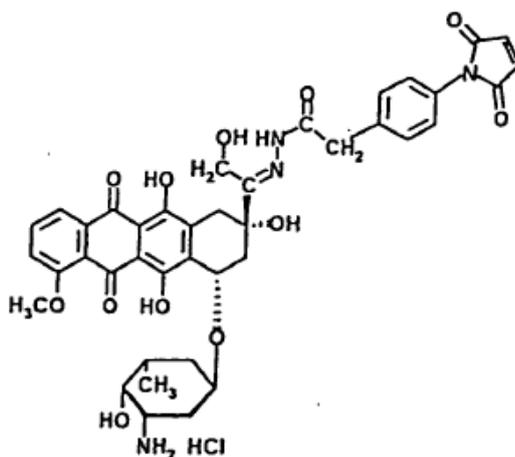
ejemplo uno o varios radionúclidos, uno o varios ligandos que comprenden radionúclidos, uno o varios radiadores de positrones, uno o varios agentes de contraste para RMN, uno o varios compuesto(s) fluorescente(s) o/y uno o varios agentes de contraste en la región próxima de los IR. El agente de diagnóstico y el por lo menos un radical de una molécula que fija proteínas pueden estar unidos también a través de un espaciador. En este caso, se prefiere que el espaciador o el enlace, que une a los dos componentes, no sea disociable. Ejemplos de enlaces que no se pueden disociar en el cuerpo, que pueden estar presentes en el caso de la fijación con la sustancia eficaz en diagnóstico, son enlaces amídicos, enlaces de carbono con carbono, saturados o insaturados, o enlaces entre carbono y un heteroátomo, -C-X-, siendo X preferiblemente O, N, S ó P. Un enlace preferido es por ejemplo un enlace amídico. Se prefiere la liberación de la sustancia eficaz terapéuticamente, puesto que, por regla general, la sustancia activa de bajo peso molecular debe de interactuar con su diana molecular, a fin de desarrollar su actividad farmacológica. En el caso de sustancias eficaces en diagnóstico, por el contrario, no se requiere indispensablemente una liberación del agente de diagnóstico fijado a una proteína, pero ésta puede estar presente. La sustancia eficaz en diagnóstico puede estar unida con la molécula espaciadora adicionalmente a través de un enlace no disociable en el cuerpo, o directamente con el grupo que fija proteínas sin la presencia de una molécula espaciadora SM.

Los siguientes Ejemplos ilustran el invento más detalladamente.

Ejemplo 1

Preparación de DOXO-HYD

La sustancia farmacológicamente activa, reproducida a continuación (denominada abreviadamente DOXO-HYD), se compone del agente citostático doxorubicina, de un grupo maleimido como molécula que fija proteínas PM y de un espaciador de fenil-acetil-hidrazona como molécula espaciadora SM. El enlace entre la doxorubicina y la molécula espaciadora SM es un enlace de carboxil-hidrazona inestable frente a ácidos.



10,51 mg de DOXO-HYD se disuelven en 2,0 ml de 1,2-propilenglicol mediante agitación y a continuación esta solución se diluye con 8,0 ml de un tampón fosfato (fosfato de sodio 0,004 M, NaCl 0,15 M – de pH 6,5) y se homogeneiza (concentración de DOXO-HYD en el líquido de vehículo = 1.300 µM). La formulación medicamentosa inyectable de DOXO-HYD, preparada de esta manera, se administró a animales de ensayo directamente por vía intravenosa (véase más abajo).

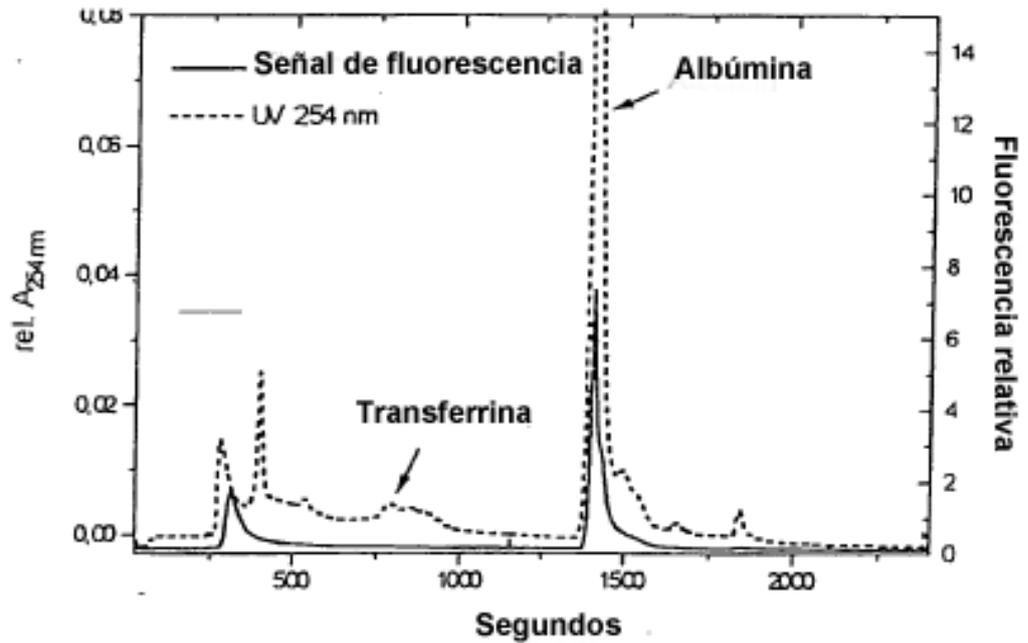
Ejemplo 2

Fijación de DOXO-HYD a un plasma humano

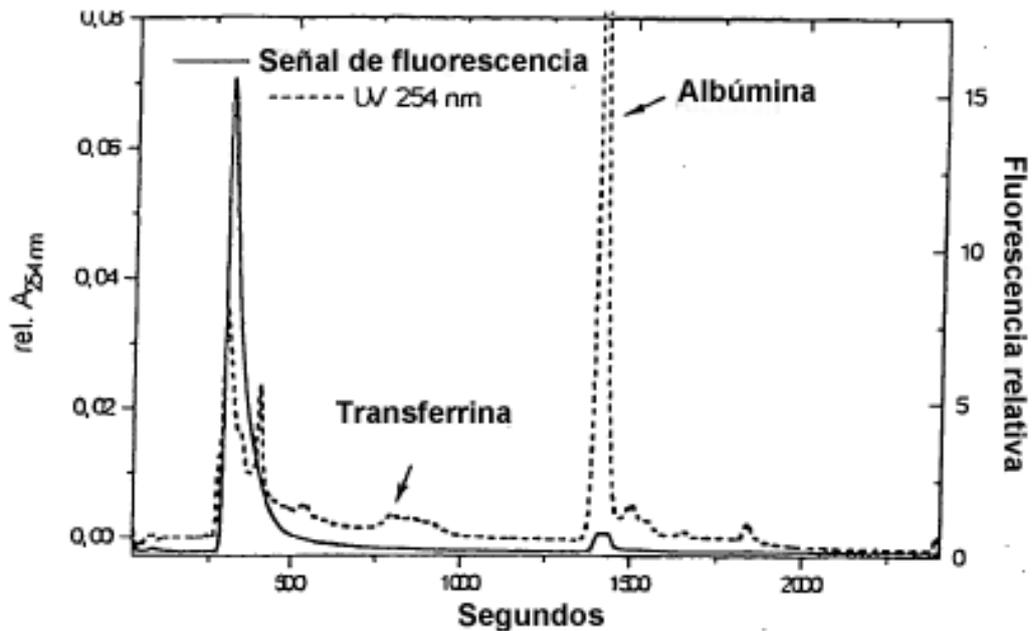
Después de que la DOXO-HYD llega al torrente sanguíneo, tiene lugar una fijación a proteínas séricas, preferiblemente a una albúmina sérica, de tal manera que la DOXO-HYD se presenta, entre otras, en forma de un conjugado de albúmina y doxorubicina que es inestable frente a ácidos.

Estudios de incubación de un plasma sanguíneo humano con la DOXO-HYD a 37°C muestran que, después de una incubación de 5 minutos de duración, la mayor parte de la DOXO-HYD se ha fijado covalentemente a la albúmina. (A) – al contrario que la doxorubicina libre (B). Esta circunstancia se representa en los cromatogramas reproducidos más abajo (A y B):

A



B



En este caso, después de haber efectuado la incubación, se separó la muestra de plasma a través de una columna de intercambio de aniones POROS®-20 (detección de las proteínas a 254 nm, detección de la antraciclina por fluorescencia).

5 **Ejemplo 3**

La actividad de la DOXO-HYD *in vivo*

Los datos biológicos expuestos más abajo ilustran la actividad *in vivo* de la DOXO-HYD en comparación con la de doxorubicina libre: En el denominado modelo RENCA (del inglés "renal cell carcinoma", carcinoma de células renales) se compararon entre sí la doxorubicina y la DOXO-HYD en lo que respecta a la actividad antitumoral con una dosis aproximadamente equitóxica (terapia por vía intravenosa 10 días después de la inyección de aproximadamente 1 millón de células de carcinoma renal en el riñón izquierdo).

Animales: Ratones Balb/c, hembras; tumor: RENCA, renal cell carcinoma (carcinoma de células renales)

Terapia: Días (d) 10, 13, 17 y 20 por vía intravenosa (i.v.), final del ensayo d24

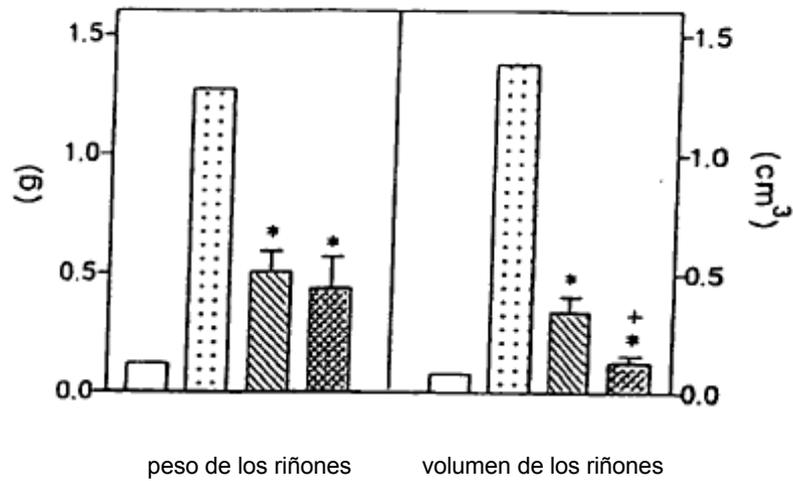
Número de los ratones	Sustancia	Dosis	Disminución media del peso corporal (%) d 1-24
10	Testigo		
10	Doxorrubicina	4 x 10 mmol/kg	-15
10	DOXO-HYD	4 x 20 mmol/kg	-15

Los resultados de este ensayo se reproducen más abajo. La DOXO-HYD muestra una muy buena actividad antitumoral y alcanza una manifiesta reducción del volumen del tumor renal y del número de metástasis pulmonares en comparación con el grupo testigo y con el grupo tratado con doxorubicina.

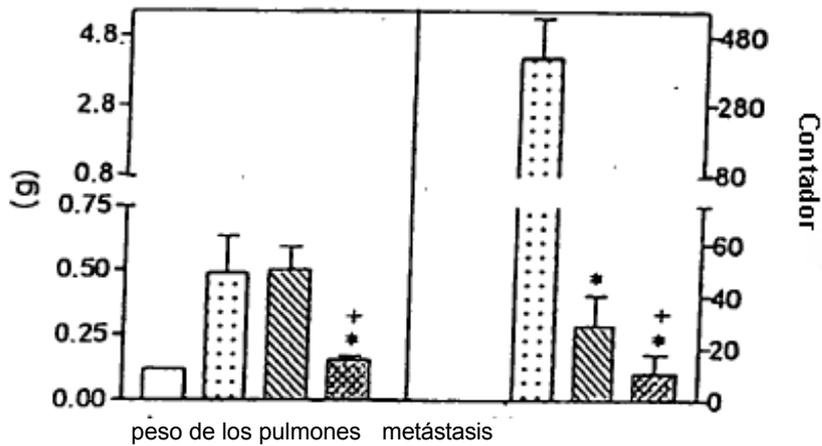
5

Peso y volumen de los riñones y de los tumores renales, así como número de las metástasis pulmonares

10



15



20

 ningún tumor	 doxorubicina
 vehiculo de control	 DOXO-HYD
	4 x 10 mmol/kg
	4 x 20 mmol/kg

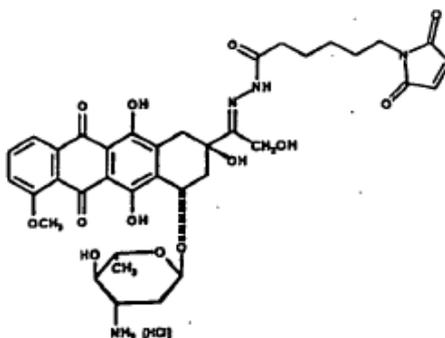
* significativo con respecto al conjunto de control (testigo)

+ significativo con respecto al conjunto que recibió doxorubicina.

Ejemplo 4

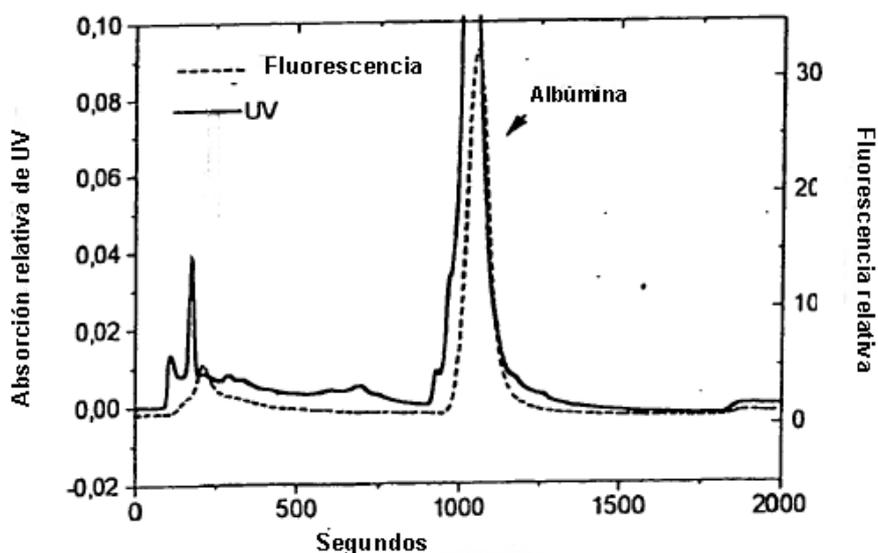
5 Fijación de la DOXO-EHMC a una albúmina en el plasma humano

1,6 mg del derivado de hidrazona de ácido 6-maleimidocaproico de doxorubicina (denominado abreviadamente DOXO-EHMC) con la fórmula estructural representada más abajo



10

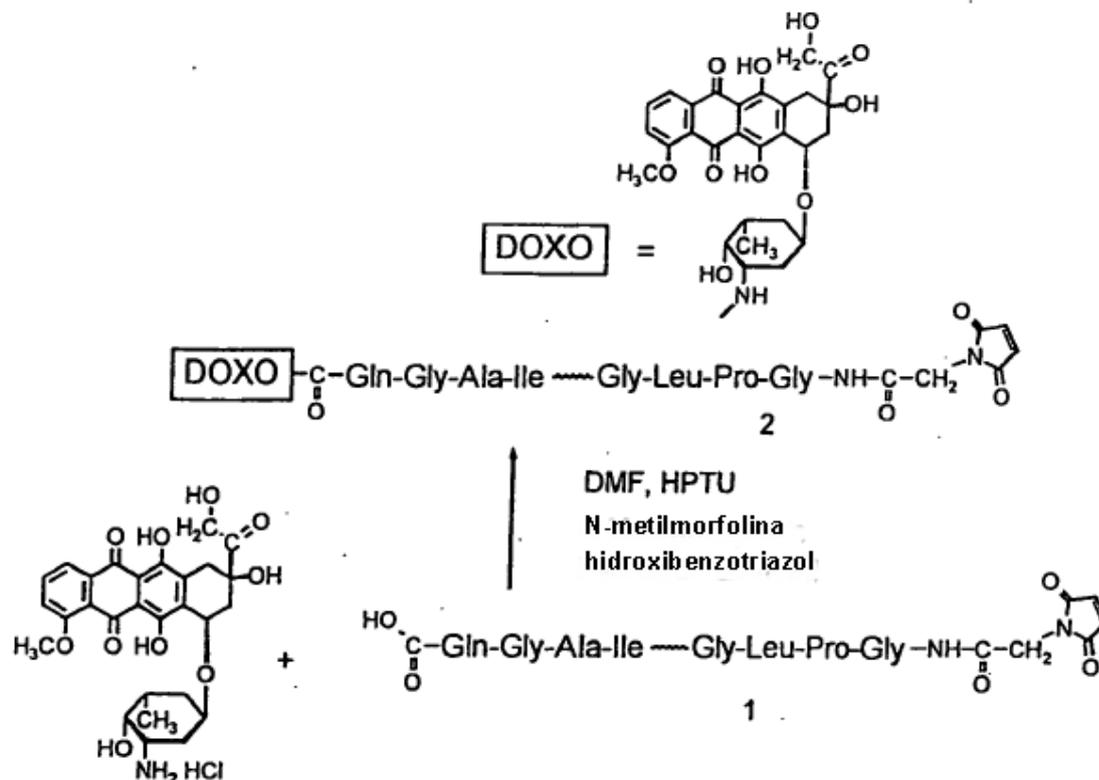
se disuelven en 1,0 ml de un tampón de fosfato (NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,004 M, de pH 6,5) a la temperatura ambiente (solución 2.000 µM). Cuando se incuban 250 µl de esta solución con 1,0 ml de un plasma humano durante 30 segundos a 37°C, y a continuación se separa la muestra en un intercambiador débil de aniones (de POROS®), se pone de manifiesto que la mayor parte de la DOXO-EHMC está fijada a una albúmina (véase el cromatograma representado más abajo):



Ejemplo 5

Fijación a una albúmina de un derivado peptídico de doxorrubicina y maleimida (2) que es disociable con MMP 9, después de un periodo de tiempo de incubación de un minuto con un plasma humano

El derivado peptídico de doxorrubicina y maleimida (2) se preparó según la siguiente ecuación de reacción:



5

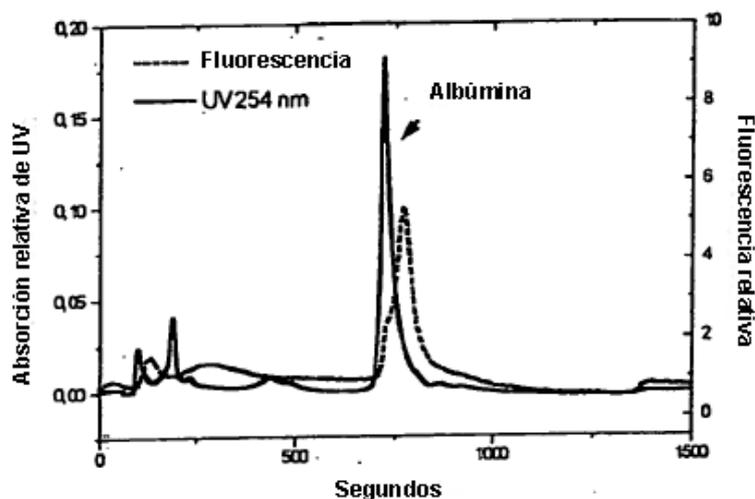
En este caso, el octapéptido derivatizado con maleimido-glicina, Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly **1** (PM (peso molecul) 848, preparado por medio de una síntesis en fase sólida por la entidad Bachem AG, Suiza) se hace reaccionar con doxorrubicina según la siguiente prescripción:

- 10 A una solución ligeramente turbia de 17,1 mg de doxorrubicina en 3 ml de DMF (dimetil-formamida) se le añaden 25 mg de **1** (en forma de la sal trifluoroacetato) disueltos en 500 μl de DMF, 33,5 mg de hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HPTU) disueltos en 200 μl de DMF, 11,9 mg de hidroxibenzotriazol hidrato disueltos en 100 μl de DMF y 16,2 μl de N-metil-morfolina, y la tanda se agita a continuación durante 18 h a la temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. La DMF se eliminó en alto vacío y el material sólido se recogió en 20 ml de metanol, se filtró y se concentró por evaporación en vacío hasta 1 ml. Después de una purificación sobre gel de sílice (con una mezcla de acetato de etilo y metanol 2/1), se obtuvieron 5 mg de **2**.

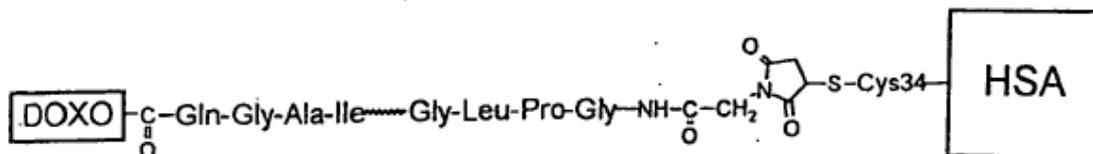
15

Estudio de incubación con un plasma humano

- 20 1,4 mg de **2** (PM 1.374) se disuelven en 1,0 ml de un tampón de fosfato (NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,004 M, pH 6,5) a la temperatura ambiente (1.000 μm de solución). Cuando se incuban 300 μl de esta solución con 1,0 ml de un plasma humano durante 60 segundos a 37°C, y la muestra se separa a continuación a través de un intercambiador débil de aniones (de la entidad POROS[®]), se pone de manifiesto que la mayor parte de **2** está fijada a una albúmina (véase el cromatograma representado más abajo):

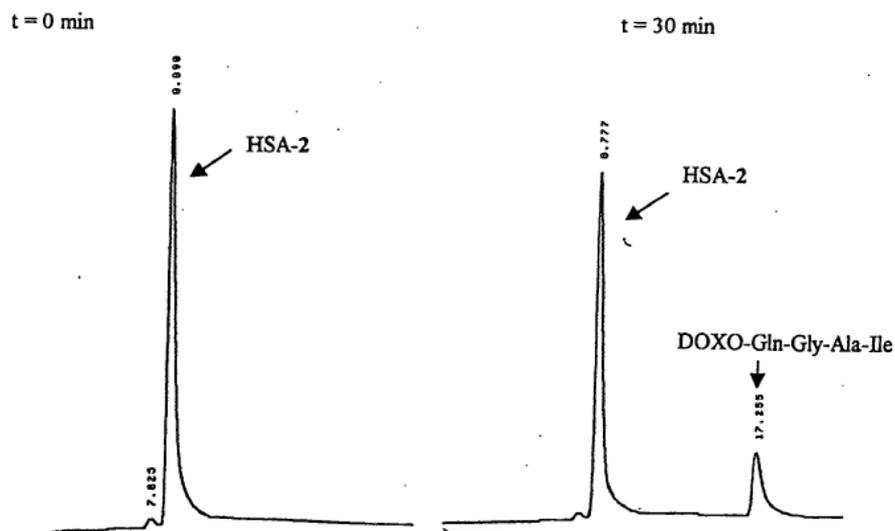


La secuencia peptídica Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly es reconocida por la metaloproteasa de la matriz MMP 9 y es disociada entre isoleucina y glicina. Esto se demostró por medio del siguiente ensayo: 200 μ l de una solución de 100 μ M del conjugado de **2** con una albúmina que tiene la siguiente estructura (denominada abreviadamente HSA-2):



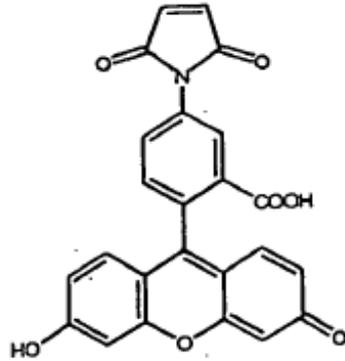
HSA = albúmina sérica humana

10 que se había preparado mediante el procedimiento descrito en la solicitud de patente alemana A 19926475.9 del 10 de junio de 1999, se incubó con MMP 9 activada con tripsina/aprotinina (2 mU de la entidad Calbiochem, Alemania) durante 30 minutos a 37°C. La liberación de la DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile después de este periodo de tiempo se ha reproducido en los cromatogramas reproducidos más abajo. Se muestra el cromatograma de HSA-2 a $t = 0$ (separación mediante cromatografía por exclusión de HPLC con una columna Biosil 250 SEC de la entidad Biorad, detección a $\lambda = 495$ nm) y después de un periodo de tiempo de incubación de 30 minutos con MMP 9 activada.

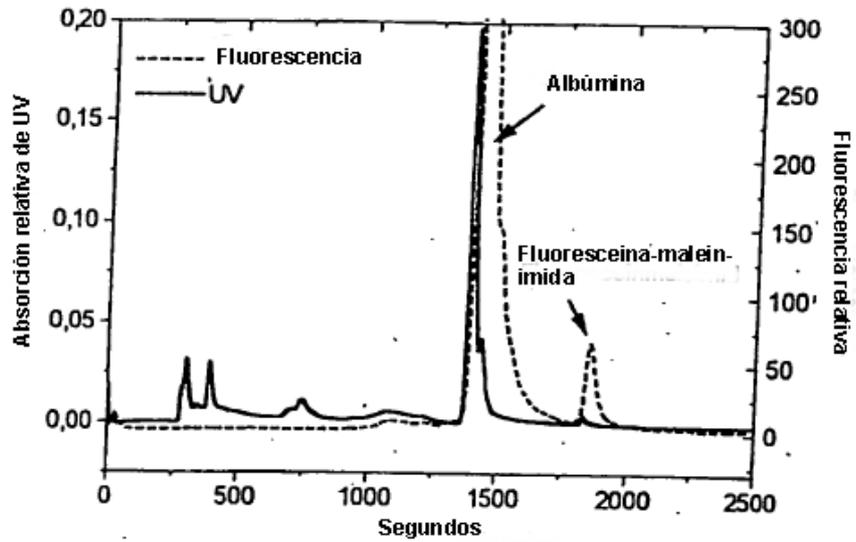


Ejemplo de comparación 6

Fijación de fluoresceína-maleimida a una albúmina en un plasma humano



5 Después de una incubación durante 5 minutos de 250 μ l de una solución 100 μ M de fluoresceína-maleimida (tampón de fosfato, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,004 M, pH 5,0) con 1,0 ml de un plasma humano y una subsiguiente separación de la muestra mediante cromatografía por exclusión (con Superdex[®] 200, de la entidad Pharmacia), se pone de manifiesto que la parte predominante de la fluoresceína-maleimida está fijada a una albúmina (véase el cromatograma representado seguidamente):



REIVINDICACIONES

1. Sustancia, que se compone de una sustancia activa, a saber un agente citostático, y por lo menos un radical de una molécula que fija covalentemente proteínas, a saber un grupo maleimido, que está unido a la sustancia activa a través de un espaciador, en la que el espaciador o el enlace entre el espaciador y la sustancia activa es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, en dependencia del pH, destinada a la utilización como medicamento inyectable.

2. Sustancia, que se compone de una sustancia activa, a saber un agente citostático, y por lo menos un radical de una molécula que fija covalentemente proteínas, a saber un grupo maleimido, que está unido a la sustancia activa a través de un espaciador, en la que el espaciador o el enlace entre el espaciador y la sustancia activa es disociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, en dependencia del pH, y en la que el radical de una molécula que fija proteínas no está unido a una proteína de vehículo, destinada a la utilización como medicamento inyectable, destinada a la utilización como medicamento inyectable.

3. Sustancia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-2, **caracterizada porque** la sustancia tiene la fórmula química:

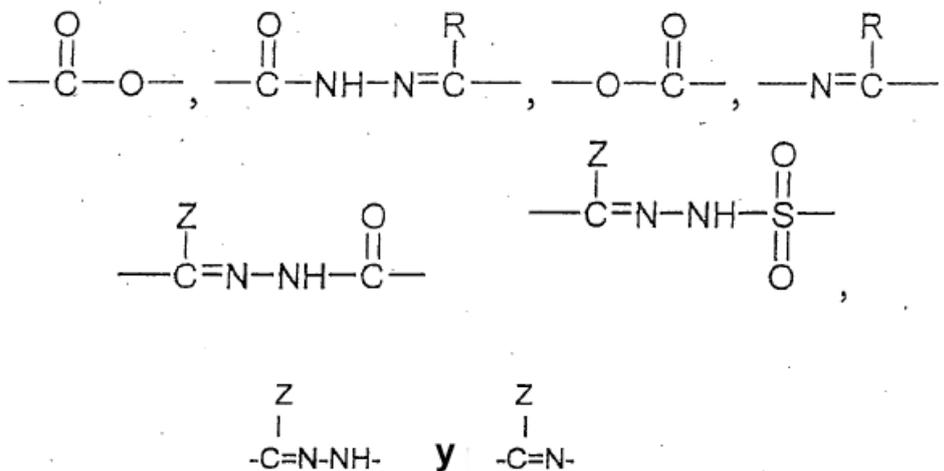


en la que **W** es la sustancia activa; **SM** es una molécula espaciadora y **PM** es una molécula que fija proteínas.

4. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** la sustancia tiene la fórmula química:



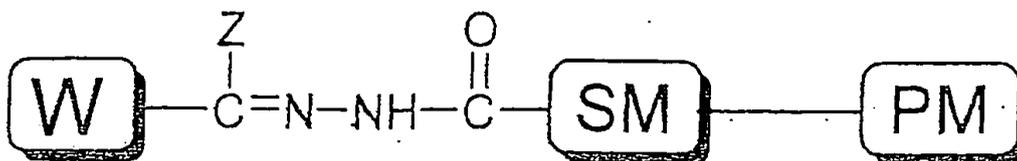
X es un grupo químico, seleccionado entre:



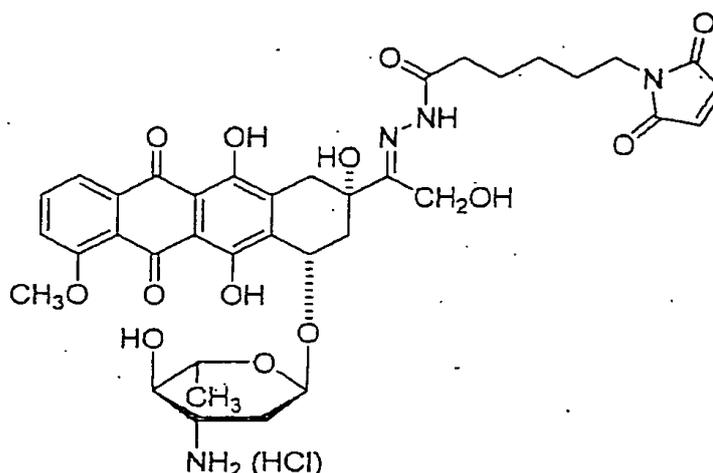
en las que

R es = H, alquilo, fenilo o fenilo sustituido, y
Z es = un grupo químico de la sustancia activa.

5. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 4,
caracterizada porque
la sustancia tiene la fórmula química:



6. Sustancia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5,
caracterizada porque
la sustancia activa se selecciona entre el conjunto de las antraciclina, de los derivados de mostaza nitrogenada, de los agentes alquilantes, de los antagonistas de purina o pirimidina, de los antagonistas de ácido fólico, de los taxanos, de las camptotecinas de los derivados de podofilotoxinas, de los alcaloides de vinca, de las caliqueamicinas, de los maitasinos o de los complejos de platino(II) configurados *cis*.
7. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 6,
caracterizada porque
la antraciclina abarca doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, o ametantrona y en particular doxorubicina.
8. Sustancia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-7,
caracterizada porque
la molécula espaciadora es una molécula orgánica, que contiene una cadena alifática de carbonos y/o un anillo alifático de carbonos con 1-12 átomos de carbono, que pueden estar reemplazados parcialmente por átomos de oxígeno, y/o contiene por lo menos un radical aromático, que puede estar eventualmente sustituido.
9. Sustancia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8,
estando **caracterizada**
la sustancia **porque** es



10. Sustancia de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-9, destinada a la utilización como medicamento para el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades víricas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias agudas o crónicas o enfermedades que son provocadas por bacterias, hongos u otros microorganismos.
11. Formulación que comprende una sustancia de acuerdo con una da las reivindicaciones 1-10 y un líquido de vehículo.