

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 222**

51 Int. Cl.:

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008** **E 08841603 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 2205605**

54 Título: **Ésteres cristalinos hidratados de camptotecina para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

25.10.2007 US 923727

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2013

73 Titular/es:

**THE CHRISTUS STEHLIN FOUNDATION FOR
CANCER RESEARCH (100.0%)
1315 ST. JOSEPH PARKWAY, SUITE 1818
HOUSTON, TX 77002, US**

72 Inventor/es:

CAO, ZHISONG

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 396 222 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

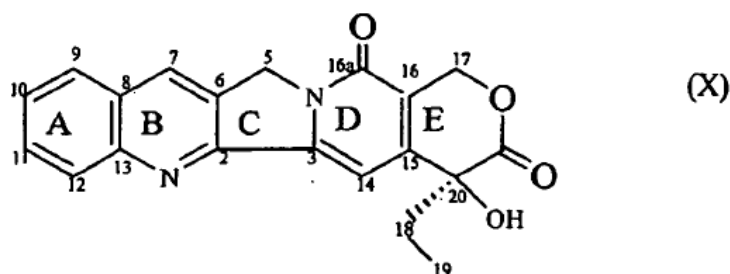
Ésteres cristalinos hidratados de camptotecina para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere a ésteres de camptotecina y ésteres de camptotecina para su uso en el tratamiento de cáncer, tumores malignos y similares.

5 La toxicidad (o efectos secundarios) que padecen los pacientes como resultado de los fármacos anticancerígenos que toman durante el proceso de quimioterapia sigue siendo el mayor enemigo asociado con el tratamiento del cáncer. El índice terapéutico (IT) de un agente anticancerígeno se define como la razón de la dosis tolerada máxima con respecto a la dosis eficaz. Se sabe que la mayoría de los agentes anticancerígenos usados clínicamente en la actualidad tienen un intervalo de IT muy estrecho (de 1 a 1,2). En otras palabras, los efectos tóxicos de la mayoría de los agentes anticancerígenos en pacientes que reciben quimioterapia son inevitables a los niveles de dosis eficaz debido al estrecho índice terapéutico asociado con los agentes anticancerígenos. Las diferencias en toxicidad entre agentes son los grados de gravedad y tipos de padecimiento. El fluorouracilo (5-FU) es uno de los agentes quimioterápicos más comúnmente usados para el tratamiento sistémico y paliativo de pacientes con cánceres que aparecen en el tubo digestivo, mama, cabeza y cuello. La dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es la enzima inicial y limitante de la velocidad en el catabolismo de 5-FU. Una deficiencia de DPD se reconoce cada vez más como un importante trastorno farmacogenético en la etiología de toxicidad grave asociada a 5-FU. Se ha notificado que pacientes con cáncer que eran genéticamente heterocigotos u homocigotos para un alelo mutante del gen que codifica para DPD padecían toxicidad grave, incluyendo muerte, tras la administración de 5-FU. Van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ *et al.* Clinical implications of dihydropyrimidinedehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clinical Cancer Res* 2000, 6: 4705-4712. Van Kuilenburg ABP, Muller EW, Haasjes J *et al.* Lethal outcome of a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 1149-1153. También se usan comúnmente agentes de platino para el tratamiento. Un número sustancial de fuentes bibliográficas documenta los efectos secundarios de los compuestos de platino. El cisplatino tiene múltiples toxicidades: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, náuseas y vómitos. DeVita VT, Hellman S, y Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005, 335. La nefrotoxicidad del cisplatino condujo casi a su abandono, hasta la introducción de hidratación agresiva por Cvitkovi y sus colaboradores, que previno el desarrollo de insuficiencia renal aguda. Cvitkovic E, Spaulding J, Bethune V, *et al.* Improvement of cis-dichlorodiamineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer* 1977, 39, 1357. Hayes D, Cvitkovic E, Golbey R, *et al.* High dose cis-platinum diamine dichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis. *Cancer* 1977, 39, 1372. Algunos consideraron que la toxicidad del cisplatino era una fuerza impulsora en la historia tanto en la búsqueda de análogos menos tóxicos como de un tratamiento más eficaz para sus efectos secundarios. La mielosupresión, que habitualmente no es grave con el cisplatino, es la toxicidad limitante de la dosis del carboplatino. Evens B, Raju K. Calvert A, *et al.* Phase II study of JM8, a new platinum analogue, in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 997, 1983. La toxicidad limitante de la dosis del oxaliplatino es la neuropatía sensorial (una característica de todos los derivados de platino que contienen DACH). DeVita VT, Hellman S, y Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005, 335. Los agentes alquilantes también desempeñan papeles importantes en tratamientos del cáncer. Cada agente alquilante está asociado con una toxicidad específica y no se comenta individualmente. Las siguientes toxicidades son comunes a los agentes alquilantes como clase: toxicidad hematopoyética, toxicidad gastrointestinal, toxicidad gonadal, toxicidad pulmonar, alopecia, teratogenicidad, carcinogénesis e inmunosupresión. DeVita VT, Hellman S, y Rosenberg SA. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005, 335. La toxicidad limitante de la dosis habitual para un agente alquilante es la toxicidad hematopoyética. Los agentes que interaccionan con la topoisomerasa han obtenido cada vez más atenciones de los oncólogos clínicos por sus mecanismos de acción únicos. El topotecán es un producto semisintético de la 10-hidroxicamptotecina que se produce de manera natural y está indicado en el tratamiento de segunda línea de cánceres de pulmón de células pequeñas y de ovarios resistentes avanzados, y también ha sido activo en el tratamiento de tumores malignos hematológicos, incluyendo síndromes mielodisplásicos y mieloma múltiple. Huinink W, Gore M, Carmichael J, *et al.* Topotecan versus paclitaxol for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1997, 15, 2183; Schiller JH, Adak S, Cella D, *et al.* Topotecan versus observation after cisplatin plus etoposide in extensive-stage small-cell lung cancer: E7593-a phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001, 19, 2114; von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA, *et al.* Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17, 658, Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet* 2003, 361, 2235. La toxicidad limitante de la dosis de este agente es la mielosupresión. Aunque el topotecán se ha combinado con una variedad de otros tratamientos, incluyendo radiación, cisplatino, paclitaxol y doxorubicina en ensayos clínicos, ninguna de estas combinaciones ha logrado ningún uso rutinario en oncología clínica. Esto puede deberse, en parte, a la frecuente toxicidad mielosupresora del topotecán que ha hecho difícil combinarlo en altas dosis con otros agentes supresores de la médula ósea. Miller AA, Lilienbaum RC, Lynch TJ, *et al.* Treatment-related fatal sepsis from topotecan/cisplatin and topotecan/paclitaxol. *J Clin Oncol* 1996, 14, 1964. El irinotecán es también un producto semisintético de la familia de la camptotecina. Este compuesto está indicado como agente individual o en combinación con fluorouracilo y leucovorina en el tratamiento de pacientes con cánceres colorrectales y también se encuentra que es activo en cáncer de pulmón de células pequeñas cuando se administra en combinación con

cisplatino. Se ha encontrado que esta combinación es también activa en cáncer de pulmón de células no pequeñas. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan study group. N Engl J Med 2002, 343, 905; Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. Lancet 2000, 355, 1041; Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. Lancet 2003, 361, 2235. Las toxicidades limitantes de la dosis de irinotecán son neutropenia y diarrea de aparición retardada, y sus usos en oncología clínica son por tanto limitados también. El resto de agentes anticancerígenos heterogéneos, incluyendo erbitux y avastina recientemente comercializados, pueden usarse para un número limitado de tratamientos específicos, pero están asociados también con toxicidades. Por tanto, es todavía un gran desafío para los investigadores del cáncer y los oncólogos clínicos encontrar mejores agentes con un índice terapéutico más amplio para el tratamiento.

Se mostró que la camptotecina, un alcaloide citotóxico aislado por primera vez de la madera y la corteza de *Camptotheca Acuminata* (Nyssaceae) por Wall y sus colaboradores (J. Am. Chem. Soc. 88, 3888, 1966), tenía actividad antitumoral frente al sistema L 1210 de leucemia de ratón. La estructura de la camptotecina, un alcaloide que tiene un grupo alcaloide indol que se produce de manera natural (Heckendorf *et al.*, J Org. Chem. 41, 2045, 1976), se muestra a continuación como fórmula (X).



Este compuesto ("CPT") tiene un sistema de anillos pentacíclico con sólo un centro asimétrico en el anillo E con una configuración 20(S). El sistema de anillos pentacíclico incluye un resto de pirrolo[3,4-b]quinolina (anillos A, B y C), una piridona conjugada (anillo D) y una lactona de seis miembros (anillo E) con un grupo α -hidroxilo. La camptotecina fue de gran interés desde el momento de su aislamiento inicial debido a su actividad notable en el sistema L 1210 de leucemia de ratón. Se obtuvieron datos preliminares de la actividad antitumoral de la camptotecina empleando tumores malignos trasplantados experimentalmente tales como leucemia L 1210 en ratones, o tumor de Walker 256 en ratas (Chem. Rev. 23, 385, 1973, Cancer Treat. Rep. 60, 1007, 1967). Estudios clínicos posteriores mostraron que este compuesto no podía usarse como agente anticancerígeno *in vivo* debido a su alta toxicidad. La camptotecina por sí misma es insoluble en agua. Por tanto, la camptotecina se evaluó clínicamente como una sal de carboxilato de sodio soluble en agua en los primeros momentos. Esta forma de camptotecina producía toxicidad grave y parecía carecer de actividad anticancerígena (Gottlieb *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 54, 461, 1970, y 56, 103, 1972, Muggia *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 56, 515, 1972, Moertel *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 56, 95, 1972, y Schaeppi *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 5:25, 1974). Estos resultados produjeron la interrupción de los ensayos de fase II. La evaluación continuada de este agente mostró que la sal de carboxilato de sodio es sólo un 10% tan potente como la camptotecina nativa con el anillo de lactona cerrado intacto (Wall *et al.*, en International Symposium on Biochemistry and Physiology of The Alkaloids, Mothes *et al.*, eds., Akademie - Verlag, Berlín, 77, 1969, Giovanella *et al.*, Cancer res. 51, 3052, 1991). Además, se han establecido importantes parámetros para la actividad antitumoral en la familia de la camptotecina (Wall *et al.*, Ann. Rev., Pharmacol. Toxicol. 17, 117, 1977). Estos resultados indican que un anillo de lactona intacto E y un grupo α -hidroxilo son esenciales para la actividad antitumoral.

A mediados de la década de 1980, se encontró que la diana molecular de las camptotecinas era la enzima nuclear novedosa topoisomerasa I. Hsiang YH, Liu LF. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of anticancer drug camptothecin. Cancer Res 1988, 48, 1722. Aproximadamente al mismo tiempo, se prepararon varios derivados de camptotecina solubles en agua nuevos, incluyendo dos compuestos (topotecán e irinotecán) comentados anteriormente, y se evaluaron biológicamente. Las evaluaciones clínicas posteriores de los dos compuestos demostraron las toxicidades predecibles y la actividad anticancerígena significativa. Takimoto CH, Arbuck SG. Topoisomerase I targeting agents: the camptothecins. En: Chabner BA, Longo DL, eds., Cancer therapy & biotherapy: principles and practice, 3ª ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins 2001, 579. El topotecán se aprobó en 1996 como tratamiento de segunda línea para cáncer de ovarios avanzado, y posteriormente obtuvo la indicación para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas resistente. Exactamente al mismo tiempo, se registró el irinotecán para el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado resistente a 5-fluorouracilo. Éste representa actualmente el primer agente nuevo en obtener la aprobación para el tratamiento de esta enfermedad en los Estados Unidos en casi 40 años.

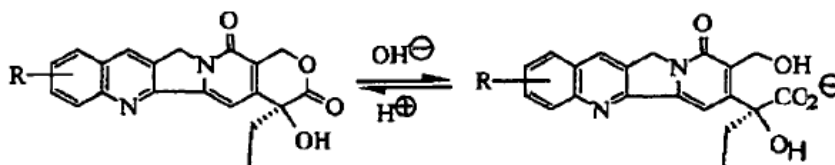
En 1989, Giovanella *et al.* encontraron que algunos de los derivados no solubles en agua de la camptotecina tienen

alta actividad antitumoral frente a xenoinjertos de tumores humanos (Giovannella *et al.*, Science, 246, 1046, 1989). Se mostró también que la administración de camptotecina con anillo de lactona cerrado es superior a inyecciones de sal de carboxilato soluble en agua (Giovannella *et al.*, Cancer Res., 51, 3052, 1991). Estos hallazgos confirmaron adicionalmente la importancia del anillo de lactona intacto para la actividad biológica.

La apertura del anillo de 20(S)-camptotecina conduce a una actividad anticancerígena mucho más potente en ratones que en seres humanos. En efecto, CPT administrada por vía intramuscular ("i.m."), por vía subcutánea ("s.c.") e intraestomacal ("i.e.") ha demostrado ser un agente anticancerígeno muy potente contra tumores humanos en ratones, es decir, cuando se hacen crecer como xenoinjertos en ratones desnudos (Giovannella *et al.*, Cancer Res. 51:3052, 1991). Sin embargo, cuando se trataron los tumores con CPT en seres humanos, se mostraba un grado inferior de actividad anticancerígena en seres humanos que en ratones (Stehlin *et al.*, en Camptothecins: New Anticancer Agents, 1995, CRC Press, págs. 59-65).

Se observó el mismo fenómeno con otros derivados de CPT. En ratones, se ha demostrado que 9-nitrocamptotecina ("9NC") es 2-3 veces más potente que CPT frente a xenoinjertos de tumores humanos provocando la total erradicación de todos los tumores malignos humanos tratados (Pantazis *et al.*, Cancer Res. 53:1577, 1993; Pantazis *et al.*, Int. J. Cancer 53:863, 1995).

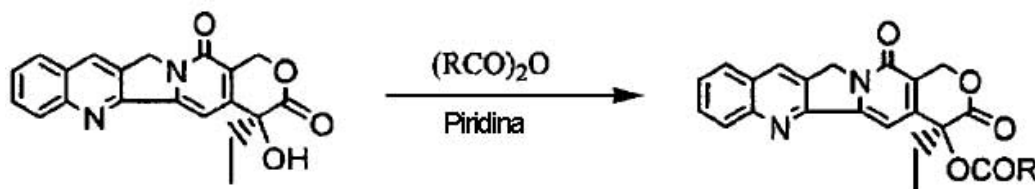
La apertura del anillo es particularmente problemática porque las camptotecinas existen en dos formas distintas. La camptotecina que se produce de manera natural tiene una configuración S y es de 10 a 100 veces más activa biológicamente que el isómero R. Se cree que la forma de lactona con configuración S se requiere para la actividad antitumoral, y la forma de carboxilato se relaciona habitualmente con toxicidades clínicas. La molécula existe en equilibrio en disolución acuosa. Este equilibrio depende del pH. A pH fisiológico, es decir, 7 o por encima, la ecuación de equilibrio es tal como sigue:



La reacción de hidrólisis del anillo de lactona biológicamente activo de las camptotecinas con agua a pH superior proporciona la forma abierta biológicamente inactiva. Adicionalmente, el problema de la hidrólisis con CPT y sus análogos se agrava en la sangre humana porque la albúmina sérica humana (HSA) predominante se une preferentemente a la forma de carboxilato, que desplaza el equilibrio lactona/carboxilato hacia la forma inactiva (J Biochem., 121, 285-287, 1993; Biochemistry, 33, 10325-10336, 1994; Biochemistry, 33, 12540-12545, 1994). Por consiguiente, la conservación del anillo de lactona de la molécula durante un tiempo suficiente para que las células tumorales experimenten un ciclo a través de la fase S es un desafío importante y ha sido el centro de una considerable cantidad de investigación.

Se han hecho varios intentos de proporcionar derivados de camptotecina que tengan mayor actividad biológica y estabilidad potenciada. Muchos de estos compuestos son los productos de modificaciones en los anillos A, B y C de la molécula, pero pocas de estas modificaciones han potenciado la estabilidad del anillo de lactona en condiciones fisiológicas. Otros enfoques han sido más satisfactorios. Por ejemplo, la acilación del grupo 20-OH proporciona una herramienta útil para la protección del anillo de lactona. E. Wall *et al.*, patente estadounidense n.º 4.943.579, describen varios compuestos de camptotecina acilados que tienen solubilidad en agua, aunque la lactona puede no permanecer intacta en condiciones fisiológicas. La patente estadounidense n.º 5.968.943 concedida a Cao *et al.* da a conocer derivados de CPT que son agentes antitumorales eficaces.

Se notifican varias reacciones diferentes en la bibliografía para preparar ésteres de camptotecina.



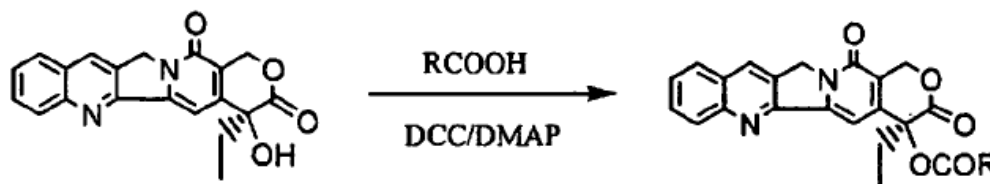
CPT

Ésteres de CPT

Se empleó la acilación directa de camptotecina con anhídridos de ácido orgánico con piridina como catalizador para preparar ésteres alquílicos y alquénílicos de camptotecina (tal como se mostró anteriormente). Esta reacción proporciona habitualmente altos rendimientos, pero la disponibilidad de anhídridos de ácido orgánico restringe el alcance de la reacción.

Se usó por tanto un sistema de reactivos de diciclohexilcarbodiimida (DCC)/dimetilaminopiridina (DMAP), para las reacciones de acilación de ácidos carboxílicos con alcoholes y tioles.

Anteriormente, se usó un método para preparar ésteres de camptotecina aromáticos (tal como se muestra a continuación).

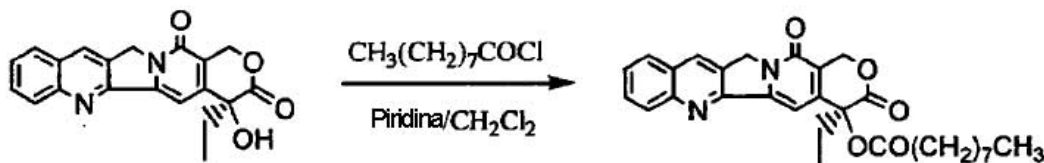


CPT

Ésteres de CPT

Este procedimiento, sin embargo, proporciona buenos rendimientos de reacción sólo cuando los ácidos carboxílicos son muy electrófilos. Cuando los ácidos son menos electrófilos, la reacción proporciona un bajo rendimiento o nada de producto esperado en absoluto. Por ejemplo, cuando se usó ácido propiónico para preparar propionato de camptotecina con este procedimiento, el producto de éster no se obtenía esencialmente y se recuperaba la camptotecina de partida casi al 100%.

Se usó también cloruro nonanoico como agente acilante para esterificar camptotecina con piridina como agente de atrapamiento de HCl en cloruro de metileno. La reacción (tal como se muestra a continuación) se produjo con un bajo rendimiento (6%).



CPT

Nonanoato de CPT

Puesto que las características estructurales de la camptotecina proporcionan una plataforma ideal a los investigadores del cáncer para modificar la estructura para obtener mejores agentes anticancerígenos, se han sintetizado y evaluado muchos ésteres de camptotecina diferentes. Se ha encontrado que los productos de esterificación aumentaban en gran medida la vida biológica de las moléculas en el cuerpo. Se ha mostrado también que el tratamiento de tumores humanos hechos crecer en xenoinjertos en ratones desnudos con ésteres de camptotecina sintéticos es eficaz, y que la toxicidad en ratones es mínima. Cao, Z.; Pantazis, P.; Mendoza, J.; Early, J.; Kozielski, A.; Harris, N.; Vardeman, D.; Liehr, J.; Stehlin, J.; Giovanella, B. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000, 922, 122; Cao, Z.; Pantazis, P.; Mendoza, J.; Early, J.; Kozielski, A.; Harris, N.; Giovanella, B. Acta Pharmacologica Sinica 2003, 24, 109.

Aunque existen muchos métodos para preparar ésteres de camptotecina, sin embargo, cada procedimiento tiene determinadas restricciones tal como se mencionó anteriormente. Por tanto, hay todavía una necesidad de desarrollar ésteres de camptotecina que conserven la actividad antitumoral del compuesto original, CPT, que tengan una toxicidad mucho más baja que CPT y que puedan producirse mediante procedimiento(s) alternativo(s) para preparar ésteres de camptotecina.

Por consiguiente, una característica de la presente invención es proporcionar un hidrato de éster de camptotecina cristalino que demuestra un amplio espectro de actividad antitumoral y preferiblemente toxicidad baja o no observable.

Otra característica de la presente invención es proporcionar un hidrato de éster de camptotecina cristalino que tiene un intervalo de índice terapéutico más amplio que la mayoría de los agentes anticancerígenos usados en la actualidad.

Otra característica de la presente invención es proporcionar un método seguro y sencillo para preparar un hidrato de éster de camptotecina cristalino.

Una característica adicional de la presente invención es proporcionar hidratos de éster de camptotecina cristalinos que conservan una actividad antitumoral significativa como el compuesto original, CPT, y tienen una toxicidad mucho más baja que su compuesto original.

Aún otra característica de la presente invención es proporcionar hidratos de éster de camptotecina cristalinos que

tienen buena capacidad de absorción en el organismo vivo.

Para lograr las características y según los fines de la presente invención, tal como se realiza y se describe ampliamente en el presente documento, la presente invención, en parte, se refiere a hidratos de éster de camptotecina cristalinos, tales como hidratos de éster alifático cristalino de camptotecina, como hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino ("CZ48"), a composiciones farmacéuticas que comprenden hidratos de éster alifático cristalinos de camptotecina, a hidratos de éster de camptotecina cristalinos para su uso en el tratamiento de un cáncer o tumor maligno y a métodos de preparación de ésteres de camptotecina cristalinos hidratados que comprenden hacer reaccionar un compuesto de camptotecina con al menos un agente acilante protonado mediante al menos un ácido.

Se expondrán características y ventajas adicionales de la presente invención en parte en la descripción que sigue, y en parte resultarán evidentes a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la presente invención. Los objetivos y otras ventajas de la presente invención se comprenderán y lograrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente apuntadas en la descripción y reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicación únicamente y pretenden proporcionar una explicación adicional de la presente invención, tal como se reivindica.

La figura 1 es un diagrama ORTEP de una molécula individual del producto.

La figura 2 es un diagrama ORTEP que muestra dos moléculas de hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino unidas entre sí mediante un puente acuoso.

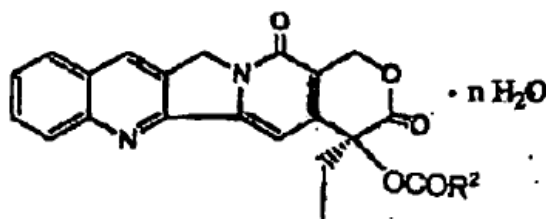
La figura 3 es un diagrama ORTEP que muestra la estructura tridimensional (dimensiones a, b) de hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino.

La figura 4 es un diagrama ORTEP que muestra la estructura tridimensional (dimensiones a, c) de hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino.

La figura 5 es un diagrama ORTEP que muestra la estructura tridimensional (dimensiones b, c) de hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino.

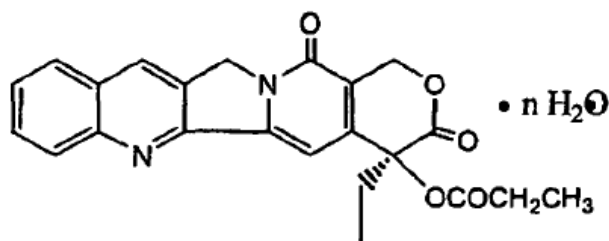
Las camptotecinas ("CPTs") tienen considerable actividad antitumoral y anticancerígena, pero estos compuestos son susceptibles de degradación en condiciones fisiológicas normales, y los metabolitos producidos a menudo presentan propiedades tóxicas. Los estudios de metabolismo de camptotecina en plasma humano llevados a cabo en el laboratorio mostraron que el único metabolito detectado es la sal de carboxilato de sodio de anillo abierto que es tóxica e inactiva. La medición de la farmacocinética para CPT en plasma humano indica que el tiempo de semivida del fármaco con el anillo de lactona intacto es de aproximadamente 30 min. Estos resultados implican que el fármaco perderá el 90% de su actividad y producirá mucha toxicidad en un tiempo muy corto después de que lo tomen los pacientes.

Según diversas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden comprender ésteres alifáticos cristalinos de CPT en forma hidratada que tienen la fórmula



En esta fórmula, n puede representar cualquier número que oscila entre 1 y 10 o más, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. R² representa un grupo alquilo C₂-C₆, tal como un grupo alquilo C₂-C₄. En una o más realizaciones, R² es -CH₂CH₃; -CH₂CH₂CH₃; -CH₂CH₂CH₂CH₃; o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃. Como una realización más específica, n representa 3 y R² es -CH₂CH₃ o -CH₂CH₂CH₃.

Según al menos una realización, los compuestos de la presente invención pueden comprender hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino que tiene la fórmula mostrada a continuación:



En esta fórmula, n puede representar cualquier número que oscila entre 1 y 10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

Como ejemplo, se determinó la estructura de hidrato de 20-propionato de camptotecina cristalino mediante análisis de rayos X de monocristales, tal como se muestra en las figuras 1-5. La figura 1 muestra el diagrama ORTEP de una molécula individual del producto. Una molécula de 20-O-propionato de camptotecina y aproximadamente 3 moléculas de agua se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno fuertes. Pueden unirse más de una molécula de 20-O-propionato de camptotecina en una unidad cristalina entre sí a través de un puente compuesto por moléculas de H₂O. La figura 2 muestra dos moléculas de 20-O-propionato de camptotecina unidas entre sí mediante un puente acuoso. Las figuras 3-5 muestran las estructuras tridimensionales del cristal. Otros ésteres de CPT de la presente invención tendrán la misma estructura excepto por la longitud de la cadena de éster.

Según la presente invención, los compuestos son cristalinos. Según al menos algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden ser cristalinos o un sólido en el que los átomos, moléculas o iones constituyentes están empaquetados en un patrón de repetición ordenado de manera regular que se extiende en las tres direcciones espaciales. Los cristales pueden ser un sistema monoclinico con tamaños de (0,10 a 0,50) x (0,01 a 0,10) x (0,01 a 0,05) mm³ y volúmenes de desde 100 hasta 5000 Å³, tales como volúmenes de desde 200 hasta 4500 Å³ o desde 500 hasta 4000 Å³, o desde 750 hasta 3500 Å³, o desde 1000 hasta 3000 Å³, o desde 1250 hasta 2500 Å³, o desde 1500 hasta 2200 Å³.

Tal como se usa en el presente documento, "cristalino" se refiere a un material que contiene un compuesto específico, que puede estar hidratado y/o solvatado, y tiene un contenido en cristal suficiente como para presentar un patrón de difracción discernible mediante XRPD u otras técnicas de difracción. A menudo, un material cristalino que se obtiene a partir de un disolvente mediante cristalización directa de un compuesto disuelto en una disolución o una interconversión de cristales obtenidos en diferentes condiciones de cristalización tendrá cristales que contienen el disolvente, denominados solvato cristalino. Los ejemplos de propiedades de cristal incluyen la orientación de los restos químicos del compuesto unos con respecto a los otros dentro del cristal y el predominio de una forma específica del compuesto, que se ve favorecida por la presencia de un ácido en la composición de disolvente.

Según al menos una realización, los compuestos de la presente invención pueden tener una pureza de desde aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 100% mediante AUC (área bajo la curva). Según algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden tener una pureza de desde aproximadamente el 95% hasta aproximadamente el 100% mediante AUC. Según al menos una realización, los compuestos de la presente invención pueden tener una pureza de desde aproximadamente el 99% hasta aproximadamente el 100% mediante AUC, tal como desde el 99,3% hasta el 99,999%; del 99,5% al 99,999%; del 99,75% al 99,999%; del 99,85% al 99,999%, todas mediante AUC. Según al menos una realización, los compuestos de la presente invención pueden tener un punto de fusión de desde aproximadamente 240°C hasta aproximadamente 243°C, tal como 242°C o aproximadamente 242°C. Esto(s) punto(s) de fusión se prefiere(n) especialmente para el hidrato de éster cristalino cuando R² es -CH₂CH₃. Los puntos de fusión de los compuestos de la presente invención pueden ser inferiores o superiores al intervalo anterior cuando R² es un grupo CH₃ o C₃H₇ o C₄H₉ o C₆H₁₃.

Según diversas realizaciones, la presente invención puede comprender hidratos de éster alifático cristalinos de CPT que tienen una configuración S, una configuración R y/o mezclas racémicas de ambos isómeros S y R. Según algunas realizaciones, los hidratos de éster alifáticos cristalinos de CPT derivados de la camptotecina natural tienen sólo una configuración S o principalmente una configuración S, tal como el 90% o superior, el 95% o superior, el 98% o superior, el 99% o superior, o del 99% al 99,99%. La conversión del compuesto reivindicado en el compuesto original, CPT, puede estar mediada por un grupo de enzimas denominadas esterasas presentes en la sangre de muchos animales, incluyendo seres humanos. Puesto que los profármacos se distribuyen rápidamente por todo el cuerpo en un corto periodo de tiempo tras su administración, estos compuestos existen en una concentración muy baja en el momento en el que experimentan hidrólisis enzimática mediante la que se libera la camptotecina original, lo que impide que precipite CPT en el torrente sanguíneo.

Por tanto, la presente invención proporciona derivados o análogos de CPT cristalinos hidratados que permanecen preferiblemente intactos durante más tiempo en un organismo humano o animal, particularmente en el cuerpo humano, potenciando así los efectos antitumorales y anticancerígenos sin producir efectos secundarios no deseados.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la presente invención opcionalmente en combinación con uno o más portadores, excipientes, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden formularse en forma de comprimidos, píldoras, mezclas en polvo, cápsulas, inyectables, disoluciones, supositorios, emulsiones, dispersiones, premezclas alimenticias y en otras formas adecuadas. Pueden fabricarse también en forma de composiciones sólidas estériles, por ejemplo, liofilizadas y, si se desea, combinadas con otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones sólidas pueden reconstituirse con agua estéril, solución salina fisiológica o una mezcla de agua y un disolvente orgánico, tal como propilenglicol, etanol y similares, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso de la administración parenteral.

Portadores farmacéuticamente aceptable típicos son, por ejemplo, manitol, urea, dextranos, lactosa, azúcares no reductores, almidones de patata y maíz, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, polialquilenglicoles, etilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), carbonato de calcio, oleato de etilo, miristato de isopropilo, benzoato de bencilo, carbonato de sodio, gelatina, carbonato de potasio, ácido silícico. La preparación farmacéutica puede contener también sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes emulsionantes, conservantes y/o humectantes, y similares como por ejemplo monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, monoestearato de polioxietileno, tripalmitato de glicerilo, dioctilsulfosuccinato de sodio y similares.

Una "composición farmacológica" se refiere a una mezcla de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, con otros componentes químicos, tales como portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. El fin de una composición farmacológica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación líquido o sólido, implicado en portar o transportar el agente objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, hasta otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tamponadas con fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empeladas en formulaciones farmacéuticas. Un portador fisiológicamente aceptable no debe provocar irritación significativa en un organismo y no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado.

Un "excipiente" puede referirse a una sustancia inerte añadida a una composición farmacológica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, grasas, lípidos, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Una "cantidad farmacéuticamente eficaz" puede significar también o alternativamente una cantidad que puede proporcionar un efecto terapéutico y/o profiláctico. La dosis específica de compuesto administrada según esta invención para obtener un efecto terapéutico y/o profiláctico se determinará, por supuesto, mediante las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo, por ejemplo, el compuesto específico administrado, la vía de administración, el estado que está tratándose y el individuo que esta tratándose. Una dosis diaria típica (administrada en dosis individuales o divididas) contendrá un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 50-100 mg/kg de peso corporal del principio activo de la invención. Las dosificaciones diarias pueden ser de desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg o desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg.

En algunas realizaciones, el efecto terapéutico preferido es la inhibición, en algún grado, del crecimiento de células características de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer de mama o cáncer pancreático. Un efecto terapéutico normalmente también aliviará, pero no necesariamente, en algún grado uno o más de los síntomas distintos de crecimiento celular o tamaño de la masa celular. Un efecto terapéutico puede incluir, por ejemplo, uno o más de 1) una reducción en el número de células; 2) una reducción en el tamaño de las células; 3) inhibición (es decir, ralentización en algún grado, preferiblemente detección) de la infiltración de células en órganos periféricos, por ejemplo, en el caso de metástasis cancerígena; 4) inhibición (es decir, ralentización en algún grado, preferiblemente detección) de la metástasis tumoral; 5) inhibición, en algún grado, del crecimiento celular; y/o 5) alivio en algún grado de los síntomas asociados con el trastorno.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden contener también el principio activo en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Pueden prepararse composiciones destinadas para uso oral según cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y tales composiciones pueden contener agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y/o agentes conservantes. Los comprimidos pueden contener el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes disgregantes y de granulación, tales como celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina, polivinilpirrolidona o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar no recubiertos o recubiertos mediante técnicas conocidas para enmascarar el sabor del fármaco o retrasar la disgregación y absorción en el tubo digestivo y de ese modo proporcionar una acción sostenida a lo largo de un periodo más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse material de enmascaramiento del sabor soluble en agua tal como hidroxipropilmetilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, o un material de retraso temporal tal como etilcelulosa, o acetato-butirato de celulosa, según sea apropiado.

También pueden estar presentes formulaciones para uso oral como cápsulas de gelatina duras en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas en las que el principio activo se mezcla con un portador soluble en agua tal como polietilenglicol o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas pueden contener el material activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes pueden ser agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes humectantes o de dispersión pueden ser una fosfátida que se produce de manera natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetileno-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitano. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, sacarina o aspartamo.

Pueden formularse suspensiones oleosas suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como hidroxianisol butilado o alfa-tocoferol.

Polvos y gránulos dispersables para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente humectante o de dispersión, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Se muestran a modo de ejemplo agentes humectantes o de dispersión y agentes de suspensión adecuados mediante los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden estar también en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser fosfátidas que se producen de manera natural, por ejemplo lecitina de soja, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitano, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, conservantes y/o antioxidantes.

Pueden formularse jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden contener también un emoliente, un conservante, agentes aromatizantes y colorantes y un antioxidante.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una disolución acuosa inyectable estéril. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse, están agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica.

La preparación inyectable estéril puede ser también una microemulsión de aceite en agua inyectable estéril en la que el principio activo se disuelve en la fase oleosa. Por ejemplo, el principio activo puede disolverse en primer lugar en una mezcla de aceite de soja y lecitina. La disolución de aceite se introduce entonces en una mezcla de agua y glicerol y se procesa para formar una microemulsión.

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril para administración intramuscular y subcutánea. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida usando agentes humectantes o de dispersión y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una suspensión o disolución inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol.
- 10 Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono y diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

- 15 Los compuestos de la presente invención para su uso según la presente invención pueden administrarse también en forma de supositorios para administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando los inhibidores con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto liberando el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, gelatina glicerizada, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

- 20 Para uso tópico, pueden usarse cremas, pomadas, jaleas, disoluciones o suspensiones, etc., que contienen un compuesto o una composición de la invención. Tal como se usa en el presente documento, la aplicación tópica puede incluir lavados bucales y gargarismos.

- 25 Los compuestos para su uso según la presente invención pueden administrarse en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados y dispositivos de administración, o por vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidas por los expertos habituales en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en vez de intermitente a lo largo de todo el régimen de dosificación.

- 30 Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden usarse también conjuntamente con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad particular frente al estado que está tratándose. Por ejemplo, los presentes compuestos pueden ser útiles en combinación con agentes citotóxicos y anticancerígenos conocidos. Además, los presentes compuestos pueden ser también útiles en combinación con otros inhibidores de partes de la ruta de señalización que vinculan receptores de factores de crecimiento de la superficie celular con señales nucleares que inician la proliferación celular.

- 35 Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica útil para tratar cáncer en un animal de sangre caliente, composición que comprende al menos un compuesto de la invención tal como se define en el presente documento en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición se prepara según técnicas de formulación conocidas para proporcionar una composición adecuada para administración oral, tópica, transdérmica, rectal, mediante inhalación, parenteral (intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), y similares. Se encuentra orientación detallada para preparar composiciones de la invención haciendo referencia a la 18ª o 19ª edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, publicado por Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18040.

- 40 Se contemplan formas de dosis unitarias o múltiples dosis, ofreciendo cada una ventajas en determinadas situaciones clínicas. La dosis unitaria contendría una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el/los efecto(s) deseado(s) en la situación de tratamiento del cáncer. La forma de múltiples dosis puede ser particularmente útil cuando se requieren múltiples dosis individuales, o dosis fraccionadas, para lograr los fines deseados. Cualquiera de estas formas de dosificación puede tener especificaciones que están dictadas por o
- 45 dependen directamente de la característica única del compuesto particular, el efecto terapéutico particular que ha de lograrse y cualquier limitación inherente en la técnica de preparación del compuesto particular para el tratamiento del cáncer.

- 50 Una dosis unitaria puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar cáncer en un sujeto y puede contener de desde aproximadamente 1,0 hasta 1000 mg de compuesto, por ejemplo de aproximadamente 50 a 500 mg.

- 55 El compuesto puede administrarse por vía oral en una formulación adecuada como un comprimido ingerible, un comprimido bucal, una cápsula, un comprimido oblongo, un elixir, una suspensión, un jarabe, un trocisco, una oblea, una pastilla para chupar y similares. Generalmente, la formulación más sencilla es un comprimido o una cápsula (designada individual o colectivamente "unidad de dosificación oral"). Se preparan formulaciones adecuadas según técnicas de formulación convencionales disponibles que hacen coincidir las características del compuesto con los excipientes disponibles para formular una composición apropiada. Un comprimido o una cápsula contendrá de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg de un compuesto de la presente invención.

La forma puede administrar un compuesto rápidamente o puede ser una preparación de liberación sostenida. El

- compuesto puede estar contenido en una cápsula dura o blanda, puede comprimirse para dar comprimidos o puede incorporarse con bebidas, alimentos o de otra forma en la dieta. El porcentaje de la composición final y las preparaciones, por supuesto, puede variarse y puede oscilar convenientemente entre el 1 y el 90% del peso de la forma final, por ejemplo, comprimido. La cantidad en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Pueden prepararse composiciones según la presente invención de modo que una forma unitaria de dosificación oral contenga entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 50% en peso (%) en peso) en unidades de dosificación que pesen entre 50 y 1000 mg.
- La formulación adecuada de una unidad de dosificación oral puede contener también: un aglutinante, tal como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina; agentes edulcorantes tales como lactosa o sacarosa; agentes disgregantes tales como almidón de maíz, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; o un aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o similares. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimiento o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosificación oral. La unidad de dosificación oral puede recubrirse con laca, un azúcar o ambos. El jarabe o elixir puede contener el compuesto, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservante, un colorante y aromatizante. Cualquier material utilizado debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico. Pueden encontrarse detalles de los tipos de excipientes útiles en la decimonovena edición de "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Mack Printing Company, Easton, Pa. Véanse en particular los capítulos 91-93 para una discusión más completa.
- El compuesto puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. El portador o excipiente o mezcla de excipientes puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, diversos disolventes polares o no polares, mezclas adecuadas de los mismos o aceites. Tal como se usa en el presente documento, "portador" o "excipiente" significa un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable e incluye todos y cada uno de los disolventes, agentes o medios de dispersión, recubrimiento(s), agentes antimicrobianos, agentes iso/hipo/hipertónicos, agentes de modificación de la absorción y similares. El uso de tales sustancias y los agentes para principios farmacéuticamente activos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Además, también pueden incorporarse otros principios activos o principios activos complementarios a la composición final.
- Pueden prepararse disoluciones del compuesto en diluyentes adecuados tales como agua, etanol, glicerol, polietilenglicoles líquidos, diversos aceites y/o mezclas de los mismos, y otros conocidos por los expertos en la técnica.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones, dispersiones, emulsiones estériles y polvos estériles. La forma final debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Además, la forma farmacéutica final debe estar protegida frente a la contaminación y por tanto debe poder inhibir el crecimiento de microorganismos tales como bacterias u hongos. Puede administrarse una única dosis intravenosa o intraperitoneal. Alternativamente, puede utilizarse una infusión lenta de larga duración o múltiples infusiones diarias de corta duración, que duran normalmente de 1 a 8 días. Puede utilizarse también dosificación en días alternos o una vez cada varios días.
- Se preparan disoluciones inyectables, estériles incorporando un compuesto en la cantidad requerida en uno o más disolventes apropiados a los que pueden añadirse según se requiera otros componentes, enumerados anteriormente o conocidos por los expertos en la técnica. Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos componentes según se requiera. Le siguen entonces procedimientos de esterilización, tales como filtración. Normalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto en un vehículo estéril que también contiene el medio de dispersión y los otros componentes requeridos tal como se indicó anteriormente. En el caso de un polvo estéril, los métodos preferidos incluyen secado a vacío o secado por congelación al que se añaden cualquier componente requerido.
- En todos los casos, la forma final, tal como se indica, debe ser estéril y también debe poder pasar fácilmente a través de un dispositivo de inyección tal como una aguja hueca. Puede lograrse la viscosidad apropiada y mantenerse mediante la elección apropiada de disolventes o excipientes. Además, puede utilizarse el uso de recubrimientos moleculares o particulados tales como lecitina, la selección apropiada de tamaño de partícula en dispersiones, o el uso de materiales con propiedades tensioactivas.
- Puede lograrse la prevención o inhibición del crecimiento de microorganismos a través de la adición de uno o más agentes antimicrobianos tales como clorobutanol, ácido ascórbico, parabenos, timerosal o similares. También puede ser preferible incluir agentes que alteran la tonicidad tales como azúcares o sales.
- En algunos casos, por ejemplo, cuando un compuesto de la invención es bastante insoluble en agua, puede ser útil proporcionar administración liposómica. El sistema contiene el compuesto de la invención incorporando, encapsulando, rodeando o atrapando el compuesto de la invención en, sobre o mediante vesículas o liposomas lipídicos, o mediante micelas.

En una o más realizaciones de la presente invención, la presente invención se refiere a métodos para su uso en el tratamiento de diversas formas de cáncer, tumores malignos y/o precursores de cáncer o precursores de tumores malignos. Tal como se describe adicionalmente a continuación, pueden tratarse diversos cánceres y tumores malignos con la presente invención. Los compuestos de la presente invención son eficaces en el tratamiento de pacientes humanos o animales para cánceres, tumores malignos, neoplasmas o precursores de cáncer. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, leucemia, melanoma, tumor de hígado, mama, colorrectal, rectal, ovarios, próstata, estómago, vejiga, desmoplásico de células redondas pequeñas (TDCRP), tumores de páncreas, pulmón, riñón, colon, sistema nervioso central o cualquier combinación de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, el término "tumor maligno" pretende abarcar todas las formas de carcinomas, sarcomas y melanomas animales o humanos que pueden producirse en las formas escasamente diferenciada, moderadamente diferenciada y bien diferenciada.

Otra importante característica de los compuestos de la presente invención se refiere a la toxicidad global relativamente baja o no aparente. La toxicidad global puede evaluarse usando diversos criterios. Por ejemplo, la pérdida de peso corporal en un sujeto por encima del 10% del peso corporal registrado inicialmente (es decir, antes del tratamiento) puede considerarse como un signo de toxicidad. Además, la pérdida de actividad y movilidad global y signos de diarrea o cistitis en un sujeto también pueden interpretarse como pruebas de toxicidad.

Los hidratos de éter alifático cristalino de CPT demuestran un amplio espectro de actividad sin toxicidad observable en ratones a intervalos de dosis variables. El índice terapéutico puede determinarse mediante pruebas en ratones desnudos, tal como el índice terapéutico promedio a partir de ratones de prueba que tienen un xenoinjerto de tumor que es un tumor canceroso de vejiga, mama, colon, riñón, pulmón, melanoma, páncreas, próstata, ovarios y/o cualquiera de los cánceres mencionados en el presente documento. Además, el índice terapéutico de este agente está tremendamente mejorado en comparación con la mayoría de los agentes anticancerígenos usados clínicamente en la actualidad por los oncólogos. El índice terapéutico de los hidratos de éter alifático cristalino de CPT puede oscilar entre 2 y 500 (por ejemplo, 3 y 500, 4 y 50, 3 y 10, 4 y 15, 5 y 20, 8 y 20, 10 y 20, 25 y 500, 50 y 500, 75 y 500, 100 y 500, 150 y 500, 200 y 500, 250 y 500, 300 y 500, 350 y 500, 400 y 500, 450 y 500) cuando se considera que 2000 mg/kg es la dosis tolerada máxima. El índice terapéutico para la mayoría de los agentes anticancerígenos actualmente usados en la oncología clínica, sin embargo, es de aproximadamente 1, que es muy estrecho. Además, ninguno de los agentes anticancerígenos usados actualmente puede usarse de manera continua durante una larga duración a la dosis eficaz. Los compuestos de la presente invención puede usarse de manera continua de manera diaria o semanal o mensual durante 2 meses, de 3 meses a 12 meses, de 4 meses a 15 meses, de 5 meses a 15 meses, de 6 meses a 24 meses, o más.

Según diversas realizaciones, los hidratos de éter alifático cristalino de CPT pueden administrarse en combinación con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, tales composiciones farmacéuticas pueden contener rutinariamente, por ejemplo, sales, agentes de tamponamiento, conservantes y/o portadores compatibles farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una o más sustancias de carga, diluyentes o de encapsulación sólidas o líquidas compatibles que son adecuadas para su administración a mamíferos incluyendo seres humanos. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una o más cápsulas de gelatina, gránulos de colesterol, microsuspensiones en emulsiones lipídicas y de tipo lipídico (Intralipid 10, Intralipid 20 o aceites naturales), u otros emulsionantes adecuados para compuestos lipófilos. La cantidad de un principio activo (hidratos de éter alifático cristalino de CPT) contenida en la composición farmacéutica según la invención puede variar dependiendo de muchos factores tales como la vía de administración y los tipos de dianas (por ejemplo, tipos de cáncer) frente a los que se usan los compuestos.

En el tratamiento o retardo de tumores malignos en mamíferos según la presente invención, los compuestos o composiciones farmacéuticas de los mismos de la presente invención se administran mediante medios conocidos por los expertos en técnica, tales como, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía transdérmica o por vía oral. Pueden usarse métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, cápsulas de gelatina para administración oral, así como formulaciones tales como microsuspensiones en emulsiones lipídicas y de tipo lipídico (por ejemplo, Intralipid 20, aceite de semilla de algodón y aceite de cacahuete) para administración intramuscular e inclusión en gránulos de colesterol para administración subcutánea de larga duración. Otra forma de administración de los compuestos de la presente invención es mediante una vía transdérmica o transcutánea. Un ejemplo de una realización de este tipo es el uso de un parche. En particular, puede prepararse un parche con una suspensión fina de un compuesto dado a conocer en la presente solicitud en, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), o una mezcla de DMSO con aceite de semilla de algodón y se llevarse en contacto con la piel de los mamíferos que portan el tumor lejos del sitio de ubicación del tumor dentro de una bolsa de piel. Otros medios o mezclas de los mismos con otros disolventes y soportes sólidos funcionarían igualmente también. El parche puede contener el hidrato de CPT de la presente invención en forma de una disolución o suspensión. El parche puede aplicarse entonces a la piel del paciente, por ejemplo, por medio de inserción en una bolsa de piel del paciente formada plegando y sosteniendo la piel junta por medio de suturas, pinzas u otros dispositivos de sujeción. Esta bolsa debe emplearse de tal manera que se garantice un contacto continuo con la piel sin la interferencia del mamífero. Además de usar una bolsa de piel, puede usarse cualquier dispositivo que garantice la colocación firme del parche en contacto con la piel. Por ejemplo, podría usarse un vendaje adhesivo para sostener el parche en su lugar sobre la piel.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de los compuestos de la presente invención pretende significar la cantidad del compuesto que inhibirá el crecimiento de, o retardará el cáncer, o destruirá células malignas, y provocará la regresión y alivio de tumores malignos, es decir, reducirá el volumen o tamaño de tales tumores o eliminará el tumor en su totalidad.

Con los mamíferos, incluyendo seres humanos, las cantidades eficaces pueden administrarse basándose en el área de superficie corporal. La interrelación de las dosificaciones varía para animales de diversos tamaños y especies, y para seres humanos (basándose en mg/M² de superficie corporal) se describe por E.J. Freireich *et al.*, Cancer Chemother. Rep. 50(4): 219 (1966). El área de superficie corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y el peso de un individuo (véase, por ejemplo, Scientific Tables. Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N. Y. págs. 537-538 (1970)). Una cantidad eficaz de los compuestos de camptotecina en la presente invención puede oscilar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal al día.

Las cantidades o dosificaciones eficaces preferidas de los compuestos de la presente invención son de 1 a 100 mg/kg de peso corporal dos veces a la semana para una vía intramuscular y de 1 a 500 mg/kg/día para la vía oral. Cantidades o dosificaciones eficaces de derivados de CPT de la presente invención son, por ejemplo, de 1 mg/kg/semana a 100 mg/kg/semana para la vía transdérmica. Para todas las vías de administración, el momento exacto de administración de las dosificaciones puede variarse para lograr resultados óptimos. Generalmente, cuando se usa Intralipid 20 como portador, la dosificación real que alcanza al paciente será menor. Esto se debe a algo de pérdida del compuesto en las paredes de las jeringas, agujas y recipientes de preparación, lo que es prevalente con la suspensión en Intralipid 20. Cuando se usa un portador, tal como aceite de semilla de algodón, esta pérdida descrita anteriormente no es prevalente porque el compuesto no se adhiere tanto a las superficies de las jeringas, agujas, recipientes de preparación y similares. Por ejemplo y de manera preferible, generalmente se ha encontrado que aproximadamente 2,5 mg/kg de peso corporal dos veces a la semana usando aceite de semilla de algodón, administrados mediante una vía intramuscular, administrarán la misma cantidad al paciente que 4,0 mg/kg de peso corporal dos veces a la semana usando Intralipid 20 como portador. Generalmente, se añade de 1 mg a 4 mg de compuesto a de 0,1 ml a 1 ml de portador.

En una o más realizaciones de la presente invención, uno o más compuestos de la presente invención (o una composición que contiene el/los compuesto(s) de la presente invención) pueden solubilizarse en liposomas. Los liposomas pueden incluir, por ejemplo, lípidos tales como colesterol, fosfolípidos o micelas compuestas por tensioactivo tal como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, octilfenolpolioxietilenglicol o monooleato de sorbitano. Normalmente, los compuestos se unen a la membrana de bicapa lipídica del liposoma con alta afinidad. El compuesto unido al liposoma puede intercalarse preferiblemente entre las cadenas de acilo del lípido. El anillo de lactona del compuesto unido a la membrana, derivado de camptotecina, se retira de ese modo del entorno acuoso dentro y fuera del liposoma y por tanto está protegido de la hidrólisis. Puesto que el fármaco unido al liposoma está protegido de la hidrólisis, se conserva la actividad antitumoral del fármaco. Para los compuestos de camptotecina que tienen una afinidad inferior por la membrana del liposoma y por tanto se disocian de la membrana del liposoma para residir en el interior del liposoma, el pH del interior del liposoma puede reducirse, impidiendo de ese modo la hidrólisis de los compuestos de camptotecina.

Un grupo de sistemas de administración liposómica que puede usarse tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.552.156 y 5.736.156. Otros sistemas de administración liposómica que pueden emplearse incluyen liposomas que contienen principios activos agregados con lípidos o tensioactivos tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.827.533 y 5.882.679; vesículas lipídicas formadas con sales de ácidos grasos de alquilamonio tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.874.105; liposomas para encapsular composiciones de polvo seco de principio activo tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.783.211; sistemas de administración liposómica de fármacos para parches tópicos tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.718.914; los liposomas descritos en la patente estadounidense n.º 5.631.237; el liposoma y las composiciones complejas de lípidos descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.549.910 y 5.077.057; los liposomas usados para la liberación sostenida de fármacos esteroideos tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.043.165; los liposomas descritos en la patente estadounidense n.º 5.013.556; y los liposomas descritos en la patente estadounidense n.º 4.663.161.

Los liposomas unilamelares, también denominados vesículas lamelares sencillas, son vesículas esféricas compuestas por una membrana de bicapa lipídica que define un compartimento cerrado. La membrana de bicapa está compuesta por dos capas de lípidos; una capa interna y una capa externa. La capa externa de moléculas lipídicas está orientada con sus partes de cabeza hidrófila hacia el entorno acuoso externo y sus colas hidrófobas apuntan hacia abajo hacia el interior del liposoma. La capa interna de lípido se encuentra directamente por debajo de la capa externa; los lípidos están orientados con sus cabezas orientadas hacia al interior acuoso del liposoma y sus colas hacia las colas de la capa externa de lípidos.

Los liposomas multilamelares, también denominados vesículas multilamelares, están compuestos por más de una membrana de bicapa lipídica, membranas que definen más de un compartimento cerrado. Las membranas están dispuestas de manera concéntrica de manera que las diferentes membranas están separadas por compartimentos de manera muy similar a una piel de cebolla.

Tal como se usa en el presente documento, el término “profármacos liposómicos” significa o bien que algo o todo el profármaco de camptotecina está ubicado en uno o más de los compartimentos de un liposoma o micela, o bien que el profármaco de camptotecina está unido a la membrana del liposoma. Los sistemas de administración pueden ser un liposoma que comprende una membrana de bicapa lipídica que atrapa un profármaco de camptotecina. Tal como se usa en el presente documento, el término “unido a la membrana lipídica” significa que al menos el anillo de lactona de algo o todo del profármaco de camptotecina se une a la membrana lipídica del liposoma, y cuando el liposoma contiene más de una membrana lipídica el profármaco de camptotecina está unido a al menos 1 membrana. Esos profármacos de camptotecina que tienen una alta afinidad por tal membrana tienden a permanecer unidos a la membrana. Esos profármacos de camptotecina con una baja afinidad por la membrana del liposoma se disociarán al menos parcialmente de la membrana del liposoma y residirán en el compartimento del liposoma.

Las micelas tal como se definen en el presente documento son receptáculos esféricos compuestos por una única membrana de monocapa que define un compartimento cerrado y la membrana está compuesta por moléculas tensioactivas orientadas de modo que las colas hidrocarbonadas se orientan hacia el compartimento y las partes de cabeza polar se orientan hacia el entorno acuoso externo. Los profármacos de camptotecina, cuando se asocian con las micelas, o bien están en el compartimento, unidas a la membrana de la micela, o bien unidas a la superficie exterior de la micela.

Se han usado satisfactoriamente liposomas para administrar medicamentos a pacientes con cáncer, y se ha mostrado que son útiles clínicamente en la administración de fármacos anticancerígenos tales como doxorubicina, daunorubicina y complejos de cisplatino. Forssen, *et al.*, Cancer Res. 1992, 52: 3255-3261; Perez-Soler, *et al.* Cancer Res. 1990, 50: 4260-4266; y, Khokhar, *et al.* J. Med. Chem. 1991, 34: 325-329.

De manera similar, también se han usado micelas para administrar medicamentos a pacientes, (Brodin *et al.*, Acta Pharm. Suec. 19 267-284 (1982)) y se han usado micelas como portadores de fármacos y para la administración dirigida de fármacos, (D. D. Lasic, Nature 335: 279-280 (1992); y Supersaxo *et al.*, Pharm. Res. 8: 1286-1291 (1991)), incluyendo medicamentos contra el cáncer, (Fung *et al.*, Biomater. Artif. Cells. Artif. Organs 16: 439 y sig. (1988); y Yokoyama *et al.*, Cancer Res. 51: 3229-3236 (1991)).

Los liposomas y/o micelas que contienen los profármacos de camptotecina pueden administrarse a un paciente con cáncer, normalmente por vía intravenosa. Los liposomas y/o micelas se portan por el sistema circulatorio hasta las células cancerosas en las que la membrana de la vesícula se fusiona con la membrana de la célula cancerosa liberando de ese modo el profármaco de camptotecina en la célula cancerosa, o cuando los liposomas y/o micelas permanecen adyacentes a las células cancerosas, el profármaco de camptotecina difunde desde los liposomas y/o micelas para captarse por las células cancerosas.

Cualquier lípido o mezcla de lípidos que forme liposomas y/o micelas es adecuado para su uso en la presente invención. Son adecuadas fosfatidilcolinas, incluyendo, por ejemplo, L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC). También son adecuados fosfatidilglicerol, incluyendo, por ejemplo, L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). La DMPC y el DMPG están ambos en fase fluida a 37°C, mientras que la DSPC está en fase sólida a 37°C. Puesto que la presencia de lípido cargado negativamente en la membrana del liposoma provoca que los liposomas se repelan entre sí, pueden incorporarse pequeñas cantidades, tales como, por ejemplo aproximadamente el 10%, de un lípido cargado negativamente, tal como distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), en los liposomas de DSPC. Otros fosfolípidos adecuados incluyen: fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositoles y ácidos fosfatídicos que contienen ácido láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquidónico, behénico y lignocérico. Otro lípido adecuado incluye colesterol.

Los liposomas y/o micelas pueden recubrirse con polietilenglicol o proteína GM₁ que ayuda a las partículas a evitar el sistema reticuloendotelial.

La DSPC, puesto que está en fase sólida a 37°C, (la temperatura promedio de los seres humanos), limita la difusión del fármaco de camptotecina desde el liposoma y por tanto puede emplearse para la liberación temporal de los profármacos de camptotecina.

El DMPG, la DPPC y la DSPC podrían obtenerse de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala. y usarse sin purificación adicional. El resto de compuestos químicos pueden ser de calidad como reactivo y usarse sin purificación adicional.

Cualquier tensioactivo o mezclas de los mismos que forme micelas es adecuado para su uso en la presente invención. Los tensioactivos adecuados incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS) disponible de Kodak, Rochester, N.Y., octilfenolpolioxietilenglicol, disponible con el nombre comercial “Triton X-100” de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis., y monooleato de sorbitano, disponible con el nombre comercial “Polysorbate 80” y “Tween 80” de Sigma Chemical Co. Otros tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, sal de sodio de ácido desoxicólico, sal de sodio de ácido cólico y polioxietilen-10-cetiléter, disponible con el nombre comercial “BRIJ-56”; estos tensioactivos están disponibles de Sigma Chemical Co.

Además, las micelas pueden estar compuestas por lípidos, tales como fosfolípidos, y mezclas de lípidos. Además, las micelas pueden estar compuestas tanto por lípidos como por tensioactivos.

Pueden prepararse suspensiones de liposomas mediante el método de Burke y Tritton Biochemistry 24: 1768-1776 (1985). Los liposomas son preferiblemente vesículas unilamelares pequeñas (SUV), en vez de vesículas multilamelares (MLV). Sin embargo, tanto las SUVs como las MLVs están dentro del alcance de la invención. Aunque las MLVs tienen la ventaja de limitar la velocidad de difusión del profármaco de camptotecina asociado, tienen la desventaja de eliminarse más fácilmente por macrófagos que las SUVs. Pueden usarse suspensiones de lípidos madre que contienen lípido 200 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 3 mM que tiene un pH de 7,4 y se preparan mediante mezclado con vórtex durante 5-10 min. por encima de la temperatura de transición de fases gel-líquido-cristalino T_M del lípido. Las suspensiones de lípidos se sonicán entonces usando un sonicador de tipo baño de Laboratory Supplies Co., Hicksville, N. Y., durante 3-4 horas hasta que se vuelven ópticamente transparentes. Puede observarse una disminución en el pH desde 7,4 hasta 6,8 para las preparaciones de SUV de DMPG; por tanto, el pH de estas suspensiones de SUV se ajusta preferiblemente a 7,4 usando pequeñas cantidades de NaOH 2,5 M en PBS y se sonicán de nuevo. Cada tipo de suspensión de liposomas se hibrida preferiblemente durante 30 minutos a 37°C.

Se describen las preparaciones de muchos liposomas y micelas en las patentes estadounidenses n.ºs 5.552.156, 7.244.449 y 5.736.156.

El término "alquilo", solo o en combinación, se refiere a una cadena lineal opcionalmente sustituida, cadena ramificada opcionalmente sustituida, o radical alquilo cíclico opcionalmente sustituido que tiene desde 1 hasta aproximadamente 6 carbonos, más preferiblemente de 2 a 4 carbonos. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, terc-amilo, pentilo, hexilo y similares. El término "cicloalquilo" abarca configuraciones cíclicas, se incluye dentro de la definición de alquilo y específicamente se refiere a radicales alquilo monocíclico, bicíclico, tricíclico y multicíclico superior en los que cada resto cíclico tiene desde 3 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares.

"Cantidad eficaz" o "dosis eficaz" puede referirse a la cantidad necesaria o suficiente para inhibir el crecimiento celular no deseado, por ejemplo, para prevenir el crecimiento celular no deseado o reducir el crecimiento celular existente, tal como el crecimiento de células tumorales. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores conocidos por los expertos en la técnica, tales como el tipo de crecimiento celular, el modo y régimen de administración, el tamaño del sujeto, la gravedad del crecimiento celular, etc. Un experto en la técnica podría considerar tales factores y realizar la determinación con respecto a la cantidad eficaz. Esto puede lograrse con la presente invención.

"Terapia antitumoral terapéuticamente eficaz" puede referirse a una terapia que es eficaz para mantener o disminuir el tamaño, por ejemplo, el volumen, de un tumor primario o tumor metastático. Esto puede lograrse con la presente invención.

Según una o más realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos para preparar los hidratos de éster alifático cristalinos de camptotecina que incluyen la etapa de hacer reaccionar un compuesto de camptotecina de partida con al menos un agente acilante protonado mediante al menos un ácido, tal como, ácido sulfúrico. El agente acilante puede contener el grupo éster que va a formarse en la camptotecina de partida. El éster de camptotecina producido es un hidrato de éster alifático cristalino de CPT. En al menos una realización, el éster de camptotecina producido es el hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino (hidrato de CZ48). Según al menos una realización, el compuesto de camptotecina de partida es CPT.

La cantidad del compuesto de camptotecina de partida puede ser cualquier cantidad deseable, siempre que esté presente el agente acilante suficiente para convertir al menos una parte de la camptotecina de partida en un éster de camptotecina tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la cantidad del compuesto de camptotecina de partida puede ser de desde aproximadamente 1 g hasta aproximadamente 100 g, o más.

Con respecto al agente acilante, el agente acilante generalmente en una o más realizaciones, contiene el grupo éster que va a formarse en la camptotecina de partida. El agente acilante puede ser un derivado de ácido orgánico, tal como un anhídrido de ácido. Por ejemplo, el agente acilante puede tener la fórmula $(R^1\text{CO})_2\text{O}$, en la que R^1 representa un grupo orgánico y generalmente el grupo R^1 es el grupo que forma la parte orgánica del enlace éster sobre el compuesto de camptotecina de partida. Más particularmente, y para fines de ejemplo únicamente, el grupo R^1 puede ser un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C_1 - C_6 . Los ejemplos específicos del grupo R^1 incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

La cantidad de agente acilante usada en las reacciones de la presente invención puede ser una cantidad suficiente para que se forme un grupo éster en el compuesto de camptotecina de partida. Las cantidades adecuadas del agente acilante incluyen, pero no se limitan a, desde aproximadamente 10 ml hasta aproximadamente 1 l, basándose en la acilación de 20 g a 30 g de camptotecina de partida. Los ejemplos expuestos más adelante proporcionan cantidades a modo de ejemplo del agente acilante que pueden usarse en la reacción.

Con respecto al ácido usado en las reacciones de la presente invención, el ácido puede usarse en cantidades catalíticas de modo que pueda producirse la acilación de la camptotecina de partida con los derivados de ácido

orgánico, tal como el anhídrido de ácido. El ácido puede ser ácido sulfúrico u otros ácidos tales como HCl, HNO₃ o HClO₄. El ácido puede ser ácido concentrado tal como ácido sulfúrico concentrado. El ácido puede tener cualquier concentración molar, tal como desde aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 0,02 M, o superior. La cantidad de ácido usada en la reacción puede ser una cantidad catalítica, tal como desde aproximadamente 0,1 ml hasta aproximadamente 1,0 ml y más preferiblemente desde aproximadamente 0,20 ml hasta aproximadamente 0,75 ml o aproximadamente 0,5 ml por reacción con de 20 g a 30 g de camptotecina de partida. La cantidad de ácido usada para catalizar la reacción de esterificación puede variarse dependiendo de las escalas de las reacciones implicadas.

En la presente invención, según una o más realizaciones, los diversos reactivos pueden combinarse entre sí en cualquier orden, o bien secuencialmente, al mismo tiempo, o bien en cualquier combinación. Puede usarse cualquier recipiente de reacción. La reacción puede tener lugar a cualquier temperatura por encima del punto de congelación de los reactivos tal como desde aproximadamente 20°C o superior. La reacción puede producirse a temperaturas ambiente o temperaturas elevadas, tales como desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 110°C o superiores. La reacción puede tener lugar en un orden corto, tal como desde 1 minuto hasta 1 hora o más. El tiempo de reacción depende de la cantidad de reactivo usado y de la cantidad deseable de conversión de la CPT de partida en éster de camptotecina. La reacción puede producirse en atmósferas inertes o en aire. Un ejemplo de una atmósfera inerte puede ser una atmósfera de nitrógeno o una atmósfera de argón.

Según diversas realizaciones, el rendimiento de la reacción puede ser de al menos el 95% al 100% en peso del producto de camptotecina de partida que se convierte en un éster de camptotecina. En al menos una realización, el rendimiento de la reacción es de aproximadamente el 97% al 100% del producto de camptotecina en un éster de camptotecina.

La pureza y/o la concentración del reactivo o CPT de partida no es importante. Diferentes purezas y diferentes concentraciones pueden afectar al rendimiento en porcentaje de los ésteres de CPT que se forman a partir de la reacción. Preferiblemente, la pureza del reactivo de CPT de partida es de desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 100%. Más preferiblemente, la pureza es de desde aproximadamente el 80 hasta aproximadamente el 100% o del 90% al 99,9% o superior. Preferiblemente, la cantidad de CPT o reactivos derivados de CPT es de desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 50% del volumen total de los reactivos. Más preferiblemente, la cantidad es de desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 5,0%, del volumen total de los reactivos.

El pH, la concentración y la pureza del ácido no son importantes, siempre que las impurezas en el ácido no reaccionen con la CPT o el agente acilante. La acidez del ácido debe ser suficientemente fuerte como para poder protonar el agente acilante empleado para la reacción. Los ácidos inorgánicos fuertes, tales como H₂SO₄, HCl, HNO₃ y HClO₄ tienen esta capacidad. Pueden usarse otros ácidos, tales como AlCl₃ y BF₃ para este tipo de reacción de esterificación catalítica. El pH del ácido puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5. Preferiblemente, el ácido está concentrado y es de alta pureza. Por ejemplo, la concentración puede ser de desde aproximadamente el 60% hasta aproximadamente el 100%. Preferiblemente, la concentración es de desde aproximadamente el 95% hasta aproximadamente el 98%. La pureza del ácido puede ser de desde aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 100%. Preferiblemente, la pureza es de desde aproximadamente el 90 hasta aproximadamente el 100%. Preferiblemente, la cantidad de ácido, tal como ácido sulfúrico concentrado, es de desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 10% del volumen total de los reactivos. Más preferiblemente, la cantidad es de desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 8,5% del volumen total de los reactivos.

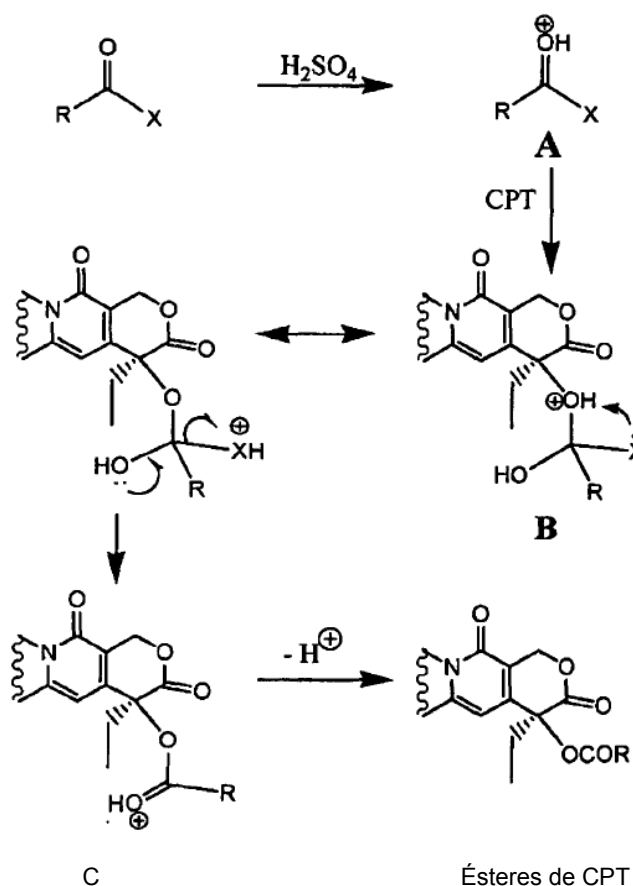
Preferiblemente, el ácido se añade a la mezcla de la CPT y el anhídrido de ácido mientras la mezcla está agitándose. Preferiblemente, la cantidad de ácido que puede añadirse a la mezcla es suficiente para que el ácido actúe como catalizador. Preferiblemente, pueden añadirse de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 gotas de pipeta de vidrio del ácido a aproximadamente 70-100 ml del haluro de acilo (puede usarse una cantidad similar de ácido cuando el agente acilante es distinto del haluro de acilo). Sin embargo, si es necesario, puede añadirse más o menos ácido a la mezcla de la CPT y el anhídrido de ácido, preferiblemente mientras la mezcla está agitándose.

La mezcla de CPT, anhídrido de ácido y ácido puede colocarse en un reactor, que incluye preferiblemente una atmósfera inerte, tal como N₂, y puede calentarse a desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 120°C. Preferiblemente, la mezcla se calienta a desde aproximadamente 90°C hasta aproximadamente 110°C y más preferiblemente, el reactor se calienta hasta aproximadamente 100°C.

Preferiblemente, la reacción transcurrirá hasta que se forme el producto deseado. El tiempo de reacción puede ser de tan solo varias horas hasta varios días. Preferiblemente, el tiempo de reacción puede ser de aproximadamente 15 horas bajo una atmósfera inerte, tal como N₂.

Un ejemplo de la reacción se representa en el esquema 1 a continuación.

Esquema 1

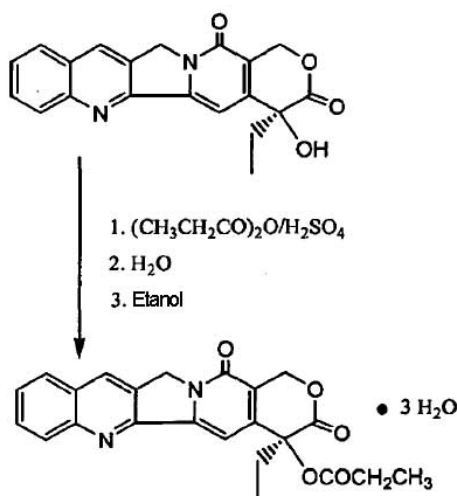


Aunque sin querer restringirse a la teoría, se cree que la protonación del agente acilante (RCOX) con un ácido, tal como ácido sulfúrico, forma un producto intermedio reactivo A. La unión de un carbono de carbonilo catiónico del producto intermedio A con camptotecina forma un producto intermedio B. La eliminación posterior de una molécula de XH de B da los productos de éster finales.

Tras completarse la reacción, lo que puede determinarse mediante un cambio en el color de la disolución, puede enfriarse la disolución hasta temperatura ambiente. El disolvente puede eliminarse mediante cualquier método de separación comúnmente conocido, tal como un método de evaporación o un método de filtración. El producto bruto obtenido tras eliminar los disolventes de reacción puede purificarse mediante reflujo en disolventes alcohólicos, tales como etanol. El producto final se obtiene en forma cristalina tras la recristalización y/o reprecipitación en el alcohol.

Se han preparado nuevos ésteres de camptotecina con toxicidad extremadamente reducida, mientras mantienen la actividad antitumoral, tales como hidratos de éster alifático cristalinos de CPT, como hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino. Según una o más realizaciones, el éster alifático de CPT puede prepararse mediante una reacción de acilación catalizada por H_2SO_4 representada en la reacción tal como se muestra a continuación.

Esquema 2



Tal como se muestra, la camptotecina de partida puede hacerse reaccionar con anhídrido propiónico con la catalización de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla de reacción puede extinguirse entonces con un exceso de agua para eliminar el anhídrido propiónico y el ácido propiónico sin reaccionar formados a partir de la reacción. La cristalización del producto bruto en etanol absoluto (u otros disolventes, como otros alcoholes) da el hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino final en un rendimiento casi cuantitativo. Esto también sería cierto para los otros ésteres de CPT de la presente invención. Debe entenderse que el término "rendimiento cuantitativo" tal como se usa en el presente documento puede incluir rendimientos del 97% - 100% en peso. La pureza del producto obtenido a partir de la reacción es de aproximadamente el 99% - 100%. El punto de fusión del producto es de aproximadamente 240°C - 243°C.

La presente invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que se pretende que sean meramente a modo de ejemplo de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se preparó hidrato de 20-propionato de camptotecina cristalino (CZ48) tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 20 g de camptotecina (0,05747 mol) y aproximadamente 100 ml de anhídrido propiónico (97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) a un matraz de fondo redondo de 200 ml equipado con un agitador magnético y un baño de arena. Se calentó la mezcla mediante el baño de arena mientras se agitaba. Se añadieron algunas gotas (de 8 a 10) de ácido sulfúrico concentrado (95-98%, reactivo A.C.S., Aldrich Chemical Co.) gota a gota cuando la temperatura del baño de arena alcanzó 80°C. Entonces se agitó la mezcla a $110 \pm 10^\circ\text{C}$ durante la noche (~ 14 h). Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se vertió la mezcla de reacción en 1000 ml de agua helada porción a porción mientras se agitaba. Tras agitar durante aproximadamente 45 min., se filtró la mezcla. Se dejó secar al aire el residuo obtenido de la filtración durante 24 h. Se transfirió el producto bruto secado a un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una manta calefactora.

A este producto bruto se le añadieron 200 ml de etanol absoluto (99,5%, 200 prueba, Aldrich Chemical Co.). Se dejó la mezcla a reflujo durante 2 h, y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente. Se obtuvo el producto puro como cristales tras cristalización en etanol. Se demostró que la pureza era del 99,8%, usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), y se determinó que el punto de fusión (pf) era de 242°C. Se usó de manera rutinaria nitrógeno seco como atmósfera de reacción en todas las reacciones para las preparaciones. Todo el material de vidrio se coció a $70 \pm 10^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 2 h antes de usarse. Se obtuvieron los puntos de fusión con un aparato de punto de fusión MEL - TEMP® y no se corrigieron. Se adquirió la camptotecina de la República Popular de China y se usó tal como se adquirió.

Determinación de la actividad antitumoral *in vivo*. Los tumores humanos usados en los experimentos comentados en el presente documento incluyeron 1 línea de vejiga, 3 líneas de mama, 4 líneas de colon, 1 línea de TDCRP, 1 línea de riñón, 2 líneas de melanoma, 2 líneas de pulmón, 7 líneas pancreáticas y 1 línea de próstata. Se suspendió finamente el fármaco de CZ48 cristalino hidratado en aceite de semilla de algodón y se almacenó en una nevera para su uso. Se administró por vía oral la suspensión a los ratones que portaban tumores humanos una vez al día de manera continua durante 5 días y 2 días de descanso, o una vez al día durante siete días durante todo el periodo de tratamiento. El periodo de tratamiento varió para las diversas líneas tumorales, oscilando desde dos semanas hasta un año. De estas líneas tumorales sometidas a prueba, 18 líneas lograron respuesta positiva, en otras palabras, una inhibición mayor del 50% en la inhibición del crecimiento tumoral, con el programa de 5 días y 2 días de descanso, y 2 líneas de tumor pancreático no obtuvieron la respuesta positiva. Con el programa continuo

(tratamiento diario), una de estas dos líneas de tumor pancreático que respondieron de manera negativa con el programa 5/2 lograron la respuesta positiva. La tabla 1 resume los resultados.

Tabla 1. Actividad antitumoral de CZ48 cristalino hidratado frente a xenoinjertos humanos en ratones desnudos

Tumores	Colon	Mama	Pulmón	Melanoma	Páncreas	Vejiga	TDCRP
Respuesta	Positiva ^a	4/4	3/3	2/2	2/2	6/7	1/1
	Negativa ^b					1/7	

a. Respuesta positiva significa la inhibición del crecimiento mayor del 50%.

b. Respuesta negativa significa la inhibición del crecimiento menor del 50%.

Aunque una respuesta positiva se define como una inhibición del crecimiento de al menos el 50%, en realidad, se logró la inhibición del crecimiento completa para muchas líneas tumorales. Las dosis eficaces requeridas para lograr la respuesta positiva variaron dependiendo de los tipos de tumores. Para el carcinoma de CLO-mama, la línea tumoral más sensible de los bancos de tumores sometidos a prueba, se logró inhibición completa con una dosis baja de CZ48 cristalino hidratado tal como 4 mg/kg, mientras que CAK-riñón, PANC1-páncreas y SU86.86-páncreas, 3 de las líneas menos sensibles, requirieron una dosis de hasta 1000 mg/kg para lograr la respuesta positiva.

Ejemplo 2

Determinación de la actividad antitumoral *in vivo*. Se realizaron todos los experimentos con animales en ratones Swiss desnudos de la variedad NIH, de alta fertilidad. Se reprodujeron y se criaron en el laboratorio bajo estrictas condiciones libres de patógenos. Para la determinación de la actividad antitumoral, se extrajo quirúrgicamente un xenoinjerto de tumor que crecía en un ratón desnudo, de aproximadamente 1 cm³ de tamaño, en condiciones estériles, se troceó finamente con tijeras de iridectomía, y se suspendió en medio de cultivo celular a la razón 1:10, v/v. Se inoculó por vía subcutánea medio ml de esta suspensión, que contenía aproximadamente 50 mg de troceado de tumor en peso en húmedo en la mitad superior del tórax dorsal del ratón. Se usaron grupos de cuatro o cinco animales. Se suspendió finalmente CZ48 cristalino hidratado en aceite de semilla de algodón y luego se inyectó en la cavidad estomacal del ratón a través de la pared abdominal anterior usando una aguja de calibre 26. El programa semanal usado para la administración oral de CZ48 cristalino hidratado fue una vez al día durante 7 días, o cinco días y dos días de descanso. Este programa se empleó durante todos los experimentos con animales. Se inició el tratamiento cuando el tumor había alcanzado un volumen de aproximadamente 200 mm³, es decir, estaba bien vascularizado, podía medirse y tenía crecimiento exponencial. Se comprobaron los tumores que crecían en animales y se midieron con un calibrador una vez a la semana. Se establecieron las dosis eficaces cuando se alcanzó una respuesta positiva en ratón. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Dosis eficaces de CZ48 cristalino hidratado en líneas tumorales

Líneas tumorales	Dosis eficaz (mg/kg)	IT ^a
Vejiga	-BOL	200
Mama	-CLO	4
	-MUR	300
	-WAR	200
Colon	-HT29	50
	-McC	300
	-SQU	30
	-SW48	100
TDCRP	-MYE	100
Riñón	-CAK	1000
Pulmón	-DOY	15
	-SPA	100
Melanoma	-BRO	100
	-FOSS	300
Páncreas	-ASPC1	300
	-HS766T	100
	-LIE	100
	-MiaPaCa2	100
	-PANC1	1000
	-SU86.86	1000
Próstata	-PC3P62	300

a. Se calculó IT suponiendo que la dosis tolerada máxima era 2000 mg/kg

Tal como se muestra en la tabla 2, el hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino tiene un amplio índice terapéutico que oscila desde 2 para tres líneas resistentes hasta 500 para la línea más sensible (CLO-mama) si se

supone que 2000 mg/kg es la dosis tolerada máxima.

Ejemplo 3

Determinación de la toxicidad *in vivo*. Se escogieron grupos de 4 ó 5 animales de aproximadamente la misma edad y que tenían pesos similares y se trataron con hidrato de CZ48 cristalino por vía oral a dosis de 1500 mg/kg y 2000 mg/kg, respectivamente, de manera continua durante 60 días. Los 3 grupos de ratones elegidos para los estudios de toxicidad estaban sanos, eran de edad y pesos similares, y no portaban tumores. Se usó un grupo como control, y se trataron los otros dos grupos con el fármaco a dos niveles de dosis alta, 1500 mg/kg y 2000 mg/kg respectivamente, durante aproximadamente dos meses. Se registraron los cambios en el peso corporal en los animales durante el tratamiento para el grupo tratado frente al grupo no tratado comenzando en el día 0 y finalizando en el día 60. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Toxicidad del hidrato de CZ48 cristalino en ratones desnudos^a

Días	Peso corporal (en gramos)		
	Control ^b	Dosis 1 (1,5 g/Kg) ^b	Dosis 2 (2,0 g/Kg) ^b
0 (Fecha de inicio)	32,0 (1,4)	31,9 (2,0)	32,3 (3,1)
10	31,9 (1,5)	30,4 (3,1)	30,7 (4,3)
21	32,2 (1,7)	31,2 (1,9)	31,2 (3,9)
35	32,3 (2,1)	32,3 (0,8)	30,8 (3,2)
45	32,1 (3,7)	32,8 (1,7)	31,7 (2,9)
60	32,9 (1,7)	33,0 (1,4)	30,9 (3,3)

a. La escala usada en la determinación de los pesos corporales se calibra y certifica anualmente.

b. Los números entre paréntesis son DE

De la manera más sorprendente, no se observó toxicidad perceptible en los ratones tratados a ninguno de los niveles de dosis sometidos a prueba. Se usó la pérdida de peso corporal como parámetro para medir la toxicidad del agente. Habitualmente, una pérdida de peso corporal del 10% o más en ratones durante el tratamiento se considera un signo de toxicidad. Una pérdida de peso corporal superior significa una toxicidad mayor. El tratamiento no dio como resultado pérdida de peso corporal significativa, lo que implicaba que los niveles de dosis empleados no eran tóxicos para los ratones y también que los ratones podían tolerar dosis incluso superiores a 2000 mg/kg. El tratamiento continuo con hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino en ratones generó un intervalo de índice terapéutico más amplio y no dio como resultado ninguna toxicidad perceptible.

Ejemplo 4

Determinación de parámetros PK de hidrato de CZ48 cristalino. Se registró el perfil farmacocinético del hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino con una dosis única de 2000 mg/kg tras una administración oral a ratones desnudos. La $C_{\max}$ y $T_{\max}$ correspondientes fueron de $284,86 \pm 85,55$ ng/ml y $2,0 \pm 0,0$ h, respectivamente. Se usó 20-O-acetato de camptotecina, un análogo de CZ48 que no era un hidrato cristalino, como patrón interno para determinar todos los parámetros PK del hidrato de CZ48. Se transfirieron 100 μ l de plasma del ratón tratado con hidrato de CZ48 cristalino a una dosis de 2000 mg/kg a un tubo de ensayo de 2 ml, y luego también se añadieron al tubo 100 μ l de disolución de trabajo de patrón interno (400 ng/ml). A la mezcla también se le añadieron 200 μ l de disolución de ácido acético al 1% y 1 ml de etil éter. Tras mezclar con vórtex durante 10 s, se incubó la mezcla a temperatura ambiente en un agitador durante 10 min., y luego se centrifugó a 10.000xg durante 15 min. Se transfirió la capa superior obtenida a partir de la centrifugación a un tubo limpio y se evaporó hasta sequedad usando un evaporador a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Se reconstituyó el residuo en 200 μ l de sistema de disolventes de agua/acetonitrilo (50/50, v/v) y se inyectó una porción de 20 μ l de la alícuota en el sistema de HPLC para su análisis. Para el estudio, también se procesaron 100 μ l de plasma blanco de ratón no tratado de la misma manera que el tratado. Se obtuvieron los parámetros PK importantes del hidrato de CZ48 y CPT en 48 ratones a partir del análisis de HPLC y se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Los parámetros farmacocinéticos de CZ48 cristalino hidratado y su metabolito principal CPT en ratones tras la administración oral con una dosis de 2000mg/kg

Parámetros	CZ48 cristalino hidratado	CPT
AUC_{0-8} (ng·h·ml ⁻¹)	---	136,43 $\pm$ 26,94
AUC_{0-24} (ng·h·ml ⁻¹)	1927,66 $\pm$ 113,92	---
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h·ml ⁻¹)	2233,44 $\pm$ 396,05	146,70 $\pm$ 34,77
$C_{\max}$ (ng/ml)	284,86 $\pm$ 85,55	42,28 $\pm$ 6,72
$T_{\max}$ (h)	2,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
$T_{1/2}$ (h)	8,70 $\pm$ 4,18	1,87 $\pm$ 0,63
K_e (1/h)	0,09 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,13
MRT (h)	11,62 $\pm$ 4,34	3,36 $\pm$ 0,87

Ejemplo 5

Determinación de la absorción en porcentaje del hidrato de CZ48 cristalino en ratón. También se realizaron estudios de absorción con hidrato de 20-O-propionato de camptotecina cristalino usando un procedimiento de perfusión en ratón en 4 ratones desnudos. Antes del procedimiento de perfusión de paso único *in situ*, se preparó tampón HBSS (pH 7,4) que consistía en polvos de HBSS 9,801 g/l, NaHCO₃ 0,372 g/l, glucosa 3,502 g/l, HEPES 5,963 g/l y NaCl 1,164 g/l y se almacenó en una nevera. Se preparó el perfundido para el procedimiento mezclando una cantidad determinada del fármaco, hidrato de CZ48 cristalino, con una cantidad de tampón HBSS. Se calentó la mezcla hasta 37°C (temperatura corporal) justo antes de su uso. Se anestesió un grupo de 4 ratones con pesos que oscilaban entre 25 y 30 gramos y edades que oscilaban entre 9 y 11 meses y se colocaron sobre una placa calefactora. Se mantuvo la placa a temperatura constante de 37°C. Tras prepararse un sistema de perfusión con un ratón, se perfundieron simultáneamente dos segmentos del intestino (intestino delgado, ID y colon) con el perfundido recién preparado. Se mantuvo la bomba a una velocidad de flujo constante de 0,191 ml/min. durante toda la perfusión. Se recogieron dos muestras de perfundido de cada salida (tracto de intestino delgado o colon) cada 30 min. Se determinaron las concentraciones del fármaco en el perfundido de las salidas mediante análisis de HPLC y se calcularon las absorciones en porcentaje correspondientes con respecto a la cantidad de partida del fármaco y se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la perfusión intestinal con ratones

Ratones	% de absorciones de hidrato de CZ48 cristalino	
	Intestino delgado	Colon
N.º 1	16,51	-35,17
2	9,34	-73,24
3	45,85	6,82
4	11,49	8,04
Promedio	22,23	-19,46
DE	16,96	38,83

Tal como se muestra en la tabla 5, se produjeron absorciones significativas en el tracto del intestino delgado. Las absorciones en porcentaje negativo registradas para el tracto del colon indican que la cantidad del fármaco que procede del tracto del colon fue mayor que la cantidad colocada inicialmente en el tracto de la boca del duodeno del ratón. Esto podría atribuirse a las acumulaciones del fármaco en el tracto del colon debido a múltiples ciclos de absorción/flujo de salida.

Determinación de la estructura de cristal del hidrato de CZ48 cristalino. Se realizó un análisis de rayos X de monocristales usando un difractómetro SMART de Siemens equipado con un detector de área CCD. Se montó un cristal con dimensiones de 0,4 x 0,08 x 0,02 mm en fibra de vidrio bajo una corriente de gas nitrógeno frío a -60°C. Se usó radiación monocromática de Mo K_{α1} ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) para recoger un hemisferio completo de datos con el método de bastidor estrecho. Se integraron los datos usando el programa SAINT de Siemens y se corrigieron las intensidades para el factor de Lorentz, la polarización, la absorción del aire y la absorción debida a la variación en la longitud de la trayectoria. Se aplicó la corrección de absorción empírica y se realizó el promedio de reflexiones redundantes. Se refinaron los parámetros de celdas finales usando 1971 reflexiones que tenían $I > 10 \sigma(I)$. Los parámetros de celda tetragonal son $a = 15,008(2) \text{ \AA}$, $b = 6,977(1) \text{ \AA}$, $c = 21,810(3) \text{ \AA}$, $\beta = 99,959^\circ$, $V = 2249,2(5) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho = 1,354 \text{ g/cm}^3$, $2\theta_{\text{máx}} = 56,66^\circ$. Se resolvió la estructura mediante métodos directos con grupo espacial $P2_1$ (N.º 4) y se refinó mediante cálculos de mínimos cuadrados en matriz completa en F^2 , el movimiento térmico de todos los átomos de C, N O se trató anisotrópicamente. Los índices R finales [$I > 2\sigma(I)$], $R1 = 0,0454$, $wR2 = 0,0763$, índices R [todos los datos], $R1 = 0,1105$, $wR2 = 0,0933$. Se realizaron todos los cálculos usando el paquete de programas SHELXTL de Siemens. Los datos del cristal y el refinamiento de la estructura para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$ se muestran en la tabla 7. Las coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y los parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$ se muestran en la tabla 8. Tanto las longitudes [$\text{\AA}$] como los ángulos [$^\circ$] para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$ se muestran en la tabla 9. Los parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$ se muestran en la tabla 10.

Tabla 7. Datos del cristal y refinamiento de la estructura para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$

Código de identificación	T94
Fórmula empírica	C23 H26 N2 O8
Peso de la fórmula	458,46
Temperatura	213(2) K
Longitud de onda	0,71073 \AA
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1$

	Dimensiones de la celda unidad	a = 15,008(2) Å b = 6,9769(10) Å c = 21,810(3) Å	$\alpha = 90^\circ$. $\beta = 99,959(2)^\circ$. $\gamma = 90^\circ$.
5	Volumen	2249,2(5) Å ³	
	Z	4	
	Densidad (calculada)	1,354 g/cm ³	
	Coeficiente de absorción	0,103 mm ⁻¹	
	F(000)	968	
	Tamaño del cristal	0,40 x 0,08 x 0,02 mm ³	
10	Intervalo theta para la recogida de datos	de 1,53 a 28,33°	
	Intervalos de los índices	-20<=h<=15, -8<=k<=9, -28<=l<=21	
	Reflexiones recogidas	14162	
	Reflexiones independientes	14162 [R(int) = 0,0496]	
	Complejidad hasta theta = 28,33°	95,6%	
15	Corrección de la absorción	Empírica	
	Transmisión máx. y mín.	0,8092 y 0,7004	
	Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en matriz completa en F ²	
	Datos / restricciones / parámetros	14162 / 1 / 633	
	Bondad de ajuste en F ²	0,780	
20	Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0454, wR2 = 0,0763	
	Índices R (todos los datos)	R1 = 0,1105, wR2 = 0,0933	
	Coeficiente de extinción	0,00000(11)	
	Mayor diferencia entre pico y valle	0,168 y -0,172 e.Å ⁻³	
25	Tabla 8. Coordenadas atómicas (x 10 ⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente (Å ² x 10 ³) para [C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₅] · 3H ₂ O		

	x	y	z	U(eq.)
C(1)	-1249(2)	734(5)	1218(2)	45(1)
C(2)	-2180(2)	697(5)	1137(2)	51(1)
C(3)	-2705(2)	747(5)	543(2)	54(1)
C(4)	-2300(2)	845(5)	31(2)	47(1)
C(5)	-1338(2)	864(5)	89(2)	37(1)
C(6)	-816(2)	826(4)	697(2)	38(1)
C(7)	-894(2)	886(4)	-432(2)	39(1)
C(8)	27(2)	877(4)	-327(2)	33(1)
C(9)	491(2)	903(4)	291(1)	30(1)
C(10)	695(2)	831(5)	-764(1)	36(1)
C(11)	1471(2)	938(4)	284(2)	33(1)
C(12)	2388(2)	759(5)	-528(2)	35(1)
C(13)	3157(2)	772(4)	-34(2)	34(1)
C(14)	3067(2)	920(4)	572(1)	32(1)
C(15)	2199(2)	993(4)	744(1)	35(1)
C(16)	4063(2)	652(5)	-223(1)	39(1)
C(17)	4698(2)	-38(5)	863(2)	43(1)
C(18)	3920(2)	1101(5)	1050(1)	36(1)
C(19)	4191(2)	3246(4)	1112(1)	39(1)
C(20)	5039(2)	3639(5)	1599(2)	53(1)
C(21)	3547(2)	-1319(5)	1731(2)	42(1)
C(22)	3391(2)	-1700(5)	2375(2)	55(1)
C(23)	3057(2)	-3713(5)	2462(2)	69(1)
C(24)	-1296(2)	7496(5)	6345(2)	43(1)
C(25)	-2208(2)	7380(5)	6318(2)	50(1)
C(26)	-2779(2)	7338(5)	5734(2)	52(1)
C(27)	-2434(2)	7452(5)	5201(2)	46(1)
C(28)	-1494(2)	7557(4)	5214(2)	33(1)
C(29)	-919(2)	7572(4)	5799(2)	34(1)
C(30)	-1101(2)	7601(4)	4672(2)	37(1)
C(31)	-179(2)	7612(5)	4735(2)	31(1)
C(32)	338(2)	7628(5)	5341(2)	30(1)
C(33)	448(2)	7597(5)	4262(1)	36(1)
C(34)	1296(2)	7576(5)	5291(2)	32(1)
C(35)	2136(2)	7419(4)	4429(2)	35(1)
C(36)	2932(2)	7290(4)	4903(2)	33(1)
C(37)	2901(2)	7376(4)	5517(2)	31(1)
C(38)	2060(2)	7521(4)	5730(1)	33(1)

C(39)	3818(2)	7072(5)	4672(2)	45(1)
C(40)	4509(2)	6193(5)	5742(2)	42(1)
C(41)	3786(2)	7434(5)	5964(1)	32(1)
C(42)	4111(2)	9549(4)	6027(2)	42(1)
C(43)	4985(2)	9880(5)	6493(2)	52(1)
C(44)	3461(2)	4998(5)	6663(2)	37(1)
C(45)	3447(2)	4602(5)	7329(2)	51(1)
C(46)	3242(2)	2520(5)	7463(2)	63(1)
N(1)	120(2)	881(4)	797(1)	38(1)
N(2)	1565(2)	841(4)	-331(1)	33(1)
N(3)	17(2)	7618(4)	5863(1)	34(1)
N(4)	1344(2)	7534(4)	4668(1)	31(1)
O(1)	2435(1)	639(3)	-1088(1)	44(1)
O(2)	4756(1)	-117(3)	255(1)	49(1)
O(3)	5289(2)	-760(3)	1231(1)	57(1)
O(4)	3788(1)	526(3)	1658(1)	39(1)
O(5)	3469(1)	-2474(3)	1308(1)	54(1)
O(6)	2142(1)	7384(3)	3869(1)	45(1)
O(7)	4502(1)	6092(3)	5127(1)	48(1)
O(8)	5108(1)	5412(3)	6091(1)	55(1)
O(9)	3704(1)	6866(3)	6584(1)	35(1)
O(10)	3291(1)	3905(3)	6238(1)	47(1)
O(11)	998(2)	8164(4)	2777(1)	59(1)
O(12)	1226(2)	1248(4)	2025(1)	56(1)
O(13)	602(2)	4974(4)	2037(1)	68(1)
O(14)	1264(2)	7001(4)	7044(2)	63(1)
O(15)	802(2)	3200(5)	7072(2)	83(1)
O(16)	-1229(3)	5058(4)	2183(2)	59(1)

U(eq) se define como una tercera parte del trazo del tensor U^{ij} ortogonalizado

Tabla 9. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para $[C_{23}H_{20}N_2O_5] \cdot 3H_2O$

C(1)-C(2)	1,378(4)
C(1)-C(6)	1,404(4)
C(2)-C(3)	1,393(5)
C(3)-C(4)	1,362(4)
C(4)-C(5)	1,428(4)
C(5)-C(7)	1,413(4)
C(5)-C(6)	1,418(4)
C(6)-N(1)	1,385(3)
C(7)-C(8)	1,362(4)
C(8)-C(9)	1,407(4)
C(8)-C(10)	1,498(4)
C(9)-N(1)	1,317(4)
C(9)-C(11)	1,473(4)
C(10)-N(2)	1,473(3)
C(11)-C(15)	1,351(4)
C(11)-N(2)	1,375(4)
C(12)-O(1)	1,238(3)
C(12)-N(2)	1,377(3)
C(12)-C(13)	1,437(4)
C(13)-C(14)	1,355(4)
C(13)-C(16)	1,490(4)
C(14)-C(15)	1,418(4)
C(14)-C(18)	1,510(4)
C(16)-O(2)	1,443(3)
C(17)-O(3)	1,199(3)
C(17)-O(2)	1,345(4)
C(17)-C(18)	1,526(4)
C(18)-O(4)	1,433(3)
C(18)-C(19)	1,551(4)
C(19)-C(20)	1,536(4)
C(21)-O(5)	1,215(4)
C(21)-O(4)	1,354(4)
C(21)-C(22)	1,487(4)

C(22)-C(23)	1,515(5)
C(24)-C(25)	1,361(4)
C(24)-C(29)	1,405(4)
C(25)-C(26)	1,409(5)
C(26)-C(27)	1,354(4)
C(27)-C(28)	1,409(4)
C(28)-C(30)	1,408(4)
C(28)-C(29)	1,413(4)
C(29)-N(3)	1,388(3)
C(30)-C(31)	1,368(4)
C(31)-C(32)	1,411(4)
C(31)-C(33)	1,512(4)
C(32)-N(3)	1,311(4)
C(32)-C(34)	1,460(4)
C(33)-N(4)	1,477(3)
C(34)-C(38)	1,362(4)
C(34)-N(4)	1,373(4)
C(35)-O(6)	1,223(3)
C(35)-N(4)	1,380(3)
C(35)-C(36)	1,440(4)
C(36)-C(37)	1,348(4)
C(36)-C(39)	1,508(4)
C(37)-C(38)	1,423(4)
C(37)-C(41)	1,507(4)
C(39)-O(7)	1,468(3)
C(40)-O(8)	1,204(3)
C(40)-O(7)	1,340(4)
C(40)-C(41)	1,531(4)
C(41)-O(9)	1,434(3)
C(41)-C(42)	1,553(4)
C(42)-C(43)	1,532(4)
C(44)-O(10)	1,192(4)
C(44)-O(9)	1,372(4)
C(44)-C(45)	1,483(4)
C(45)-C(46)	1,524(4)
C(2)-C(1)-C(6)	119,8(3)
C(1)-C(2)-C(3)	121,1(3)
C(4)-C(3)-C(2)	120,1(3)
C(3)-C(4)-C(5)	121,0(3)
C(7)-C(5)-C(6)	119,5(3)
C(7)-C(5)-C(4)	122,6(3)
C(6)-C(5)-C(4)	117,9(3)
N(1)-C(6)-C(1)	118,3(3)
N(1)-C(6)-C(5)	121,8(3)
C(1)-C(6)-C(5)	119,9(3)
C(8)-C(7)-C(5)	118,1(3)
C(7)-C(8)-C(9)	118,7(3)
C(7)-C(8)-C(10)	131,8(3)
C(9)-C(8)-C(10)	109,6(3)
N(1)-C(9)-C(8)	126,2(3)
N(1)-C(9)-C(11)	125,2(3)
C(8)-C(9)-C(11)	108,6(3)
N(2)-C(10)-C(8)	102,1(2)
C(15)-C(11)-N(2)	121,3(3)
C(15)-C(11)-C(9)	132,3(3)
N(2)-C(11)-C(9)	106,4(3)
O(1)-C(12)-N(2)	121,2(3)
O(1)-C(12)-C(13)	124,4(3)
N(2)-C(12)-C(13)	114,3(3)
C(14)-C(13)-C(12)	122,0(3)
C(14)-C(13)-C(16)	121,6(3)
C(12)-C(13)-C(16)	116,4(3)
C(13)-C(14)-C(15)	120,8(3)
C(13)-C(14)-C(18)	117,7(3)
C(15)-C(14)-C(18)	121,5(3)

C(11)-C(15)-C(14)	117,7(3)
O(2)-C(16)-C(13)	113,5(3)
O(3)-C(17)-O(2)	118,5(3)
O(3)-C(17)-C(18)	123,5(3)
O(2)-C(17)-C(18)	117,9(3)
O(4)-C(18)-C(14)	112,3(2)
O(4)-C(18)-C(17)	109,7(3)
C(14)-C(18)-C(17)	111,6(3)
O(4)-C(18)-C(19)	105,4(3)
C(14)-C(18)-C(19)	108,6(3)
C(17)-C(18)-C(19)	108,9(3)
C(20)-C(19)-C(18)	114,0(3)
O(5)-C(21)-O(4)	122,3(3)
O(5)-C(21)-C(22)	126,1(3)
O(4)-C(21)-C(22)	111,6(3)
C(21)-C(22)-C(23)	113,2(3)
C(25)-C(24)-C(29)	121,0(3)
C(24)-C(25)-C(26)	119,4(4)
C(27)-C(26)-C(25)	120,9(3)
C(26)-C(27)-C(28)	121,1(3)
C(30)-C(28)-C(27)	123,2(3)
C(30)-C(28)-C(29)	118,6(3)
C(27)-C(28)-C(29)	118,1(3)
N(3)-C(29)-C(24)	117,8(3)
N(3)-C(29)-C(28)	122,6(3)
C(24)-C(29)-C(28)	119,5(3)
C(31)-C(30)-C(28)	118,6(3)
C(30)-C(31)-C(32)	118,5(3)
C(30)-C(31)-C(33)	132,1(3)
C(32)-C(31)-C(33)	109,4(3)
N(3)-C(32)-C(31)	126,0(3)
N(3)-C(32)-C(34)	125,3(3)
C(31)-C(32)-C(34)	108,6(3)
N(4)-C(33)-C(31)	101,6(2)
C(38)-C(34)-N(4)	120,8(3)
C(38)-C(34)-C(32)	132,0(3)
N(4)-C(34)-C(32)	107,1(3)
O(6)-C(35)-N(4)	122,2(3)
O(6)-C(35)-C(36)	124,5(3)
N(4)-C(35)-C(36)	113,2(3)
C(37)-C(36)-C(35)	122,9(3)
C(37)-C(36)-C(39)	121,3(3)
C(35)-C(36)-C(39)	115,8(3)
C(36)-C(37)-C(38)	120,9(3)
C(36)-C(37)-C(41)	117,8(3)
C(38)-C(37)-C(41)	121,2(3)
C(34)-C(38)-C(37)	117,3(3)
O(7)-C(39)-C(36)	112,1(3)
O(8)-C(40)-O(7)	119,0(3)
O(8)-C(40)-C(41)	123,2(3)
O(7)-C(40)-C(41)	117,6(3)
O(9)-C(41)-C(37)	113,2(2)
O(9)-C(41)-C(40)	108,9(3)
C(37)-C(41)-C(40)	111,9(3)
O(9)-C(41)-C(42)	104,9(2)
C(37)-C(41)-C(42)	108,1(3)
C(40)-C(41)-C(42)	109,7(2)
C(43)-C(42)-C(41)	114,9(3)
O(10)-C(44)-O(9)	122,5(3)
O(10)-C(44)-C(45)	127,1(3)
O(9)-C(44)-C(45)	110,4(3)
C(44)-C(45)-C(46)	113,8(3)
C(9)-N(1)-C(6)	115,7(3)
C(11)-N(2)-C(12)	123,8(3)
C(11)-N(2)-C(10)	113,3(2)
C(12)-N(2)-C(10)	122,9(3)

C(32)-N(3)-C(29)	115,6(3)
C(34)-N(4)-C(35)	124,8(3)
C(34)-N(4)-C(33)	113,2(2)
C(35)-N(4)-C(33)	122,0(3)
C(17)-O(2)-C(16)	122,4(2)
C(21)-O(4)-C(18)	117,1(3)
C(40)-O(7)-C(39)	122,4(2)
C(44)-O(9)-C(41)	116,6(2)

Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes:

Tabla 10. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para $[\text{C}_2\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C(1)	45(2)	43(2)	48(2)	-1(2)	9(2)	1(2)
C(2)	51(2)	51(3)	55(3)	-2(2)	18(2)	-4(2)
C(3)	44(2)	45(2)	73(3)	-7(2)	12(2)	-4(2)
C(4)	41(2)	38(2)	59(3)	-3(2)	-4(2)	-1(2)
C(5)	38(2)	24(2)	46(2)	-4(2)	2(2)	-7(2)
C(6)	40(2)	25(2)	48(2)	2(2)	9(2)	2(2)
C(7)	45(2)	28(2)	40(2)	0(2)	-7(2)	-6(2)
C(8)	39(2)	24(2)	34(2)	-2(2)	2(2)	-5(2)
C(9)	39(2)	19(2)	31(2)	1(2)	6(2)	1(2)
C(10)	44(2)	28(2)	32(2)	1(2)	-3(2)	-5(2)
C(11)	39(2)	29(2)	31(2)	3(2)	4(2)	1(2)
C(12)	43(2)	35(2)	27(2)	1(2)	7(2)	-7(2)
C(13)	37(2)	28(2)	36(2)	2(2)	5(2)	2(2)
C(14)	38(2)	27(2)	28(2)	-4(2)	2(2)	1(2)
C(15)	44(2)	34(2)	24(2)	3(2)	2(2)	6(2)
C(16)	42(2)	45(2)	28(2)	-1(2)	4(2)	-3(2)
C(17)	40(2)	41(2)	44(2)	-6(2)	-1(2)	2(2)
C(18)	35(2)	43(2)	28(2)	2(2)	1(2)	4(2)
C(19)	40(2)	38(2)	35(2)	-4(2)	-1(2)	0(2)
C(20)	54(2)	53(3)	47(2)	-4(2)	-6(2)	-6(2)
C(21)	39(2)	44(3)	40(2)	4(2)	-1(2)	4(2)
C(22)	64(3)	60(3)	40(2)	14(2)	11(2)	9(2)
C(23)	63(3)	72(3)	75(3)	19(3)	20(2)	2(2)
C(24)	47(2)	38(2)	45(2)	1(2)	10(2)	3(2)
C(25)	43(2)	50(2)	61(3)	1(2)	18(2)	0(2)
C(26)	39(2)	43(2)	73(3)	0(2)	5(2)	1(2)
C(27)	41(2)	34(2)	58(3)	0(2)	-2(2)	1(2)
C(28)	35(2)	21(2)	42(2)	-2(2)	-1(2)	1(2)
C(29)	36(2)	24(2)	42(2)	3(2)	4(2)	1(2)
C(30)	48(2)	22(2)	33(2)	2(2)	-11(2)	2(2)
C(31)	34(2)	23(2)	34(2)	-1(2)	-2(2)	1(2)
C(32)	32(2)	24(2)	33(2)	3(2)	1(2)	0(2)
C(33)	46(2)	28(2)	33(2)	2(2)	0(2)	-3(2)
C(34)	42(2)	23(2)	30(2)	-2(2)	2(2)	1(2)
C(35)	50(2)	22(2)	32(2)	0(2)	7(2)	1(2)
C(36)	41(2)	27(2)	31(2)	2(2)	8(2)	1(2)
C(37)	33(2)	23(2)	35(2)	0(2)	2(2)	0(2)
C(38)	39(2)	30(2)	28(2)	-2(2)	4(2)	1(2)
C(39)	46(2)	48(2)	41(2)	6(2)	6(2)	0(2)
C(40)	43(2)	42(2)	43(2)	2(2)	12(2)	2(2)
C(41)	35(2)	36(2)	26(2)	3(2)	7(2)	5(2)
C(42)	42(2)	37(2)	44(2)	0(2)	1(2)	-5(2)
C(43)	51(2)	54(3)	49(2)	-6(2)	4(2)	-9(2)
C(44)	37(2)	41(2)	31(2)	4(2)	3(2)	10(2)
C(45)	61(2)	50(2)	44(2)	8(2)	13(2)	2(2)
C(46)	70(3)	64(3)	55(3)	17(2)	9(2)	-7(2)
N(1)	39(2)	31(2)	43(2)	1(2)	6(1)	-4(1)
N(2)	35(2)	32(2)	30(2)	-1(1)	1(1)	-4(1)
N(3)	38(2)	26(2)	36(2)	0(1)	4(1)	2(1)
N(4)	36(2)	28(2)	28(2)	2(1)	1(1)	0(1)
O(1)	47(1)	52(2)	33(1)	1(1)	2(1)	-4(1)
O(2)	43(2)	67(2)	37(2)	0(1)	5(1)	15(1)

O(3)	49(2)	68(2)	50(2)	0(1)	-3(1)	23(1)
O(4)	44(1)	41(2)	32(1)	1(1)	4(1)	2(1)
O(5)	78(2)	40(2)	40(2)	0(1)	3(1)	2(1)
O(6)	57(2)	52(2)	26(1)	-1(1)	8(1)	3(1)
O(7)	45(1)	63(2)	38(2)	3(1)	14(1)	13(1)
O(8)	47(2)	68(2)	49(2)	5(1)	7(1)	22(1)
O(9)	39(1)	33(1)	32(1)	-2(1)	4(1)	1(1)
O(10)	62(2)	43(2)	34(2)	-5(1)	2(1)	3(1)
O(11)	63(2)	58(2)	48(2)	-2(2)	-10(2)	-1(2)
O(12)	62(2)	64(2)	38(2)	2(1)	1(1)	-1(1)
O(13)	58(2)	69(2)	73(2)	-6(2)	1(2)	9(2)
O(14)	63(2)	70(3)	52(2)	12(2)	0(1)	2(2)
O(15)	59(2)	89(3)	94(3)	24(2)	-5(2)	1(2)
O(16)	67(2)	59(3)	46(2)	-2(2)	0(1)	2(2)

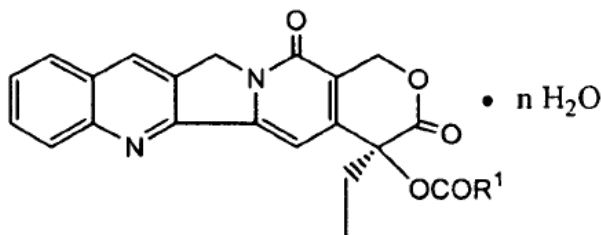
El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico adopta la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

A partir de estos estudios está claro que los compuestos de la presente invención demuestran un nivel sorprendente de actividad anticancerígena. Esto se aplica tanto al espectro de tumores cubiertos como a la calidad de las respuestas. El compuesto para su uso según la presente invención ha podido bloquear el crecimiento completamente y obtener la regresión total de xenoinjertos humanos de carcinomas (por ejemplo, de pulmón, mama, colon, estómago, páncreas, vejiga, próstata, osteosarcoma y ovarios) y melanomas malignos. Esto se logró sin ninguna toxicidad observable. Muchos de los mamíferos que se trataron de manera continua durante seis meses no mostraron efectos de enfermedad ni de nuevo crecimiento del tumor que una vez portaron. Los hidratos de éster alifático cristalino hidratado de la presente invención deben tener aproximadamente el mismo grado de eficacia y valores de índice terapéutico.

Además, cuando se facilita una cantidad, concentración u otro valor o parámetro como o bien un intervalo, un intervalo preferido o bien una lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, esto debe entenderse como que se dan a conocer específicamente todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier valor preferido o límite de intervalo superior y cualquier valor preferido o límite de intervalo inferior, independientemente de si los intervalos se dan a conocer por separado. Cuando se menciona en el presente documento un intervalo de valores numéricos, a menos que se establezca otra cosa, se pretende que el intervalo incluya los puntos finales de los mismos, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la invención se limite a los valores específicos mencionados cuando se define un intervalo.

REIVINDICACIONES

1. Hidrato de camptotecina cristalino de fórmula (I):



en la que n comprende un número que oscila entre 1 y 10, y R¹ es un grupo alquilo C₂-C₆.

- 5 2. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, en el que R₁ es un grupo alquilo C₂-C₄ lineal, en particular etilo.
3. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 2, en el que R₁ es etilo y en el que el hidrato de camptotecina cristalino tiene un punto de fusión de desde aproximadamente 240°C hasta aproximadamente 243°C, en particular aproximadamente 242°C.
- 10 4. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una pureza de aproximadamente el 99% a aproximadamente el 100%.
5. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, en el que n comprende un número que oscila entre 1 y 3.
- 15 6. Composición que comprende una cantidad eficaz del hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno en un paciente, en la que dicho cáncer o tumor maligno es sensible a dicha composición.
7. Uso de una composición que comprende una cantidad eficaz del hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno en un paciente, en el que dicho cáncer o tumor maligno es sensible a dicha composición.
- 20 8. Composición para su uso o uso según la reivindicación 6 ó 7, en la que dicho cáncer es leucemia, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas (TDCRP), cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de colon o cáncer del sistema nervioso central.
9. Composición para su uso o uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que R¹ es etilo.
- 25 10. Composición para su uso o uso según la reivindicación 6 ó 7, en la que el hidrato de camptotecina cristalino se administra por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía transdérmica o por vía oral.
11. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el portador es un lípido o un emulsionante de tipo lipídico.
13. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, teniendo dicho hidrato de camptotecina cristalino un índice terapéutico de desde 2 hasta 500, en particular de desde 10 hasta 100, tal como se determina administrando dicho hidrato de camptotecina cristalino a ratones desnudos que tienen un xenoinjerto de tumor, cuando se usan 2.000 mg/kg como dosis tolerada máxima.
- 35 14. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 1, teniendo el hidrato de camptotecina cristalino un sistema monoclinico con tamaños de (0,10 a 0,50) x (0,01 a 0,10) x (0,01 a 0,05) mm³ y volúmenes de desde 100 hasta 5000 Å³.
15. Hidrato de camptotecina cristalino según la reivindicación 14, siendo dicho hidrato de camptotecina cristalino, hidrato de 20-propionato de camptotecina cristalino.

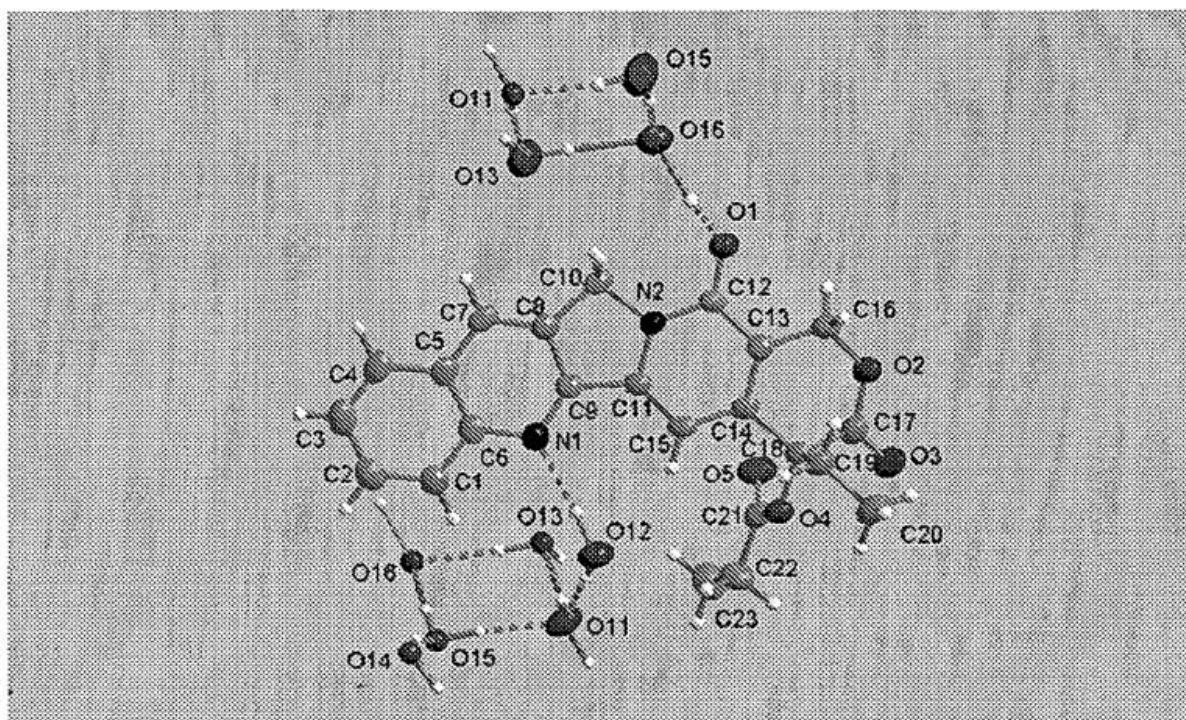


Fig. 1. Estructura molecular de $C_{23}H_{20}N_2O_5 \cdot 3H_2O$

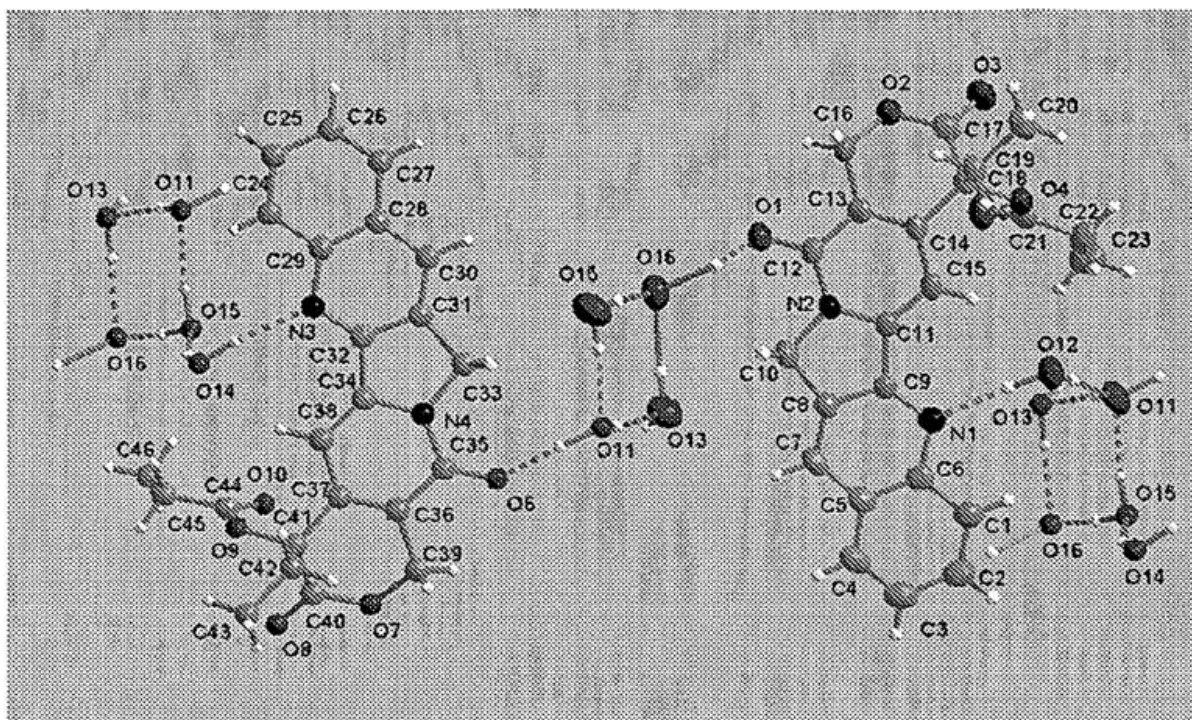


Fig. 2. Estructura molecular en puente de H₂O de
2 x C₂₃ H₂₀ N₂ O₅·3H₂O

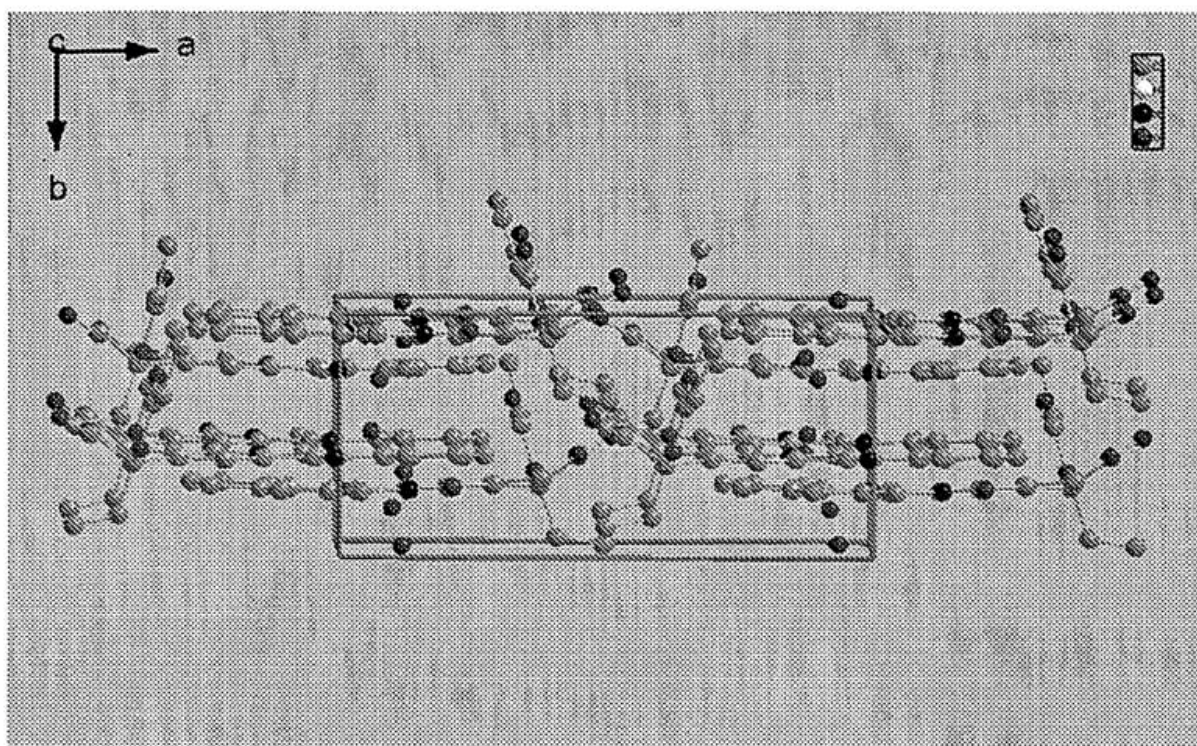


Fig. 3. Estructura de cristal tridimensional de $C_{23}H_{20}N_2$
 $O_5 \cdot 3H_2O$ (dimensiones a, b)

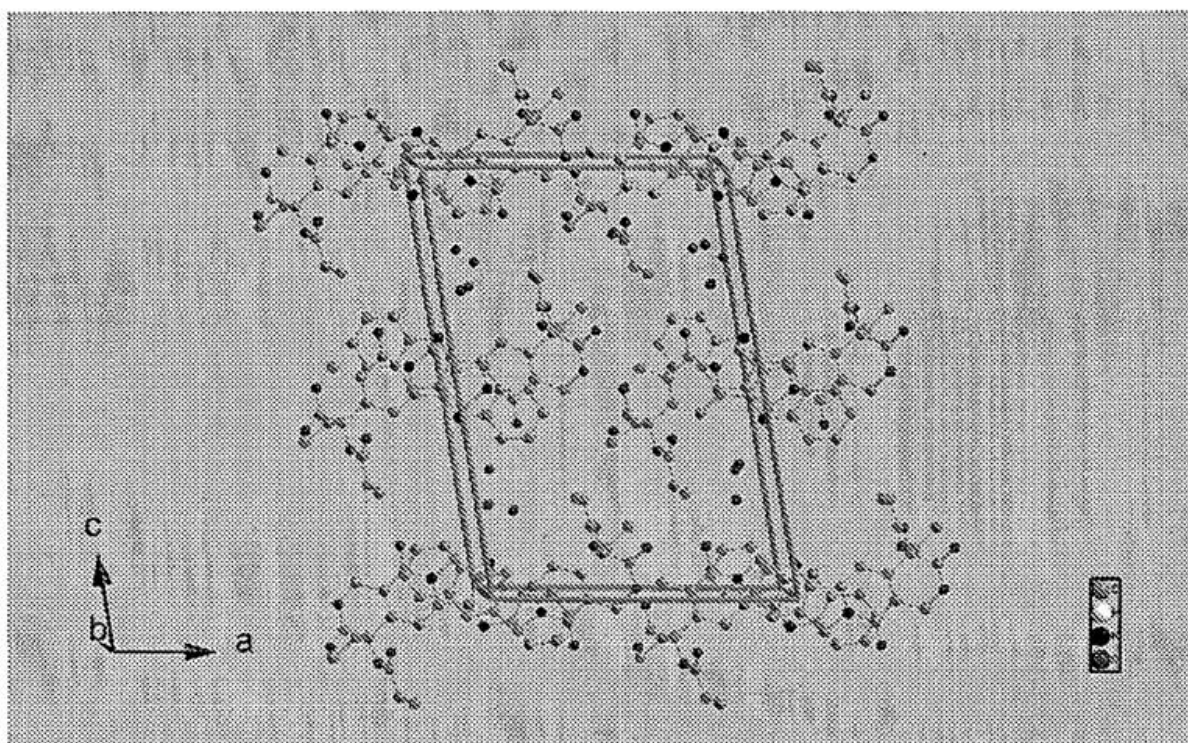


Fig. 4. Estructura de cristal tridimensional de $C_{23}H_{20}N_2$
 $O_5 \cdot 3H_2O$ (dimensiones a, c)

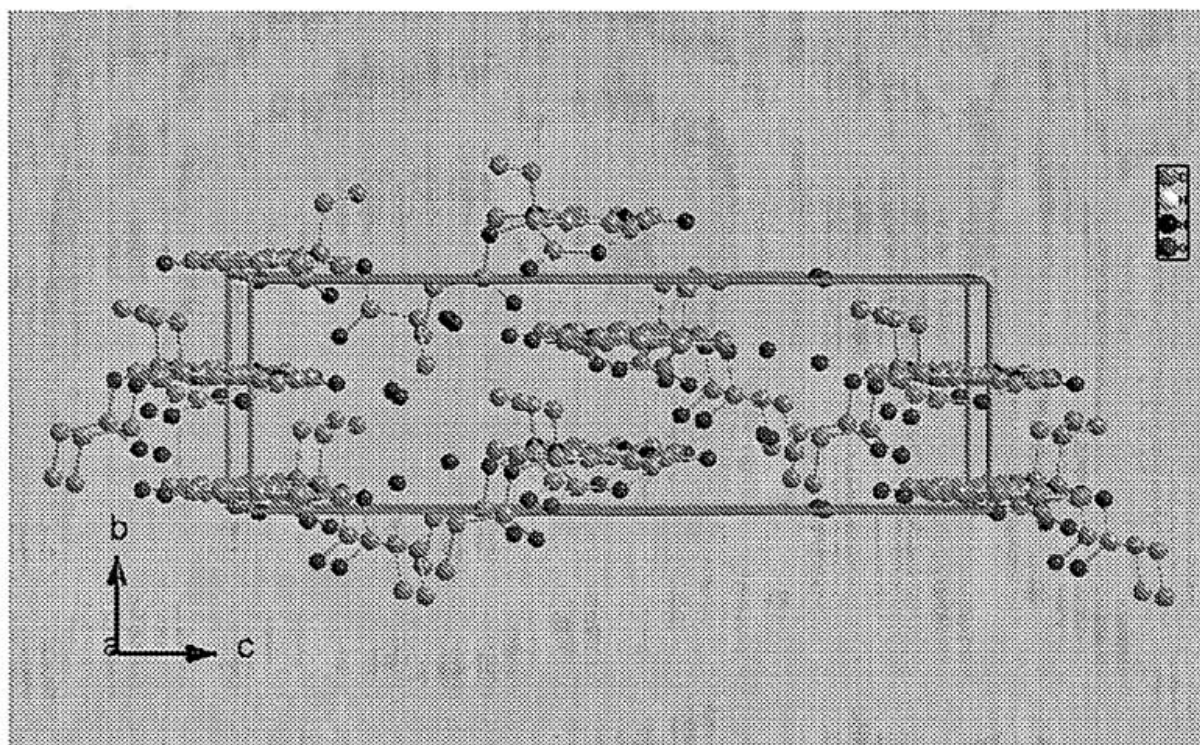


Fig. 5. Estructura de cristal tridimensional de $C_{23}H_{20}N_2O_5 \cdot 3H_2O$ (dimensiones b, c)