

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 109**

51 Int. Cl.:

A61K 31/765 (2006.01)

A61K 31/785 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07763709 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1996208**

54 Título: **Conjugados poliméricos de múltiples brazos de 7-etil-10-hidroxiamptotecina para el tratamiento del cáncer de mama, del cáncer colorrectal, del cáncer de páncreas, de ovario y de pulmón**

30 Prioridad:

09.02.2006 US 772464 P

09.06.2006 US 804391 P

15.09.2006 US 844938 P

06.11.2006 US 864516 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2013

73 Titular/es:

BELROSE PHARMA INC. (100.0%)

500 College Road East, Suite 205

Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:

ZHAO, HONG;

RUBIO, MARIA BELEN;

SAPRA, PUJA y

WU, DECHUN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 436 109 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados poliméricos de múltiples brazos de 7-etil-10-hidroxicamptotecina para el tratamiento del cáncer de mama, del cáncer colorrectal, del cáncer de páncreas, de ovario y de pulmón

5

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de las solicitudes de patente provisional de EE.UU. con N° de serie 60/772,464, presentada el 9 de febrero de 2006, 60/804.391, presentada el 9 de junio de 2006, 60/844.938, presentada el 15 de septiembre de 2006 y 60/864.516, presentada el 6 de noviembre de 2006.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a profármacos poliméricos de múltiples brazos de 7-etil-10-hidroxicamptotecina. En particular, la invención se refiere a conjugados de polietilenglicol de cuatro brazos de 7-etil-10-hidroxicamptotecina y al uso de los mismos.

15

Antecedentes de la invención

A lo largo de los años, se han propuesto varios métodos de administración de materiales biológicamente eficaces a mamíferos. Los problemas surgen cuando el agente medicinal deseado es insoluble en fluidos acuosos. Los alcaloides suelen ser especialmente difíciles de solubilizar.

20

La camptotecina es un alcaloide citotóxico insoluble en agua producido por los árboles *Camptotheca accuminata* autóctonos de China y los árboles *Nothapodytes foetida* autóctonos de la India. La camptotecina y sus análogos relacionados son conocidos por ser posibles agentes anticancerígenos y han demostrado tener actividad terapéutica *in vitro* e *in vivo*.

25

La camptotecina y sus análogos son conocidos como inhibidores de la ADN topoisomerasa I. Por ejemplo, uno de los análogos de camptotecina es irinotecán (CPT-11, Camptosar®) que también es un inhibidor de la ADN topoisomerasa I y también ha demostrado tener actividad contra el cáncer. La 7-etil-10-hidroxicamptotecina es un metabolito activo de CPT-11.

30

El documento US 2005/0112088 divulga conjugados profarmacológicos de PEG de múltiples brazos de un compuesto de camptotecina. Dichos profármacos son hidrosolubles y presentan mejores propiedades *in vivo* que la camptotecina precursora sin modificar.

35

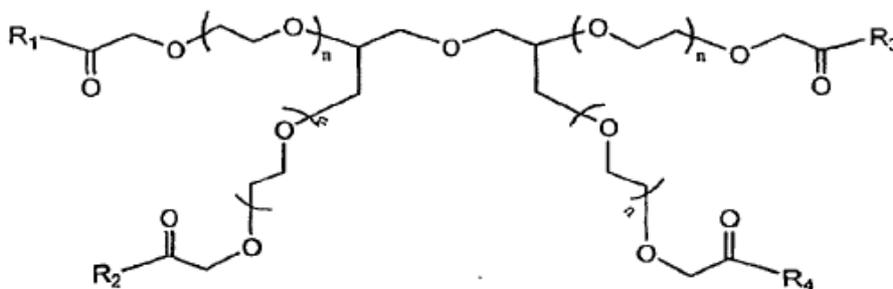
Sumario de la invención

Con el fin de superar los problemas anteriores y mejorar la tecnología para la administración de fármacos a través de PEGilación, se proporcionan nuevos métodos para usar directamente PEG de múltiples brazos en la conjugación con moléculas de fármaco a través de adaptadores adecuados. De esta manera, no es necesario incorporar restos de ramificación laboriosos en el PEG. Además, las moléculas de fármaco están relativamente lejos entre sí. Por lo tanto, la eficiencia de la conjugación con el PEG se aumenta enormemente. La solubilidad del conjugado de PEG también se mejora frente al enfoque de los extremos ramificados.

40

45

En un aspecto de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula (I):



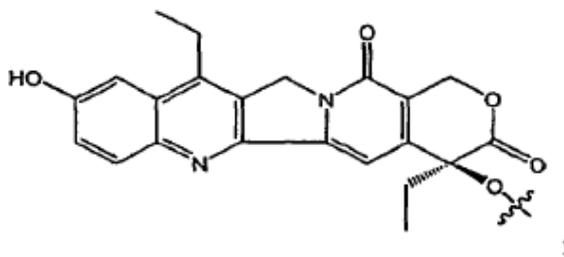
en la que

50

R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, OH o (L)_m-D;

L es un adaptador bifuncional;

D es un residuo de una camptotecina o un análogo de camptotecina, tal como



m es un número entero positivo de 1 a10;
n es un número entero positivo;

5 siempre que R₁, R₂, R₃ y R₄ no sean todos OH.

En este aspecto de la invención, la camptotecina o el análogo de camptotecina se hace reaccionar con el polímero para que el grupo 20-OH del mismo forme conjugados con los polímeros de cuatro brazos.

10 En un aspecto preferido de la invención, L es un residuo de un aminoácido. En ciertos aspectos preferidos de la invención, n es de 28 a 341, y es preferentemente 227.

También se proporcionan métodos de preparación de los conjugados, así como de los compuestos de la presente invención para su uso en terapia.

15 Las ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las figuras.

A efectos de la presente invención, se entenderá que el término "residuo" significa esa parte de un compuesto, al que se hace referencia, es decir, análogo de camptotecina, 7-etil-10-hidroxicamptotecina, aminoácidos, etc. que queda tras haberse sometido a una reacción de sustitución con otro compuesto.

A efectos de la presente invención, se entenderá que la expresión "residuo de contenido polimérico" o "residuo de PEG" significa esa parte del polímero o de PEG que queda tras haberse sometido a una reacción con compuestos que contienen camptotecina o análogos de camptotecina.

A efectos de la presente invención, se entiende que el término "alquilo" incluye C₁₋₁₂ lineales, ramificados, sustituidos, por ejemplo, con halo, alcoxi, nitro, pero preferentemente alquilos C₁₋₄, cicloalquilos C₃₋₈ o cicloalquilos sustituidos.

30 A efectos de la presente invención, se entiende que el término "sustituido" incluye la adición o el reemplazo de uno o más átomos contenidos dentro de un grupo funcional o compuesto con uno o más átomos diferentes.

A efectos de la presente invención, se entiende que los alquilos sustituidos incluyen carboxialquilos, aminoalquilos, dialquilaminos, hidroxialquilos y mercaptoalquilos; los alquenos sustituidos incluyen carboxialquenos, aminoalquenos, dialquencilaminos, hidroxialquenos y mercaptoalquenos; los alquinos sustituidos incluyen carboxialquinos, aminoalquinos, dialquencilaminos, hidroxialquinos y mercaptoalquinos; los cicloalquilos sustituidos incluyen restos tales como 4-clorociclohexilo; los arilos incluyen restos tales como naftilo; los arilos sustituidos incluyen restos tales como 3-bromo-fenilo; los aralquilos incluyen restos tales como toliilo; los heteroalquilos incluyen restos tales como etiltiofeno; los heteroalquilos sustituidos incluyen restos tales como 3-metoxi-tiofeno; alcoxi incluye restos tales como metoxi; y fenoxi incluye restos tales como 3-nitrofenoxi. Se entenderá que halo incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

Las expresiones "cantidades eficaces" y "cantidades suficientes" para los fines de la presente invención significarán una cantidad que logra un efecto deseado o un efecto terapéutico, entendiéndose dicho efecto como lo entienden los expertos habituales en la materia.

Breve descripción de las figuras

50 La FIG. 1 ilustra esquemáticamente un esquema de reacción de la preparación de ácidos de polietilenglicol de cuatro brazos.

La FIG. 2 ilustra esquemáticamente un esquema de reacción de la preparación de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrita en los Ejemplos 3-7.

La FIG. 3 ilustra esquemáticamente un esquema de reacción de la preparación de PEG de cuatro brazos-Ala-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrita en los Ejemplos 8-12.

55 La FIG. 4 ilustra esquemáticamente un esquema de reacción de la preparación de PEG de cuatro brazos-Met-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrita en los Ejemplos 13-16.

La FIG. 5 ilustra esquemáticamente un esquema de reacción de la preparación de PEG de cuatro brazos-Sar-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrita en los Ejemplos 17-21.

La FIG. 6 muestra las eficacias de una sola dosis y de múltiples dosis en ratones con xenotransplantes de tumores de mama MX-1 de gran tamaño descritas en el Ejemplo 26.

5 La FIG. 7 muestra las eficacias de una sola dosis en ratones con xenotransplantes de tumores colorrectales HT-29 descritas en el Ejemplo 27.

La FIG. 8 muestra las eficacias de múltiples dosis en ratones con xenotransplantes de tumores colorrectales HT-29 descritas en el Ejemplo 28.

10 La FIG. 9 muestra las eficacias de una sola dosis en ratones con xenotransplantes de tumores de páncreas MiaPaCa-2 descritas en el Ejemplo 29.

La FIG. 10 muestra las eficacias de múltiples dosis en ratones con xenotransplantes de tumores de páncreas MiaPaCa-2 descritas en el Ejemplo 30.

La FIG. 11 muestra el metabolismo *in vitro* de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrito en el Ejemplo 31.

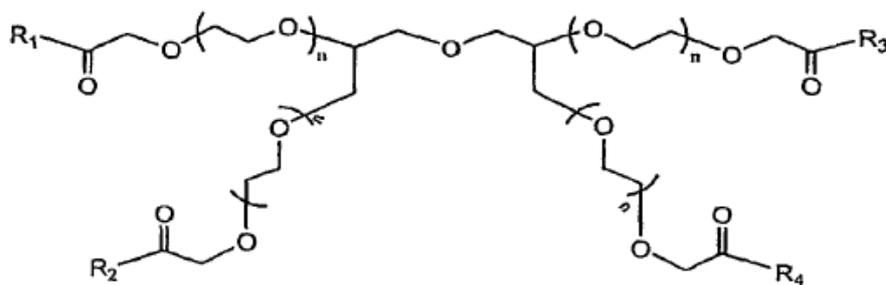
15 La FIG. 12 muestra la estabilidad de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrita en el Ejemplo 33.

La FIG. 13 muestra el efecto del pH sobre la estabilidad de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descrito en el Ejemplo 33.

20 La FIG. 14 muestra los perfiles farmacocinéticos de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) descritos en el Ejemplo 34.

Descripción detallada de la invención

En una realización de la presente invención, se proporcionan compuestos de Fórmula (I):



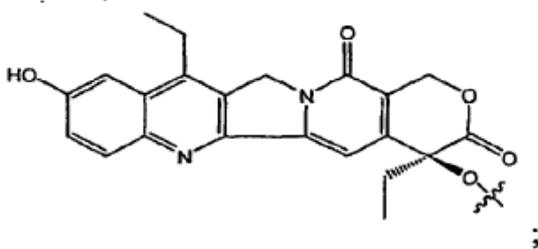
25

en la que

30 R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, OH o (L)_m-D;

L es un adaptador bifuncional;

D es un residuo de una camptotecina o un análogo de camptotecina, tal como



35 m es un número entero positivo de 1 a 10, y más preferentemente 1; y

n es un número entero positivo, preferentemente de 28 a 341, más preferentemente 227;

siempre que R₁, R₂, R₃ y R₄ no sean todos OH.

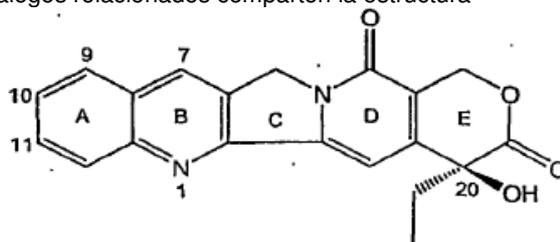
A. CAMPTOTECINA Y ANÁLOGOS RELACIONADOS DE CAMPTOTECINA

40

La camptotecina es un alcaloide citotóxico insoluble en agua producido por los árboles *Camptotheca accuminata* autóctonos de China y los árboles *Nothapodytes foetida* autóctonos de la India. La camptotecina y sus análogos relacionados también son conocidos por ser posibles agentes anticancerígenos o agentes antitumorales, y se ha observado que presentan actividades *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio.

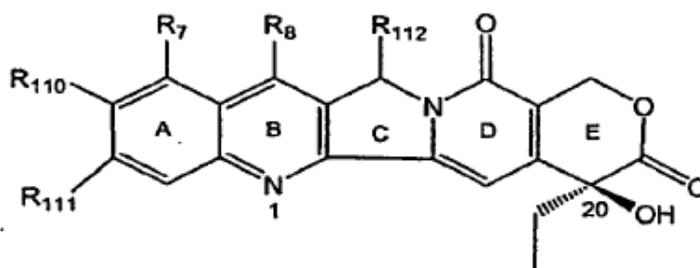
45

La camptotecina y ciertos análogos relacionados comparten la estructura



A partir de esta estructura central, se han preparado varios análogos conocidos. Por ejemplo, el anillo A situado en una o ambas de las posiciones 10 y 11, se puede sustituir con un OH. El anillo A también se puede sustituir con un alquilo C₁₋₃₀ o alcoxi C₁₋₁₇ lineal o ramificado, opcionalmente unido al anillo por un heteroátomo, es decir, -O o -S. El anillo B puede estar sustituido en la posición 7 con un alquilo C₁₋₃₀ lineal o ramificado (preferentemente, alquilo C₂), cicloalquilo C₅₋₈, alcoxi C₁₋₃₀, fenilalquilo, etc., alquilcarbamato, alquilcarbazidas, derivados de fenil-hidrazina, etc. Son posibles otras sustituciones en los anillos C, D y E. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.004.758; 4.943.579; RE 32.518. Como el experto apreciará, la 10-hidroxycamptotecina, 11-hidroxycamptotecina y los análogos de 10- y 11-hidroxycamptotecina se dan de manera natural como uno de los componentes traza en *C. acuminata* y miembros de la misma especie. Se pueden hacer sustituciones adicionales a estos compuestos, es decir, derivados de 7-alkil-camptotecina, 7-alkil sustituido-camptotecina, 7-amino-camptotecina, 7-aminoalkil-camptotecina, 7-aralkil-camptotecina, 9-alkil-camptotecina, 9-aralkil-camptotecina etc. usando técnicas sintéticas conocidas sin demasiada experimentación. Algunos alcaloides de camptoteca tienen la estructura mostrada a continuación:

(II)



En la estructura mostrada anteriormente, R₇ es uno de entre NO₂, NH₂, N₃, hidrógeno, halógeno (F, Cl, Br, I), COOH, OH, O-alkilo C₁₋₈, SH, S-alkilo C₁₋₃, CN, CH₂NH₂, NH-alkilo C₁₋₃, CH₂-NH-alkilo C₁₋₃, N(alkilo C₁₋₃)₂, CH₂N(alkilo C₁₋₃), O-, NH- y S-CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(alkilo C₁₋₃)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(alkilo C₁₋₃)₂, CHO o alquilo C₁₋₃.

R₈ de la estructura (II) mostrada anteriormente puede ser H o alquilo C₁₋₈ (preferentemente, alquilo C₂) o CH₂NR₉R₁₀ en el que

(a) R₉ y R₁₀ son, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆; alternativamente,

(b) R₉ puede ser hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆, y R₁₀ puede ser -COR₁₁ donde R₁₁ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆; o

(c) R₉ y R₁₀, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado de 3-7 miembros que puede contener O, S o un grupo NR₁₂, donde R₁₂ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, arilo, arilo sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, halógeno, nitro, amino, alquilamino C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆ y -COR₁₃, donde R₁₃ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, arilo y arilo sustituido con uno o más de entre grupos alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆ o alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆;

R₁₁₀-R₁₁₁ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; halo; acilo; alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆); alquilo sustituido; alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆); alcoxi sustituido; alquenilo; alquinilo; cicloalquilo; hidroxilo; ciano; nitro; azido; amido; hidrazina; amino; amino sustituido (por ejemplo, monoalquilamino y dialquilamino); hidroxicarbonilo; alcoxicarbonilo; alquilcarboniloxi; alquilcarbonilamino; carbamoiloxi; arilsulfonilo; alquilsulfonilo; -C(R₁₁₇)=N-(O)-R₁₁₈, en el que R₁₁₇ es H, alquilo, alquenilo, cicloalquilo o arilo, j es 0 o 1 y R₁₁₈ es H, alquilo, alquenilo, cicloalquilo o heterociclo; y R₁₁₉C(O)O-, en el que R₁₁₉ es halógeno, amino, amino sustituido,

heterociclo, heterociclo sustituido o $R_{120}-O-(CH_2)_k-$, donde k es un número entero de 1-10 y R_{120} es alquilo, fenilo, fenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido; o R_7 junto con R_{110} , o R_{110} junto con R_{111} forman metilendioxi, etilendioxi o etilenoxi sustituido o no sustituido; y R_{112} es H o OR', en el que R' es alquilo, alquenilo, cicloalquilo, haloalquilo o hidroxialquilo.

5 Los grupos arilo preferidos son fenilo y naftilo. Los anillos heterocíclicos adecuados cuando R_9 y R_{10} se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos incluyen: aziridina, azetidina, pirrolidina, piperidina, hexametenimina, imidazolidina, pirazolidina, isoxazolidina, piperazina, N-metilpiperazina, tetrahidroazepina, N-metil-tetrahidroazepina, tiazolidina, etc. Después de la conjugación, el análogo de camptotecina restante se conoce como el residuo del compuesto no conjugado.

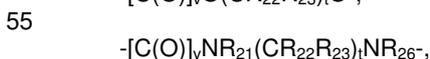
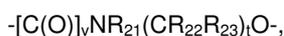
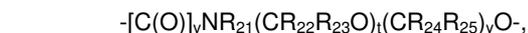
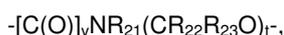
15 Para facilitar la descripción, la descripción se refiere al análogo de camptotecina 7-etil-10-hidroxicamptotecina como el compuesto preferido e ilustrado. Se entenderá que la invención reivindicada incluye la totalidad de dichos derivados y análogos como se definen en la reivindicación 1, siempre que el análogo tenga un OH, tal como el grupo 20-OH para el punto de unión con el polímero. La camptotecina o los análogos de camptotecina pueden ser mezclas racémicas o isómeros ópticamente puros. Preferentemente, en los profármacos poliméricos de múltiples brazos, se emplea una forma sustancialmente pura y activa tal como camptotecina 20 (S) o análogo de la camptotecina 20 (S).

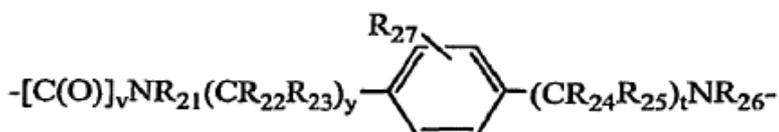
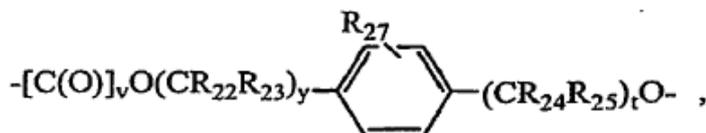
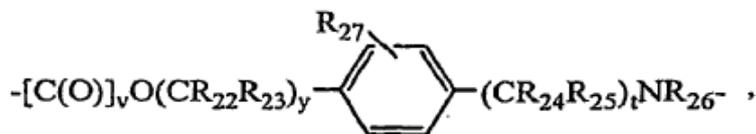
20 B. ADAPTADORES BIFUNCIONALES

En ciertos aspectos preferidos de la presente invención, L es un residuo de un aminoácido. El aminoácido, que se puede seleccionar de entre cualquiera de los L-aminoácidos naturales conocidos es, por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, glicina, serina, treonina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, prolina y/o una combinación de los mismos, por nombrar solo unos cuantos. En aspectos alternativos, L puede ser un residuo peptídico. El péptido puede variar en tamaño, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 residuos de aminoácido.

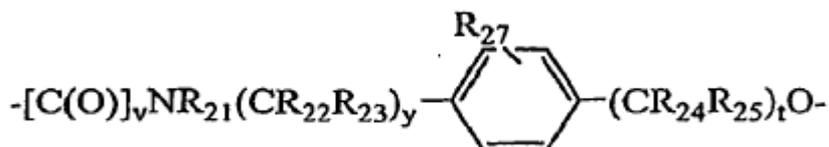
30 Los derivados y análogos de los aminoácidos naturales, así como los diversos aminoácidos no naturales conocidos en la técnica (D o L), hidrófobos o no hidrófobos, también se contemplan dentro del alcance de la invención. Los análogos de aminoácidos y derivados se seleccionan de entre: ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-aminobutírico, desmosina, ácido 2,2-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, n-etilglicina, N-etilasparagina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina o sarcosina, N-metil-isoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina. Algunos grupos L preferidos incluyen 35 residuos de glicina, alanina, metionina o sarcosina. Más preferentemente, los compuestos de la presente invención incluyen un residuo de glicina como el grupo adaptador (L).

40 En otro aspecto de la presente invención, L después de la unión entre el análogo de camptotecina y el polímero se selecciona de entre:





y



en los que:

5

R_{21} - R_{26} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilos C_{1-6} , alquenos C_{2-6} , alquinos C_{2-6} , alquilos C_{3-19} ramificados, cicloalquilos C_{3-8} , alquilos C_{1-6} sustituidos, alquenos C_{2-6} sustituidos, alquinos C_{2-6} sustituidos, cicloalquilos C_{3-8} sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos C_{1-6} sustituidos, alcoxi C_{1-6} , fenoxi y heteroalcoxi C_{1-6} ;

10

R_{27} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilos C_{1-6} , alquenos C_{2-6} , alquinos C_{2-6} , alquilos C_{3-19} ramificados, cicloalquilos C_{3-8} , alquilos C_{1-6} sustituidos, alquenos C_{2-6} sustituidos, alquinos C_{2-6} sustituidos, cicloalquilos C_{3-8} sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos C_{1-6} sustituidos, alcoxi C_{1-6} , fenoxi, heteroalcoxi C_{1-6} , NO_2 , haloalquilo y halógeno;

15

t e y son números enteros positivos seleccionados individualmente de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 4; y v es 0 o 1.

En algunos aspectos preferidos de la presente invención, los compuestos incluyen una unidad del adaptador bifuncional y, por tanto, m es 1.

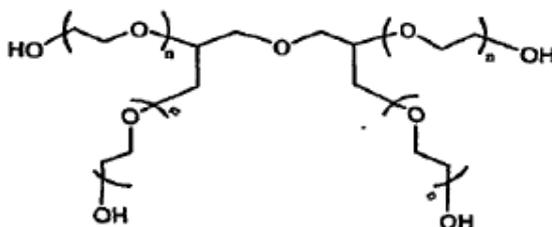
20

En la Tabla 1 de Greenwald *et al.*, ("Bioorganic & Medicinal Chemistry", 1998, 6:551-562), se encuentran otros adaptadores adicionales.

C. POLÍMEROS DE MÚLTIPLES BRAZOS

25

Los PEG de múltiples brazos son los descritos en NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8, abril de 2006. Un PEG de múltiples brazos particularmente preferido tiene la estructura:



en la que n es un número positivo.

En una realización preferida de la invención, el grado de polimerización para el polímero (n) es de 28 a 341 para proporcionar polímeros que tengan un peso molecular total de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 60.000 Da, y preferentemente de 114 a 227 para proporcionar polímeros que tengan un peso molecular total de 20.000 Da a 40.000 Da. Esto representa el número de unidades de repetición de la cadena polimérica y depende del peso molecular del polímero. En una realización particularmente preferida de la invención, n es 227.

10 D. SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS

En general, los profármacos de la invención se preparan haciendo reaccionar uno o más equivalentes de un polímero de múltiples brazos activado con, por ejemplo, uno o más equivalentes por sitio activo de conjugado de camptotecina-aminoácido en condiciones que son suficientes para hacer eficazmente que el grupo amino se someta a una reacción con el ácido carboxílico del polímero y formar un enlace.

Más específicamente, los métodos pueden incluir:

1) proporcionar un equivalente de una camptotecina o un análogo de camptotecina que contenga un grupo 20-hidroxilo disponible y uno o más equivalentes de un adaptador bifuncional que contenga un grupo de ácido carboxílico disponible;

2) hacer reaccionar los dos reactivos para formar un adaptador bifuncional intermedio de camptotecina en un disolvente inerte tal como DCM (o DMF, cloroformo, tolueno o mezclas de los mismos) en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC), (o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPC), cualquier dialquilcarbodiimida adecuada, reactivos de Mukaiyama (por ejemplo, haluros de 2-halo-1-alkil-piridinio) o anhídrido cíclico de ácido propano-fosfónico (PPACA), etc.) y una base adecuada tal como DMAP; y

3) hacer reaccionar uno o más equivalentes por sitio activo (2 eq. en el ejemplo) del producto intermedio resultante que tenga un grupo amina y un equivalente de un polímero activado, tal como un ácido de PEG en un disolvente inerte tal como DCM (o DMF, cloroformo, tolueno o sus mezclas) en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC), PPAC (o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPC), cualquier dialquil-carbodiimida adecuada, reactivos de Mukaiyama (por ejemplo, haluros de 2-halo-1-alkil-piridinio) o anhídrido cíclico de ácido propano-fosfónico (PPACA), etc.), y una base adecuada tal como DMAP, que estén disponibles, por ejemplo, a partir de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical, o se sintetizan usando técnicas conocidas, a una temperatura de 0 °C a 22 °C.

En un aspecto preferido, el grupo 10-hidroxilo de 7-etil-10-hidroxicamptotecina se protege antes de la etapa 1).

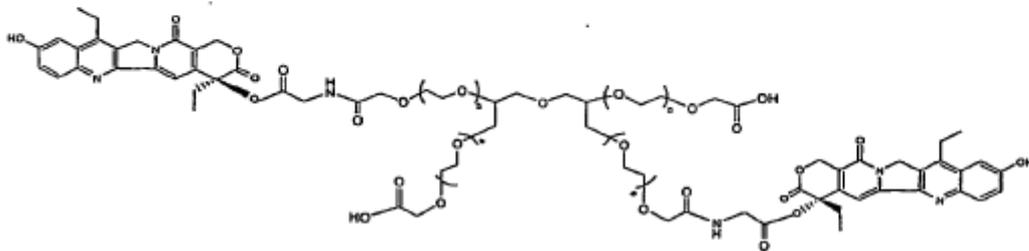
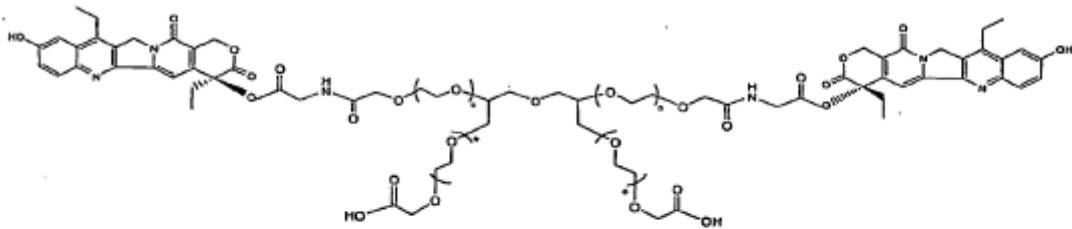
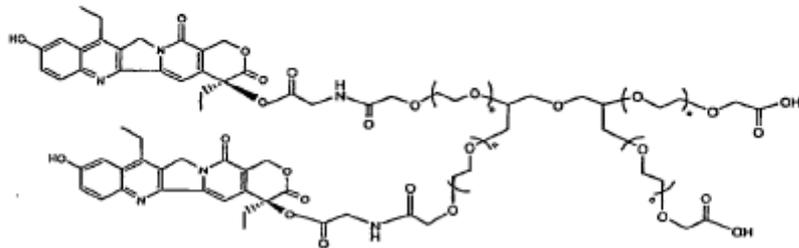
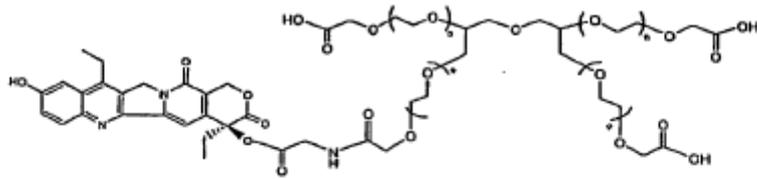
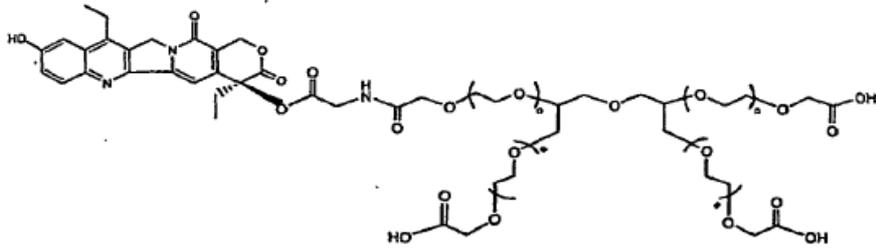
Se prefieren los grupos protectores aromáticos para el grupo OH de la camptotecina o análogo de camptotecina, tales como el grupo 10-hidroxilo de 7-etil-10-hidroxicamptotecina, porque sus productos intermedios de 7-etil-10-hidroxicamptotecina tienen una mejor solubilidad y se pueden purificar en forma muy pura de manera eficaz y efectiva. Por ejemplo, se pueden usar grupos protectores que contengan sililo tales como TBDPSCI, TBDMSCI y TMSCl para proteger el grupo 10-hidroxilo de la camptotecina o el análogo de camptotecina.

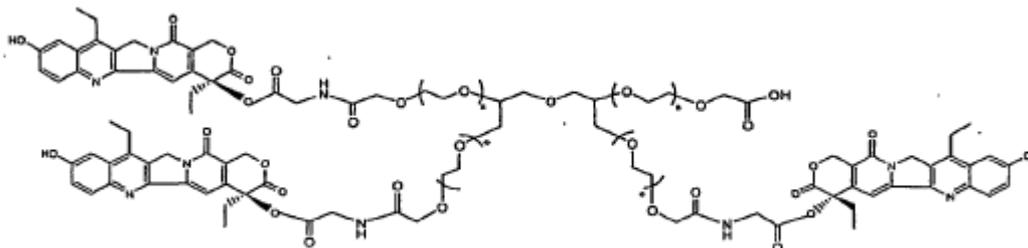
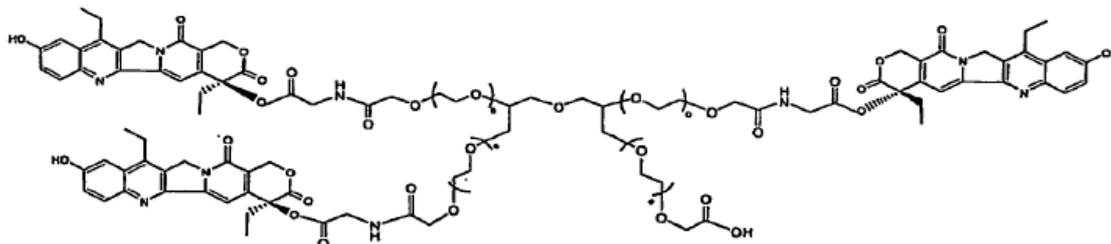
El polímero activado, es decir, un polímero que contiene 1-4 grupos de ácido carboxilo terminales se puede preparar, por ejemplo, mediante la conversión de polímeros de tipo NOF Sunbright u otros polímeros ramificados que tengan grupos OH terminales en los correspondientes derivados de ácido carboxílico usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habituales. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1-2 de la presente memoria, así como la patente de EE.UU. comúnmente asignada N° 5.605.976.

El primer y segundo agente de acoplamiento pueden ser iguales o diferentes.

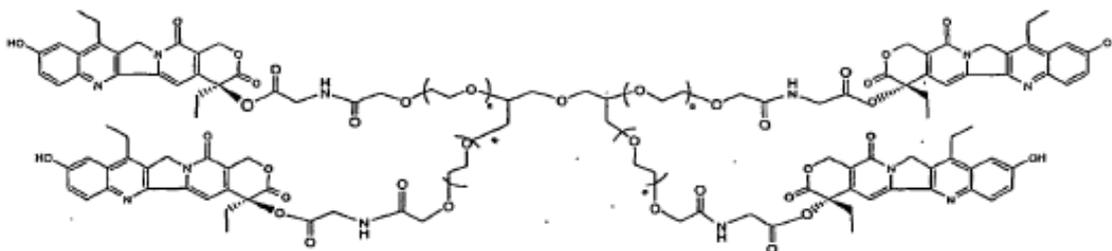
Los ejemplos de grupos adaptadores bifuncionales preferidos incluyen glicina, alanina, metionina, sarcosina, etc., y las síntesis se muestran en los Ejemplos. En los ejemplos, se muestran síntesis alternativas y específicas.

Por ejemplo, los compuestos de la presente invención son de entre:



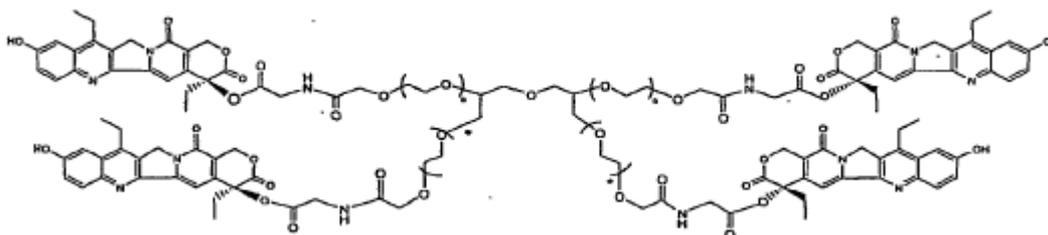


y



5

Un compuesto particularmente preferido es



10

en el que la totalidad de los cuatro brazos del polímero está conjugada con 7-etil-10-hidroxi-camptotecina a través de glicina. El análisis por HPLC de los compuestos preparados de acuerdo con el presente aspecto de las invenciones muestra que, como media, se conjugan cuatro moléculas de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina con una molécula de PEG (4 % en peso).

E. COMPOSICIONES/FORMULACIONES

15

Las composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados poliméricos de la presente invención se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando diversos procesos de mezcla, disolución, granulación, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización muy conocidos. Las composiciones se pueden formular en combinación con uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada. Las vías parenterales se prefieren en muchos aspectos de la invención.

20

25

Para la inyección, incluyendo, la inyección intravenosa, intramuscular y subcutánea, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como tampón de solución salina fisiológica o disolventes polares incluyendo, sin limitación, una pirrolidona o dimetilsulfóxido.

Los compuestos también se pueden formular para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis. Las composiciones útiles incluyen suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener adyuvantes tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las composiciones farmacéuticas para una administración parenteral incluyen soluciones acuosas de una forma hidrosoluble tales como una sal (preferida) del compuesto activo. Además, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar en un vehículo lipófilo. Los vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo y triglicéridos, o materiales tales como liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados y/o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular mediante la combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten la formulación de los compuestos de la invención en forma de comprimidos, píldoras, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, soluciones, suspensiones, soluciones concentradas y suspensiones para diluir en el agua potable de un paciente, premezclas para la dilución en los alimentos de un paciente y similares, para que el paciente los ingiera oralmente. Las preparaciones farmacéuticas para un uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir otros adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes útiles son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata y otros materiales tales como gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico. También se puede usar una sal tal como alginato sódico.

Para la administración por inhalación, los compuestos de la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una pulverización de aerosol usando un envase presurizado o un nebulizador y un propulsor adecuado.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Un compuesto de la presente invención se puede formular para esta vía de administración con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en una emulsión con un aceite farmacológicamente aceptable), con resinas de intercambio iónico, o como un derivado poco soluble tal como una sal poco soluble.

También se pueden usar otros sistemas de administración tales como liposomas y emulsiones.

Además, los compuestos se pueden administrar usando un sistema de liberación sostenida tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contengan el agente terapéutico. Son diversos los materiales de liberación sostenida que se han establecido y que son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante de unas cuantas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del compuesto en particular, se pueden emplear estrategias de estabilización adicionales.

F. DOSIS

Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar la afección susceptible a la camptotecina o análogo relacionado, es decir, 7-etil-10-hidroxicamptotecina. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la presente divulgación.

Para cualquier compuesto usado en los métodos de la invención, se puede estimar la cantidad terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. A continuación, se puede formular la dosis para su uso en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones en circulación que incluya la dosis eficaz. Dicha información se puede usar luego para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los pacientes.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en la presente memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales usando métodos bien conocidos en la técnica. La dosis, por supuesto, puede variar dependiendo de la forma de dosificación y de la vía de administración. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser seleccionadas por cada médico en vista del estado del paciente. En general, sin embargo, el intervalo de dosis preferido actualmente para la administración sistémica de un compuesto de la presente invención será de 1 a 100 mg/kg/semana, siendo preferentemente de 2 a 60 mg/kg/semana.

Las composiciones se pueden administrar una vez al día o divididas en múltiples dosis que se pueden administrar como parte de un protocolo de tratamiento de varias semanas. La dosis exacta dependerá de la etapa y de la gravedad de la afección, la susceptibilidad del tumor a la composición de polímero-profármaco, y las características de cada paciente que se esté tratando, como será apreciado por un experto habitual en la materia.

G. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En vista de lo anterior, también se proporciona un medicamento para el tratamiento de un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención de Fórmula (I), en la que D es un resto biológicamente activo, es decir, análogo de camptotecina de acuerdo con la reivindicación 1, a un paciente que lo necesita. En un aspecto preferido de la invención, D es un residuo de 7-etil-10-hidroxicamptotecina.

Otro aspecto de la presente invención proporciona composiciones para el tratamiento de varias afecciones médicas en mamíferos. Las composiciones son útiles, entre otras cosas, para el tratamiento de la enfermedad neoplásica, la reducción de la carga tumoral, la prevención de la metástasis de neoplasmas y la prevención de recurrencias de crecimientos tumorales/neoplásicos en mamíferos. En aspectos alternativos, el cáncer que se está tratando puede ser uno o más de los siguientes: tumores sólidos, linfomas, cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia linfocítica aguda (LLA), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de ovario, cánceres gástricos.

La cantidad de la composición, por ejemplo, usada como profármaco, que se administra dependerá de la molécula precursora incluida en la misma. En general, la cantidad de profármaco usada en el tratamiento es aquella cantidad que logra eficazmente el resultado terapéutico deseado en mamíferos. Naturalmente, las dosis de los distintos compuestos de profármaco variarán algo dependiendo del compuesto precursor, la velocidad de hidrólisis *in vivo*, el peso molecular del polímero, etc. En general, los derivados de ésteres poliméricos de la camptotecina y las composiciones relacionadas se administran en cantidades que varían de 1 a 100 mg/kg/semana y preferentemente de 2 a 60 mg/kg/semana. El intervalo expuesto anteriormente es ilustrativo, y los expertos en la materia determinarán la dosis óptima del profármaco seleccionado basándose en la experiencia clínica y la indicación del tratamiento.

En aspectos alternativos de la invención, el tratamiento incluye la administración de una cantidad eficaz de los compuestos descritos en la presente memoria a un mamífero o paciente en necesidad de los mismos que padece afecciones que se pueden tratar mediante la interferencia de la topoisomerasa.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para proporcionar un mayor conocimiento de la invención. Los números subrayados y en negrita citados en los ejemplos corresponden a los mostrados en las FIG. 1-5.

Procedimientos generales. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno seco o argón. Los reactivos comerciales se usaron sin purificación adicional. Todos los compuestos de PEG se secaron al vacío o mediante destilación azeotrópica en tolueno antes de su uso. Los espectros de RMN de ^{13}C se obtuvieron a 75,46 MHz usando un espectrómetro de RMN Mercury®300 de Varian, y cloroformo deuterado y metanol como disolventes a menos que se especifique lo contrario. Los desplazamientos químicos (δ) se presentan en partes por millón (ppm) campo abajo del tetrametilsilano (TMS).

Método de HPLC. Las mezclas de reacción, y la pureza de los productos intermedios y los productos finales se controlaron mediante un instrumento de HPLC Coulter System Gold® de Beckman. Este emplea una columna de fase inversa C8 ZOBAX® 300SB (150 x 4,6 mm) o una columna de fase inversa C18 Jupiter® 300A de Phenomenex (150 x 4,6 mm) con un detector de UV de longitud de onda múltiple, usando un gradiente del 10-90 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,05 % (TFA) a un caudal de 1 ml/min.

EJEMPLO 1. *t*-Bu-éster de PEG de 4 brazos^{40k} (compuesto 2):

Se destiló azeotrópicamente PEG-OH de 4 brazos^{40k} (12,5 g, 1 eq.) con 220 ml de tolueno para eliminar 35 ml de tolueno/agua. Se enfrió la solución hasta 30 °C y se añadió *t*-butóxido de potasio 1,0 M en *t*-butanol (3,75 ml, 3 eq x 4 = 12 eq.). Se agitó la mezcla a 30 °C durante 30 min y, a continuación, se añadió bromoacetato de *t*-butilo (0,975 g, 4 eq. x 4 = 16 eq.). Se mantuvo la reacción a 30 °C durante 1 hora y luego se enfrió hasta 25 °C. Se añadieron 150 ml de éter lentamente para hacer precipitar el producto. Se enfrió la suspensión resultante hasta 17 °C y se dejó reposar a 17 °C durante media hora. Se filtró el producto bruto y se lavó la torta húmeda dos veces

con éter (2 x 125 ml). Se disolvió la torta húmeda aislada en 50 ml de DCM y se hizo precipitar el producto con 350 ml de éter y se filtró. Se lavó dos veces la torta húmeda con éter (2 x 125 ml). Se secó el producto al vacío a 40 °C (rendimiento = 98 %, 12,25 g). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 27,71, 68,48-70,71 (PEG); 80,94; 168,97.

5 **EJEMPLO 2. Ácido de PEG de 4 brazos^{40k}** (compuesto 3):

Se disolvió *t*-Bu-éster de PEG (compuesto 2, 12 g) en 120 ml de DCM y luego se añadieron 60 ml de TFA. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas y después se retiró el disolvente al vacío a 35 °C. Se disolvió el residuo de aceite resultante en 37,5 ml de DCM. Se hizo precipitar el producto bruto con 375 ml de éter. Se disolvió la torta húmeda en 30 ml de NaHCO₃ al 0,5 %. Se extrajo el producto con DCM dos veces (2 x 150 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre 2,5 g de MgSO₄. Se eliminó el disolvente al vacío a temperatura ambiente. Se disolvió el residuo resultante en 37,5 ml de DCM, y se hizo precipitar el producto con 300 ml de éter y se filtró. Se lavó la torta húmeda dos veces con éter (2 x 125 ml). Se secó el producto al vacío a 40 °C (rendimiento = 90 %, 10,75 g). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 67,93-71,6 (PEG); 170,83.

15 **EJEMPLO 3. TBDPS-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)** (compuesto 5):

A una suspensión de 7-etil-10-hidroxiamptotecina (compuesto 4, 2,0 g, 5,10 mmol, 1 eq.) en 100 ml de DCM anhidro, se añadieron Et₃N (4,3 ml, 30,58 mmol, 6 eq.) y TBDPSCI (7,8 ml, 30,58 mmol, 6 eq.). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante una noche y, a continuación, se lavó con una solución de HCl 0,2 N (2 x 50 ml), una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml) y salmuera (100 ml). Se secó la capa orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó al vacío. Se disolvió el residuo en DCM anhidro y se hizo precipitar mediante la adición de hexanos. Se repitió la precipitación con DCM/hexanos para eliminar el exceso de TBDPSCI. Se filtraron los sólidos y se secaron al vacío, dando 2,09 g de producto. (Rendimiento del 65 %). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (3H, t, J = 7,6 Hz), 1,01 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,17 (9H, s), 1,83-1,92 (2H, m), 2,64 (2H, c, 6,9 Hz), 3,89 (1H, s, OH), 5,11 (2H, s), 5,27 (1H, d, J = 16,1 Hz), 5,72 (1H, d, J = 16,4 Hz), 7,07 (2H, d, J = 2,63 Hz), 7,36-7,49 (7H, m), 7,58 (1H, s), 7,75-7,79 (4H, m), 8,05 (1H, d, J = 9,4 Hz). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 7,82; 13,28; 19,52; 22,86; 26,48; 31,52; 49,23; 66,25; 72,69; 97,25; 110,09; 117,57; 125,67; 126,57; 127,65; 127,81; 130,02; 131,69; 131,97; 135,26; 143,51; 145,05; 147,12; 149,55; 149,92; 154,73; 157,43; 173,72.

30 **EJEMPLO 4. TBDPS-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Gly-Boc** (compuesto 6):

A una solución de TBDPS-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) a 0 °C (compuesto 5, 3,78 g, 5,99 mmol, 1 eq.) y Boc-Gly-OH (1,57 g, 8,99 mmol, 1,5 eq.) en 100 ml de DCM anhidro, se añadió EDC (1,72 g, 8,99 mmol, 1,5 eq.) y DMAP (329 mg, 2,69 mmol, 0,45 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C hasta que la HPLC mostró la desaparición completa del material de partida (aprox. 1 hora y 45 minutos). Se lavó la capa orgánica con una solución de NaHCO₃ al 0,5 % (2 x 50 ml), agua (1 x 50 ml), una solución de HCl 0,1 N (2 x 50 ml) y salmuera (1 x 50 ml), y se secó sobre MgSO₄. Después de la filtración y la evaporación al vacío, se obtuvieron 4,94 g de producto bruto (rendimiento cuantitativo). El sólido bruto se usó en la siguiente reacción sin mayor purificación. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, t, J = 7,6 Hz), 0,96 (3H, t, J = 7,5 Hz), 1,18 (9H, s), 1,40 (9H, s), 2,07-2,29 (3H, m), 2,64 (2H, c, 7,5 Hz), 4,01-4,22 (2H, m), 5,00 (1 H, sa), 5,01 (2H, s), 5,37 (1H, d, J = 17,0 Hz), 5,66 (1H, d, J = 17,0 Hz), 7,08 (1H, d, J = 2,34 Hz), 7,16 (1H, s), 7,37-7,50 (7H, m), 7,77 (4H, d, J = 7,6 Hz), 8,05 (1H, d, J = 9,4 Hz). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 7,52; 13,30; 19,50; 22,86; 26,45; 28,21; 31,64; 42,28; 49,14; 67,00; 76,65; 79,96; 95,31; 110,13; 118,98; 125,75; 126,45; 127,68; 127,81; 130,03; 131,54; 131,92; 135,25; 143,65; 144,91; 145,19; 147,08; 149,27; 154,75; 155,14; 157,10; 166,98; 169,17.

45 **EJEMPLO 5. TBDPS-(10)-7-etil-10-hidroxiamptotecina-(20)-Gly•HCl** (compuesto 7):

A una solución de TBDPS-(10)-7-etil-10-hidroxiamptotecina-(20)-Gly-Boc (compuesto 6, 1 g, 1,27 mmol) en 5 ml de dioxano anhidro, se añadieron 5 ml de una solución de HCl 4 M en dioxano. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta que la HPLC mostró la desaparición completa del material de partida (1 hora). Se añadió la mezcla de reacción a 50 ml de éter etílico y se filtró el sólido resultante. Se disolvió el sólido en 50 ml de DCM y se lavó con salmuera (se ajustó el pH a 2,5 mediante la adición de una solución saturada de NaHCO₃). Se secó la capa orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó al vacío. Se disolvió el residuo en 5 ml de DCM y se hizo precipitar mediante la adición de 50 ml de éter etílico. La filtración proporcionó 770 mg (rendimiento del 84 %) del producto final. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,84 (3H, t, J = 7,6 Hz), 1,05 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,16 (9H, s), 2,15-2,30 (3H, m), 2,59 (2H, c, 7,6 Hz), 4,16 (1H, d, J = 17,9 Hz), 4,26 (1H, d, J = 17,9 Hz), 5,13 (2H, s), 5,46 (1H, d, J = 17,0 Hz), 5,60 (1H, d, J = 17,0 Hz), 7,11 (1 H, d, J = 2,34 Hz), 7,30 (1H, s), 7,40-7,51 (6 H, m), 7,56 (1H, dd, J = 2,34; 9,4 Hz), 7,77 (4H, dd, J = 7,6; 1,6 Hz), 7,98 (1H, d, J = 9,1 Hz). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 8,09; 13,72; 20,26; 23,61; 26,94; 31,83; 41,01; 50,71; 67,62; 79,51; 97,03; 111,65; 119,69; 127,13; 128,97; 128,99; 129,11; 131,43; 131,96; 133,00; 133,03; 136,51; 145,62; 145,81; 147,24; 148,29; 150,58; 156,27; 158,68; 167,81; 168,34.

EJEMPLO 6. PEG de 4 brazos^{40k}-Gly-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-TBDPS (compuesto 8):

A una solución de PEGCOOH de 4 brazos^{40k} (compuesto 3, 1,4 g, 0,036 mmol, 1 eq.) en 14 ml de DCM anhidro, se añadió TBDPS-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Gly•HCl (compuesto 7, 207 mg, 0,29 mmol, 2,0 eq. por sitio activo), DMAP (175 mg, 1,44 mmol, 10 eq.) y PPAC (0,85 ml de una solución al 50 % en EtOAc, 1,44 mmol, 10 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante una noche y, a continuación, se evaporó al vacío. Se disolvió el residuo resultante en DCM, y se hizo precipitar el producto con éter y se filtró. Se recrystalizó el residuo con DMF/IPA, dando el producto (1,25 g). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 7,45; 13,20; 19,39; 22,73; 26,42; 31,67; 40,21; 49,01; 66,83; 95,16; 110,02; 118,83; 125,58; 126,40; 127,53; 127,73; 129,96; 131,49; 131,76; 131,82; 135,12; 143,51; 144,78; 145,13; 146,95; 149,21; 154,61; 156,92; 166,70; 168,46; 170,30.

EJEMPLO 7. PEG de 4 brazos^{40k}-Gly(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 9):

A un compuesto de PEG de 4 brazos^{40k}-Gly-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-TBDPS (compuesto 8, 1,25 g), se añadió una solución de TBAF (122 mg, 0,46 mmol, 4 eq.) en una mezcla 1:1 de THF y una solución de HCl 0,05 M (12,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas y, a continuación, se extrajo dos veces con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. Se disolvió el residuo en 7 ml de DMF y se hizo precipitar con 37 ml de IPA. Se filtró el sólido y se lavó con IPA. Se repitió la precipitación con DMF/IPA. Por último, se disolvió el residuo en 2,5 ml de DCM y se hizo precipitar mediante la adición de 25 ml de éter. Se filtró el sólido y se secó a 40 °C en horno de vacío durante una noche (860 mg). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 7,48; 13,52; 22,91; 31,67; 40,22; 49,12; 66,95; 94,82; 105,03; 118,68; 122,54; 126,37; 128,20; 131,36; 142,92; 144,20; 144,98; 147,25; 148,29; 156,44; 156,98; 166,82; 168,49; 170,39. Estos datos de RMN no muestran ningún signo de PEG-COOH que indique que todo el COOH haya reaccionado. La carga, determinada mediante la detección de la fluorecencia resultó ser de 3,9, lo que concuerda con la carga total de la 7-etil-10-hidroxicamptotecina en cada uno de los cuatro brazos del polímero. La repetición de las series de estos experimentos a escala mucho mayor produjo resultados coherentes.

EJEMPLO 8. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 10):

A una suspensión de 7-etil-10-hidroxicamptotecina (compuesto 4, 2,45 g, 1 eq.) en 250 ml de DCM anhidro a temperatura ambiente en atmósfera de N₂, se añadieron bicarbonato de di-*tert*-butilo (1,764 g, 1,3 eq.) y piridina anhidra (15,2 ml, 30 eq.). Se agitó la suspensión durante una noche a temperatura ambiente. Se filtró la solución turbia a través de celite (10 g) y se lavó el filtrado con HCl 0,5 N tres veces (3 x 150 ml) y una solución saturada de NaHCO₃ (1 x 150 ml). Se secó la solución sobre MgSO₄ (1,25 g). Se eliminó el disolvente al vacío a 30 °C. Se secó el producto al vacío a 40 °C (rendimiento = 82 %, 2,525g). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 173,53; 157,38; 151,60; 151,28; 150,02; 149,70; 147,00; 146,50; 145,15; 131,83; 127,19; 127,13; 124,98; 118,53; 113,88; 98,06; 84,26; 72,80; 66,18; 49,33; 31,62; 27,73; 23,17; 13,98; 7,90.

EJEMPLO 9. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Ala-Bsmoc (compuesto 11):

A una solución de Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 10, 0,85 g, 1,71 mmol) y Bsmoc-Ala (0,68 g, 2,30 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 ml), se añadieron EDC (0,51 g, 2,67 mmol) y DMAP (0,065 g, 0,53 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 45 min en atmósfera de N₂, a continuación, se calentó hasta la temperatura ambiente. Cuando se confirmó la finalización de la reacción mediante HPLC, se lavó la mezcla de reacción con NaHCO₃ al 1 % (2 x 50 ml), H₂O (50 ml) y HCl 0,1 N (2 x 50 ml). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se filtró. Se eliminó el disolvente a presión reducida. Se secó el sólido resultante al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando el producto de 1,28 g con el rendimiento del 95 %. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 171,16; 166,83; 157,16; 154,78; 151,59; 151,33; 149,82; 147,17; 146,68; 145,35; 145,15; 139,08; 136,88; 133,60; 131,83; 130,45; 130,40; 130,33; 127,40; 127,08; 125,32; 125,14; 121,38; 120,01; 114,17; 95,90; 84,38; 77,19; 76,64; 67,10; 56,66; 53,45; 49,96; 49,34; 31,7; 27,76; 17,94; 14,02; 7,53. EM (IEN) 786,20 [M + H]⁺.

EJEMPLO 10. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Ala (compuesto 12):

Se agitó una solución de Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Ala-Bsmoc (compuesto 11, 4,2 g, 5,35 mmol) y 4-piperidinopiperidina (1,17 g, 6,96 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (200 ml) a temperatura ambiente durante 5 horas. Después, se lavó esta mezcla con HCl 0,1 N (2 x 40 ml), tras lo que se secó la capa orgánica sobre MgSO₄ anhidro. Se filtró esta solución, y se eliminó el disolvente por destilación al vacío, dando 2,8 g de producto con una pureza del 93 %, determinada por HPLC. Se purificó este producto adicionalmente por trituración con éter (3 x 20 ml), y después por trituración con acetato de etilo (4 x 20 ml), dando 1,52 g (2,70 mmol) con una pureza del 97 %. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 168,39; 166,63; 156,98; 151,20; 151,15; 149,69; 146,67; 146,56; 145,37; 144,53; 131,66; 127,13; 124,99; 119,80; 113,82; 96,15; 84,21; 77,67; 67,16; 49,48; 49,06; 31,56; 27,74; 23,14; 15,98; 13,98; 7,57.

EJEMPLO 11. PEG de 4 brazos^{40k}-Ala-(20)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(10)-Boc (compuesto 13):

A CH₂Cl₂ anhidro (100 ml), se añadieron Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Ala (compuesto **12**, 1,50 g, 2,5 mmol) y PEG-COOH de cuatro brazos (compuesto **3**, 10,01 g, 1,0 mmol) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución hasta 0 °C, tras lo que se añadió EDC (0,29 g, 1,5 mmol) y DMAP (0,30 g, 2,5 mmol). Se agitó la mezcla a 0 °C durante 1 hora en atmósfera de N₂. Luego se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente a presión reducida. Se disolvió el residuo en 40 ml de DCM, y se hizo precipitar el producto bruto con éter (300 ml). Se disolvió el sólido húmedo resultante de la filtración en una mezcla de DMF/IPA (60/240 ml) a 65 °C. Se dejó enfriar la solución hasta la temperatura ambiente en 2-3 horas, y se hizo precipitar el producto. Entonces, se filtró el sólido y se lavó con éter (2 x 200 ml). Se secó la torta húmeda al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando 8,5 g de producto.

EJEMPLO 12. PEG de 4 brazos^{40k}-Ala-(20)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) (compuesto 14):

A una solución (130 ml) de TFA al 30 % en CH₂Cl₂ anhidro, se añadió PEG de 4 brazos^{40k}-Ala-(20)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(10)-Boc (compuesto **13**, 7,98 g) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 3 horas, o hasta que se confirmó la desaparición del material de partida por HPLC. Se eliminaron los disolventes lo máximo posible al vacío a 35 °C. Se disolvieron los residuos en 50 ml de DCM, y se hizo precipitar el producto bruto con éter (350 ml) y se filtró. Se disolvió el sólido húmedo en una mezcla de DMF/IPA (50/200 ml) a 65 °C. Se dejó enfriar la solución hasta la temperatura ambiente en 2-3 horas, y se hizo precipitar el producto. Después, se filtró el sólido y se lavó con éter (2 x 200 ml). Se secó la torta húmeda al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando el producto de 6,7 g. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ 170,75; 169,30; 166,65; 157,00; 156,31; 148,36; 147,19; 145,03; 144,29; 143,00; 131,49; 128,26; 126,42; 122,47; 118,79; 105,10; 94,57; 78,08; 77,81; 77,20; 71,15; 70,88; 70,71; 70,33; 70,28; 70,06; 69,93; 69,57; 66,90; 49,14; 47,14; 31,53; 22,95; 17,78; 13,52; 7,46.

EJEMPLO 13. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Met-Bsmoc (compuesto 15):

A una solución de Boc-(10)-7-etil-10-hidroxiamptotecina (compuesto **10**, 2,73 g, 5,53 mmol) y Bsmoc-Met (3,19 g, 8,59 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (50 ml), se añadieron EDC (1,64 g, 8,59 mmol) y DMAP (0,21 g, 1,72 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla a 0 °C durante 45 minutos en atmósfera de N₂, y luego se calentó hasta la temperatura ambiente. Cuando se confirmó la finalización de la reacción mediante HPLC, se lavó la mezcla de reacción con NaHCO₃ al 1 % (2 x 100 ml), H₂O (100 ml) y HCl 0,1 N (2 x 100 ml). Se secó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro y se filtró. Se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se secó el sólido resultante al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando el producto de 4,2 g con el rendimiento del 88 %. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ: 170,3; 166,8; 157,1; 155,2; 151,4; 151,2; 149,7; 147,0; 146,6; 145,3; 145,1; 138,9; 136,6; 133,5; 131,7; 130,5; 130,3; 130,2; 127,3; 127,0; 125,3; 125,1; 121,2; 119,8; 114,1; 96,1; 84,3; 76,7; 67,0; 56,7; 53,5; 53,4; 49,3; 31,6; 31,0; 29,7; 27,7; 23,1; 15,4; 13,9; 7,4; EM (IEN), 846,24 [M + H]⁺.

EJEMPLO 14. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Met-NH₂•HCl (compuesto 16):

Se agitó una solución de Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Met-Bsmoc (compuesto **15**, 4,1 g, 4,85 mmol) y 4-piperidinopiperidina (1,06 g, 6,31 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (200 ml) a temperatura ambiente durante 5 horas. Luego se lavó esta mezcla con HCl 0,1 N (2 x 40 ml), tras lo que se secó la capa orgánica sobre MgSO₄ anhidro. Se filtró esta solución, y se eliminó el disolvente mediante destilación al vacío, produciendo 2,8 g de producto con una pureza del aproximadamente 97 %, determinada mediante HPLC. Se volvió a purificar este producto por trituración con éter (3 x 20 ml), y luego por trituración con acetato de etilo (4 x 20 ml), produciendo 1,54 g con una pureza del 97 %. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ: 167,2; 166,5; 156,9; 151,12; 150,9; 149,8; 146,3; 145,9; 145,8; 144,9; 131,3; 127,2; 127,0; 125,1; 119,6; 113,8; 96,7; 84,3; 78,2; 67,0; 60,4; 52,2; 49,4; 31,4; 29,6; 29,1; 27,7; 23,2; 15,1; 13,9; 7,7.

EJEMPLO 15. PEG de 4 brazos^{40k}-Met-(20)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(10)-Boc (compuesto 17):

A una solución de CH₂Cl₂ anhidro (80 ml), se añadieron Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxiamptotecina)-(20)-Met (compuesto **16**, 1,48 g, 2,25 mmol) y PEG-COOH de 4 brazos (compuesto **3**, 9,0 g, 0,9 mmol) a temperatura ambiente. Se enfrió la solución hasta 0 °C, tras lo que se añadieron EDC (0,26 g, 1,35 mmol) y DMAP (0,27 g, 2,25 mmol). Se agitó la mezcla a 0 °C durante 1 hora en atmósfera de N₂. Luego se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche. Se diluyó la mezcla con 70 ml de CH₂Cl₂, se extrajo con 30 ml de solución acuosa de HCl 0,1 N/NaCl 1 M. Tras secar la capa orgánica con MgSO₄, se evaporó el disolvente bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en 40 ml de CH₂Cl₂, y se hizo precipitar el producto bruto con éter (300 ml). Se disolvió el sólido húmedo resultante de la filtración en 270 ml de DMF/IPA a 65 °C. Se dejó enfriar la solución hasta la temperatura ambiente en 2 ~ 3 horas, y se hizo precipitar el producto. Luego se filtró el sólido y se lavó con éter (2 x 400 ml). Se repitió el procedimiento de cristalización anterior en DMF/IPA. Se secó la torta húmeda al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando 7,0 g de producto. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ: 169,8; 169,6; 166,5; 156,9; 151,2; 151,1; 149,9; 147,0; 146,6; 145,0; 131,7; 127,1; 126,8; 124,9; 119,7; 113,8; 95,5; 84,1; 70,1; 69,9; 66,9; 50,7; 49,2; 31,5; 31,2; 29,6; 27,6; 23,1; 15,3; 13,9; 7,5.

EJEMPLO 16. PEG de 4 brazos^{40k}-Met-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 18):

A una solución de TFA al 30 % en CH₂Cl₂ anhidro (100 ml), se añadieron dimetilsulfuro (2,5 ml) y PEG de cuatro brazos-Met-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-Boc (compuesto 17, 6,0 g) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 3 horas, o hasta que se confirmó la desaparición del material de partida mediante HPLC. Se eliminaron los disolventes todo lo posible al vacío a 35 °C. Se disolvieron los residuos en 50 ml de CH₂Cl₂, y se hizo precipitar el producto bruto con éter (350 ml), y se filtró. Se disolvió el sólido húmedo en una mezcla de DMF/IPA (60/300 ml) a 65 °C. Se dejó enfriar la solución hasta la temperatura ambiente en 2 ~ 3 horas, y se hizo precipitar el producto. Luego se filtró el sólido y se lavó con éter (2 x 200 ml). Se secó la torta húmeda al vacío por debajo de 40 °C durante una noche, dando 5,1 g de producto. RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃): δ: 169,7; 166,6; 157,0; 156,3; 148,4; 147,3; 145,0; 144,4; 142,9; 131,5; 128,3; 126,4; 122,5; 118,7; 105,2; 94,7; 78,1; 67,0; 50,7; 49,2; 31,6; 31,3; 29,7; 23,0; 15,3; 13,5; 7,5; Proporción de 7-etil-10-hidroxicamptotecina con respecto a PEG: 2,1 % (en peso).

EJEMPLO 17. Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Sar-Boc (compuesto 19):

Se añadió Boc-Sar-OH (432 mg, 2,287 mmol) a una solución de Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 10, 750 mg, 1,52 mmol) en 75 ml de DCM y se enfrió hasta 0 °C. Se añadieron DMAP (432 mg, 2,287 mmol) y EDC (837 mg, 0,686 mmol), y se agitó la mezcla de reacción de 0 °C-temperatura ambiente durante 1,5 horas. A continuación, se lavó la mezcla de reacción con NaHCO₃ al 0,5 % (75 ml x 2), con agua (75 ml x 2) y, finalmente, se lavó con HCl 0,1 N (75 ml x 1). Se secó la capa de cloruro de metileno sobre MgSO₄, y se evaporó el disolvente al vacío y se secó. Rendimiento = 0,900 mg. (89 %). La estructura se confirmó mediante RMN.

EJEMPLO 18. 7-etil-10-hidroxicamptotecina-(20)-Sar•TFA (compuesto 20):

Se añadió Boc-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Sar-Boc (compuesto 19, 900 mg, 1,357 mmol) a una solución de 4 ml de TFA y 16 ml de DCM, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evaporó la mezcla de reacción con tolueno a 30 °C. Se disolvió el residuo en 10 ml de CHCl₃ y se hizo precipitar con éter etílico. Se filtró el producto y se secó. Rendimiento de 700 mg (1,055 mmol, 78 %). RMN de ¹³C (67,8 MHz, CDCl₃): δ 168,26; 167,07; 158,84; 158,71; 148,82; 147,94; 147,22; 146,34; 144,04; 131,18; 130,08; 128,97; 124,46; 119,78; 106,02; 97,23; 79,84; 79,34; 66,87; 50,84; 49,86; 31,81; 23,94; 15,47; 13,84; 8,08.

EJEMPLO 19. TBDMS-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(20)-Sar•HCl (compuesto 21):

Se diluyó una solución del 7-etil-10-hidroxicamptotecina-(20)-Sar•TFA (compuesto 20, 2,17 g, 3,75 mmol, 1 eq.) en DMF anhidra (30 ml) con 200 ml de DCM anhidro. Se añadió Et₃N (2,4 ml, 17,40 mmol, 4,5 eq.) seguido de TBDMSCI (2,04 g, 13,53 mmol, 3,5 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente hasta que la HPLC demostró la desaparición del material de partida (aproximadamente 1 hora). Se lavó la capa orgánica con NaHCO₃ al 0,5 % dos veces, con agua una vez, y con una solución saturada de HCl 0,1 N con salmuera dos veces; y luego se secó sobre MgSO₄. Tras la filtración y la evaporación del disolvente al vacío, se disolvió el aceite resultante en DCM. La adición de éter dio un sólido que se filtró usando un embudo Buchner de tamaño fino o medio (2,00 g, rendimiento del 87 %). La HPLC del sólido demostró una pureza del 96 %. La RMN de ¹H y RMN de ¹³C confirmaron la estructura. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,23 (6H, s), 0,96 (9H, s), 0,98 (3 H, t, J = 7,3 Hz), 1,30 (3 H, t, J = 7,6 Hz), 2,13-2,18 (2H, m), 2,67 (3H, s), 3,11 (2 H, c, J = 7,6 Hz), 4,10 (1H, d, J = 17,6 Hz), 4,22 (1H, d, J = 17,6 Hz), 5,23 (2 H, s), 5,40 (1 H, d, J = 16,7 Hz), 5,55 (1H, d, J = 16,7 Hz), 7,32 (1H, s), 7,38-7,43 (2H, m), 8,00 (1H, d, J = 9,1 Hz). RMN de ¹³C (75,4 MHz, CD₃OD): δ-4,14; 8,01; 14,10; 19,30; 23,98; 26,16; 31,78; 33,52; 49,46; 50,95; 67,66; 79,80; 97,41; 111,96; 119,99; 127,75; 129,28; 129,67; 131,57; 145,24; 146,86; 147,16; 148,02; 150,34; 156,69; 158,72; 167,02; 168,27.

EJEMPLO 20. PEG de 4 brazos^{40k}-Sar-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-TBDMS (compuesto 22):

A una solución de PEG-COOH de 4 brazos^{40k} (compuesto 3, 10 g, 0,25 mmol, 1 eq.) en 150 ml de DCM anhidro, se añadió una solución de TBDMS-(10)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-Sar•HCl (compuesto 21, 1,53 g, 2,5 mmol, 2,5 eq.) en 20 ml de DMF anhidra, y se enfrió la mezcla hasta 0 °C. A esta solución, se añadieron EDC (767 mg, 4 mmol, 4 eq.) y DMAP (367 mg, 3 mmol, 3 eq.), se dejó calentar la mezcla de reacción lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, se evaporó la mezcla de reacción al vacío y se disolvió el residuo en una cantidad mínima de DCM. Tras añadir éter, se formó el sólido y se filtró al vacío. Se disolvió el residuo en 30 ml de CH₃CN anhidro y se hizo precipitar mediante la adición de 600 ml de IPA. Se filtró el sólido y se lavó con IPA y éter, dando el producto (9,5 g). La estructura se confirmó mediante RMN.

EJEMPLO 21. PEG de 4 brazos^{40k}-Sar-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 23):

Método A. Se disolvió PEG de 4 brazos^{40k}-Sar-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-TBDMS (compuesto 22) en una mezcla al 50 % de TFA en H₂O (200 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 horas y luego se diluyó con 100 ml de H₂O y se extrajo con DCM (2 x 300 ml). Se lavaron las fases orgánicas

combinadas con H₂O (2 x 100 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. Se disolvió el residuo en 100 ml de DMF anhidra calentada suavemente con una pistola térmica y se hizo precipitar mediante la adición lenta de 400 ml de DMF. Se filtró el sólido, y se lavó con DMF al 20 % en IPA y éter. Se disolvió el sólido en DCM y se hizo precipitar con éter (6,8 g). La estructura se confirmó mediante RMN.

Método B. Se disolvió PEG de 4 brazos^{40k}-Sar-(20)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)-(10)-TBDMS (1 g) en 10 ml de una solución de HCl 1 N. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora (se comprobó mediante HPLC) y luego se extrajo con DCM (2 x 40 ml). Se secaron las capas orgánicas sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. Se disolvió el residuo amarillo brillante resultante en 10 ml de DMF (ligeramente calentada con una pistola térmica) y luego se añadieron 40 ml de IPA. Se filtró el sólido resultante y se secó durante una noche a 40 °C en un horno de vacío. La estructura se confirmó mediante RMN.

Datos biológicos

EJEMPLO 22. DATOS DE TOXICIDAD

Se estudió una dosis máxima tolerada (DMT) de 7-etil-10-hidroxicamptotecina conjugada con PEG de cuatro brazos usando ratones atímicos. Se controlaron la mortalidad y los signos de enfermedad de los ratones durante 14 días, y se sacrificaron cuando la pérdida de peso corporal fue > 20 % del peso corporal previo al tratamiento.

La Tabla 1 muestra la dosis máxima tolerada de cada compuesto para la administración tanto de dosis únicas como de múltiples dosis. Cada dosis de la administración de múltiples dosis se administró a los ratones cada dos días durante 10 días y los ratones se observaron durante otros 4 días, por tanto, durante un total de 14 días.

TABLA 1. Datos de DMT en ratones atímicos

Compuesto	Nivel de dosis (mg/kg)	Supervivencia/ Total	Comentarios
Una sola dosis de Compuesto 9	25	5/5	
	30	5/5	
	35	4/5	El ratón se sometió a una eutanasia debido a una pérdida de peso corporal > 20 %
Múltiples dosis de Compuesto 9	10	5/5	
	15	3/5	Los ratones se sometieron a una eutanasia debido a una pérdida de peso corporal > 20 %
	20	0/5	Los ratones se sometieron a una eutanasia debido a una pérdida de peso corporal > 20 %

La DTM encontrada para PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 9) fue de 30 mg/kg cuando se administró en una sola dosis, y de 10 mg/kg cuando se administró en múltiples dosis (q2d x 5).

EJEMPLO 23. Datos *in vitro*

En la Tabla 2, la citotoxicidad (μ M de cada compuesto que producen una Cl₅₀) indica el potencial antitumoral *in vitro* de cada compuesto. El presente estudio se usó para determinar el efecto de la PEGilación de conjugados de 7-etil-10-hidroxicamptotecina PEGilados de cuatro brazos. La citotoxicidad *in vitro* de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina), 7-etil-10-hidroxicamptotecina y CPT-11 se determinó usando un ensayo con MTS. Se incubaron células con fármacos durante 72 horas a 37 °C. Tras la incubación, se añadió colorante MTS y se midió la formación de un producto coloreado (formazán) a 490 nm.

Los valores de Cl₅₀ de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) y CPT-11 indican que PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) tiene una inhibición *in vitro* mucho mayor en todas las células tumorales analizadas que CPT-11. Además, PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) tiene una inhibición *in vitro* de las células tumorales analizadas a excepción de las células de tumor HT29 significativamente superior que la 7-etil-10-hidroxicamptotecina nativa.

Los conjugados de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) fueron de aproximadamente 10 a 600 veces más potentes que Camp-tosar®. Los conjugados de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) resultaron ser de 8 a 16 veces más sensibles que Pegamotecan (un profármaco de camptotecina PEGilado) en líneas celulares COLO 205, HT-29 y OVCAR-3.

TABLA 2. Datos de CI_{50} (μM)

Tipo de cáncer	Línea celular	7-etil-10-hidroxicamptotecina	Compuesto 9	CPT-11
Colorrectal	Colo 205	0,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,6	11 \pm 1,4
	HT29	0,1 \pm 0,04	0,5 \pm 0,3	27 \pm 8,6
Pulmón	A549	1,0 \pm 0,1	2,7 \pm 0,4	67 \pm 17
De páncreas	PANC-1	0,56 \pm 0,38	0,67 \pm 0,14	34 \pm 16
	MIA PaCa-2	0,18	0,09	67 \pm 46
	ASPC-1	0,64 \pm 0,13	1,6 \pm 1,1	33 \pm 1,0
	BxPC-3	0,54 \pm 0,58	0,24 \pm 0,04	44 \pm 44
De ovario	OVCAR-3	0,1 \pm 0,02	0,3 \pm 0,2	20 \pm 7,1
	OV90	0,1 \pm 0,02	0,6 \pm 0,7	18 \pm 4,8
	OVCAR-8	0,03 \pm 0,01	0,5 \pm 0,1	9,0 \pm 1,3
	A2780	0,02 \pm 0,01	0,2 \pm 0,2	8,0 \pm 3,5
	SK-OV-3	0,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,01	52 \pm 8,5

La CI_{50} de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (Compuesto 9) se expresa en términos de equivalentes de 7-etil-10-hidroxicamptotecina.

Los valores mostrados son la media \pm DE (n = 3); cuando no se muestra la DE, el valor mostrado es una media de dos duplicados.

- Los conjugados de PEG-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) que contienen diversos aminoácidos son potentes citotóxicos *in vitro* contra un grupo de líneas celulares cancerosas como se resume en la Tabla 3. Todos los conjugados de PEG-7-etil-10-hidroxicamptotecina mostraron potentes actividades antitumorales *in vitro* que superan la actividad del profármaco CPT-11 de bajo peso molecular y Pegamotecan.

TABLA 3. Datos de CI_{50} (μM) de varios conjugados de PEG-(7-etil-10-hidroxicamptotecina)

Compuesto	Colorrectal		Ovario	Pulmón
	Colo 205	HT29	OVCAR-3	A549
Compuesto 12 (Ala)	0,03	0,16	0,14	4,4
Compuesto 23 (Sar)	0,04	0,27	0,17	11
Compuesto 18 (Met)	0,03	0,14	0,13	1,6
7-etil-10-hidroxicamptotecina	0,08	0,08	ND	ND
CPT-11	20	56	41	13

10 EJEMPLO 24. Datos *in vitro*-Eficacia de una sola dosis en ratones con xenotransplante de tumor de mama

- Se determinó la eficacia de conjugados de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (compuesto 9) contra un carcinoma mamario humano subcutáneo (MX-1) desarrollado en ratones atímicos de la siguiente manera. Tras al menos una semana de aclimatación, se establecieron los tumores mediante la implantación de pequeños fragmentos de tumor de ratones donantes en una sola zona subcutánea, en la región de la ijada auxiliar izquierda de ratones atímicos. Se observó la zona de la implantación del tumor dos veces por semana y se midió cuando ya era palpable. Se determinó el volumen del tumor de cada ratón midiendo dos dimensiones con un calibrador, y se calculó usando la fórmula: volumen del tumor = (longitud x anchura²). Cuando los tumores alcanzaron el volumen medio de aproximadamente 100 mm³, se dividieron los ratones en sus grupos experimentales, que consistían en controles no tratados, PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) preparado según el Ejemplo 7 de la presente memoria, PEG-Ala-CPT preparado como se describe en Conover *et al.* (Anti-Cancer Drug Design, 1999, 14: 499-506), cuyo contenido se incorpora por referencia en la presente memoria y CPT-11. Los fármacos se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola como una sola dosis de 20 mg/kg de peso corporal de un ratón. La dosis del conjugado se refiere a la cantidad equivalente a 7-etil-10-hidroxicamptotecina. El peso del ratón y los tamaños de los tumores se midieron al comienzo del estudio y a los 31 días de la administración de la dosis única.

- La Tabla 4 muestra contracciones tumorales medidas en ratones a los que se transplantaron células tumorales de mama MX-1 a los 31 días de administrar una dosis única de 20 mg/kg de peso corporal de un ratón mediante inyección intravenosa. El crecimiento global de los tumores se calculó como el volumen tumoral medio (VT). También se calculó un porcentaje del tratamiento frente al control (T/C). El porcentaje de regresión del tumor indica la actividad *in vivo* de cada compuesto. Los conjugados de PEG de cuatro brazos-Gly-7-etil-10-hidroxicamptotecina

mostraron actividad antitumoral significativa con una supervivencia del 100 % de los ratones y un 100 % de curación. Tanto CPT-11 y como el control de solución salina no mostraron protección con una supervivencia del 0 %. Todos los datos se resumen en la Tabla 4.

5 **EJEMPLO 4. Comparación de la eficacia de una sola dosis en modelo de ratones con xenotransplante de tumor de mama MX-1**

Compuesto	VT medio ± DE (mm ³)	VT medio (mm ³)	F/I (%)	Cambio en VT ± DE (%)	ICT (%)	Regresiones (%)	Curaciones (%)	Supervivencia (%)	T/C (%)
Control	1136 ± 686	785	1259	1399 ± 658	0	0	0	0	---
Compuesto 9	7 6 9	3	7	-94 ± 10	99	100	100	100	0,3
PEG-Ala-CPT	43 ± 41	40	42	-40 ± 93	96	50	33	100	5
CPT-11	845 ± 50	845	843	1424 ± 432	26	0	0	0	108

Los resultados muestran que el PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) es significativamente más eficaz que bien PEG-Ala-CPT o CPT-11 en el tratamiento del cáncer de mama.

10 En el modelo de tumor de mama MX-1, el tratamiento con PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) condujo a una inhibición del crecimiento del tumor de casi el 100 % y la curación completa de todos los animales. A niveles de dosis equivalentes, el tratamiento con CPT-11 provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 26 %.

15 **EJEMPLO 25. Datos *in vivo*-Eficacia de múltiples dosis en ratones con xenotransplante de tumor de mama**

Se determinó la eficacia de una serie conjugados de PEG de cuatro brazos-aminoácido (derivado)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) contra un carcinoma de mama humano (MX-1) desarrollado en ratones atímicos. Se asignaron los ratones a los grupos, recibiendo cada uno PEG de cuatro brazos-Ala-(7-etil-10-hidroxicamptotecina), PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina), PEG de 4 brazos-Met-(7-etil-10-hidroxicamptotecina), PEG de 4 brazos-Sar-(7-etil-10-hidroxicamptotecina), cada uno de ellos preparado como se describe en la presente memoria, CPT-11 o control de solución salina. Se administraron a los ratones 5 mg/kg/día durante seis días consecutivos (cada 2 días [q x 2d] x 6). Se controlaron el peso de los ratones y el tamaño de los tumores hasta el día 31 posterior a la primera administración de la dosis y las administraciones posteriores.

25 La Tabla 5 muestra las contracciones tumorales medidas en ratones a los que se transplantaron células de tumor de mama MX-1 a los 31 días de la inyección intravenosa de dosis de 5 mg/kg durante seis días (q2d x 6). Todos los conjugados de PEG de cuatro brazos-aminoácido (derivado)-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) mostraron actividad antitumoral significativa con una supervivencia del 100 % de los ratones y un 100 % de regresión. Ni CPT-11 ni el control de solución salina mostraron protección con una supervivencia del 0 %. Todos los datos se resumen en la Tabla 5.

30 **TABLA 5. Comparación de la eficacia de múltiples dosis en modelo de ratones con xenotransplante de tumor de mama MX-1**

Compuesto	VT medio ± DE (mm ³)	VT medio (mm ³)	F/I (%)	Cambio en VT ± DE (%)	ICT (%)	Regresiones (%)	Curaciones (%)	Supervivencia (%)	T/C (%)
Control	1136 ± 686	785	1259	1399 ± 658	0	0	0	0	---
Compuesto 12 (Ala)	10 ± 11	9,6	10	-91 ± 11	99	100	67	100	1,2
Compuesto 9 (Gly)	12 ± 18	6,6	14	-91 ± 10	99	100	100	100	0,8
Compuesto 18 (Met)	8 ± 9	5,6	7,8	-94 ± 7	99	100	100	100	0,7
Compuesto 23 (Sar)	12 ± 10	14,6	13	-87 ± 12	99	100	100	100	1,9
CPT-11	632 ± 698	340	594	423 ± 243	44	0	0	0	43

Los datos muestran que PEG de cuatro brazos-derivados de aminoácido de 7-etil-10-hidroxicamptotecina son significativamente más eficaces que CPT-11 en el tratamiento del cáncer de mama.

EJEMPLO 26. Eficacias *in vivo* en ratones con xenotransplantes de tumor de mama de pequeño y gran tamaño

Se evaluó la eficacia antitumoral de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) en ratones atímicos portadores de tumores de mama MX-1 humanos establecidos pequeños (de aproximadamente 100 mm³) o grandes (de aproximadamente 450 mm³). Se determinaron las actividades terapéuticas antitumorales en ratones con pautas de dosificación tanto de una sola dosis como de múltiples dosis. En los ratones transplantados con tumores de mama pequeños, el tratamiento con una sola dosis de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (20 mg/kg) condujo a ICT del 100 %. El tratamiento con múltiples dosis de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (20 mg/kg q2d x 5) también condujo a una ICT del 100 %. La administración de una sola dosis (20 mg/kg) de CPT-11 no inhibió el crecimiento tumoral y las múltiples dosis de CPT-11 (20 mg/kg q2d x 5) produjeron una ICT del 44 % al día 31.

En ratones portadores de tumores de mama de gran tamaño, el tratamiento con una sola DTM de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxi camptotecina) (30 mg/kg) produjo una ICT del 96 %. Cuatro de los seis ratones se curaron a partir del día 54. El tratamiento con una sola DTM de CPT-11 (80 mg/kg) produjo una ICT del 70 % al día 13. Todos los animales fueron sacrificados el día 20 debido a la excesiva carga tumoral. El tratamiento con múltiples dosis de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) a su DTM (10 mg/kg q2d x 5) también condujo a una ICT del 96 %, y cinco de los seis ratones se curaron a partir del día 54. El CPT-11, cuando se administró en múltiples dosis a su DTM (40 mg/kg q2d x 5), condujo a una ICT de ~ 95 % a partir del día 13. Sin embargo, los tumores volvieron a crecer en cuatro de los seis ratones tras ~5 semanas. El CPT-11, cuando se administró a niveles de dosis equivalentes a PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) (10 mg/kg q2d x 5), tuvo una ICT eficaz hasta que se interrumpió el tratamiento, tras lo que los tumores volvieron a crecer. Los resultados se exponen en las Fig. 6A y 6C. Los efectos antitumorales no se atribuyen a un efecto tóxico general, ya que el tratamiento bien con PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxi-camptotecina) o CPT-11, cuando se administró a la DTM, no disminuyó significativamente el peso corporal de los animales mientras duró el tratamiento, como se muestra en las Figuras 6B y 6D.

En el modelo de tumor de mama MX-1 con inyecciones de una sola dosis o múltiples dosis, el PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) inhibió eficazmente el crecimiento de los tumores establecidos voluminosos tanto grandes (450 mm³) como pequeños (100 mm³). Los tumores de un tamaño de aproximadamente 75 mm³ a aproximadamente 450 mm³ fueron tratados con éxito en ratones con xenotransplante de tumor de mama MX-1.

EJEMPLO 27. Datos *in vivo*-Eficacia de una sola dosis en ratones con xenotransplante de tumor colorrectal

En este ejemplo, se midió la reducción de los tumores en ratones xenotransplantados con células de tumor colorrectal HT-29 los días 4, 8, 11, 15, 18 y 22 posteriores a una inyección intravenosa de una sola dosis de 30 mg/kg de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) o CPT-11. El CPT 11 también se administró a 80 mg/kg. Los resultados se exponen en la Fig. 7. Los conjugados de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) mostraron una actividad antitumoral significativa. El control de solución salina no mostró ninguna protección con un 0 % de supervivencia. Los resultados muestran que el PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) es significativamente más eficaz que CPT-11 en el tratamiento del cáncer colorrectal.

EJEMPLO 28. Datos *in vivo*-Eficacia de múltiples dosis en ratones con xenotransplante de tumor colorrectal

Se midió la reducción de los tumores en ratones transplantados con células de tumores colorrectales HT-29 los días 4, 8, 11, 15, 18 y 22 posteriores a una inyección intravenosa de una dosis de 10 mg/kg de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) o CPT-11 durante cinco días. El CPT-11 también se administró en dosis de 40 mg/kg durante cinco días. Los resultados se exponen en la Fig. 8. Se obtuvieron resultados similares con la administración de múltiples dosis. Además, la administración de múltiples dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) muestra una eficacia terapéutica significativa en comparación con la de CPT-11. Los resultados muestran que el tratamiento con múltiples dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) es significativamente más eficaz que CPT-11 en el tratamiento del cáncer colorrectal. Como se observa en los ratones con xenotransplante de tumor MX-1, el tratamiento con PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) o CPT-11 no disminuyó significativamente el peso corporal de los ratones durante el tratamiento.

EJEMPLO 29. Datos *in vivo*-Eficacia de una sola dosis en ratones con xenotransplante de tumor de páncreas

En este ejemplo, se midió la reducción de los tumores en ratones xenotransplantados con células de tumor de páncreas MiaPaCa-2 los días 4, 8, 11, 15, 18 y 22 tras una inyección intravenosa de una sola dosis de 30 mg/kg de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxicamptotecina) o CPT-11. El CPT 11 también se administró a 80 mg/kg.

Los resultados se exponen en la Fig. 9. Los conjugados de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) mostraron una actividad antitumoral significativa. El control de solución salina y CPT-11 no mostraron ninguna protección. Los resultados muestran que el PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) es significativamente más eficaz que CPT-11 en el tratamiento del cáncer de páncreas. El tratamiento con una sola dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) produjo una ICT del 71 %, mientras que la terapia con una inyección de una sola dosis de CPT-11 provocó una ICT del 0 %.

EJEMPLO 30. Datos *in vivo*-Eficacia de múltiples dosis en ratones con xenotransplante de tumor de páncreas

Se midió la reducción de los tumores en ratones xenotransplantados con células de tumor de páncreas MiaPaCa-2 los días 4, 8, 11, 15, 18 y 22 posteriores a una inyección intravenosa de 10 mg/kg/dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) o CPT-11 durante cinco días. El CPT-11 también se administró en dosis de 40 mg/kg durante cinco días. Los resultados se exponen en la Fig. 10. La administración de múltiples dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) muestra una eficacia terapéutica significativa en comparación con la de CPT-11. Los resultados muestran que las múltiples dosis de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) es más eficaz que CPT-11 en el tratamiento del cáncer de páncreas. El tratamiento con múltiples dosis de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) produjo una ICT del 95 %, mientras que CPT-11 produjo una ICT del 34 %.

EJEMPLO 31. Metabolismo *in vitro*

Se observó el metabolismo *in vitro* de conjugados de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) en hepatocitos de rata. Se incubó PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) con hepatocitos de rata durante 2 horas, pH 7,5, 37 °C. Como se muestra en la Figura 11, 7-etil-10-hidroxiamptotecina y 7-etil-10-hidroxiamptotecina-glucurónido (7-etil-10-hidroxiamptotecina-G) fueron los principales metabolitos identificados, lo que coincide con la vía metabólica conocida de 7-etil-10-hidroxiamptotecina *in vivo*.

EJEMPLO 32. Propiedades de los conjugados de PEG

La Tabla 6 muestra la solubilidad de cuatro conjugados diferentes de PEG-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) en solución salina acuosa. La totalidad de los cuatro conjugados de PEG-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) mostraron una buena solubilidad de hasta 4 mg/ml equivalentes de 7-etil-10-hidroxiamptotecina. En el plasma humano, la 7-etil-10-hidroxiamptotecina se libera de manera constante desde los conjugados de PEG con un tiempo de duplicación de 22 a 52 minutos, y la liberación pareció depender del pH y de la concentración como se describe en el siguiente Ejemplo 33.

TABLA 6. Propiedades de conjugados de PEG-7-etil-10-hidroxiamptotecina

Compuesto	Solubilidad en solución salina (mg/ml) ^a	t _{1/2} (min) en plasma humano ^b	Tiempo de duplicación en plasma (min) ^c		
			Ser humano	Ratón	Rata
Compuesto 9 (Gly)	180	12,3	31,4	49,5	570
Compuesto 12 (Ala)	121	12,5	51,9	45,8	753
Compuesto 23 (Sar)	ND	19,0	28,8	43,4	481
Compuesto 18 (Met)	142	26,8	22,2	41,9	1.920

^a La 7-etil-10-hidroxiamptotecina no es soluble en solución salina.
^b Semivida del conjugado de PEG.
^c Velocidad de formación de 7-etil-10-hidroxiamptotecina a partir de los conjugados.

Los conjugados de PEG-7-etil-10-hidroxiamptotecina muestran una buena estabilidad en solución salina y otro medio acuoso durante hasta 24 horas a temperatura ambiente.

EJEMPLO 33. Efectos de la concentración y el pH sobre la estabilidad

Basándose en el trabajo anterior, la acilación en la posición de 20-OH protege el anillo de lactona de la forma cerrada activa. Se controlaron la estabilidad acuosa y las propiedades de hidrólisis en plasma humano y de rata usando métodos de HPLC basados en UV. Se incubaron conjugados de PEG de cuatro brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) con cada muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La estabilidad de los conjugados de PEG-7-etil-10-hidroxiamptotecina en tampón dependió del pH. La Figura 12 muestra la estabilidad de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxiamptotecina) en diversas muestras. La Figura 13

muestra que la velocidad de liberación de 7-etil-10-hidroxycamptotecina de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina) aumenta al aumentar el pH.

EJEMPLO 34. Farmacocinética

Ratones Balb/C macho sin tumores recibieron una sola inyección de 20 mg/kg de PEG de conjugados de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina). En varios puntos temporales, se sacrificaron ratones y se analizaron los conjugados intactos y la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada del plasma mediante HPLC. El análisis farmacocinético se realizó mediante un análisis no compartimental (WinNonlin). Los datos se exponen en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos farmacocinéticos

Parámetro	Compuesto 9	7-etil-10-hidroxi-camptotecina liberada del Compuesto 9
ABC (h*µg/ml)	124.000	98,3
t _{1/2} terminal (h)	19,3	14,2
C _{max} (µg/ml)	20.500	13,2
CL(ml/h/kg)	5,3	202
V _{ee} (ml/kg)	131	3.094

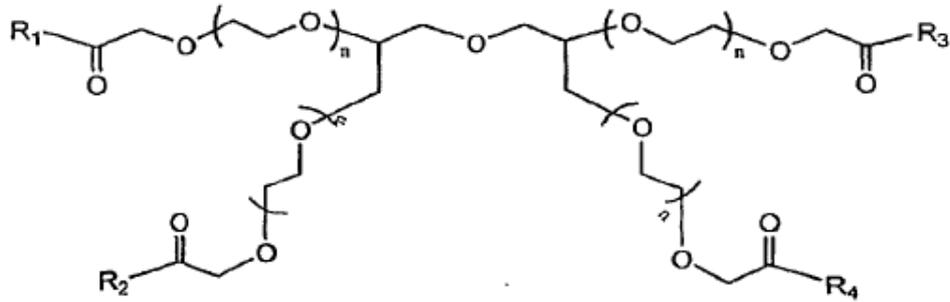
Como se muestra en la Figura 14, la pegilación de 7-etil-10-hidroxycamptotecina permite una larga semivida en circulación y una alta exposición al fármaco nativo 7-etil-10-hidroxycamptotecina. Se observó la circulación enterohepática de conjugados de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina). El perfil farmacocinético de PEG-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina) en ratones fue bifásico, mostrando una rápida fase de distribución en plasma durante las 2 primeras horas seguidas de una semivida de eliminación terminal de 18-22 horas para el conjugado y una semivida de eliminación terminal concomitante de 18-26 horas para la 7-etil-10-hidroxi camptotecina.

Además, se estudiaron los perfiles farmacocinéticos de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina) en ratas. En ratas, se usaron niveles de dosis de 3, 10 y 30 mg/kg (equivalente de 7-etil-10-hidroxi camptotecina). Los perfiles farmacocinéticos en ratas coincidieron con los de los ratones.

En las ratas, el PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina) mostró un aclaramiento bifásico de la circulación con una semivida de eliminación de 12-18 horas en ratas. La 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada de los conjugados de PEG de 4 brazos-Gly-7-etil-10-hidroxycamptotecina resultó tener una semivida de eliminación aparente de 21-22 horas. La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (ABC) aumentó de una manera dependiente de la dosis en ratas. La semivida aparente de la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada de conjugados de PEG de 4 brazos-Gly en ratones o ratas es significativamente más larga que la semivida aparente descrita de la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada de CPT-11, y la exposición de 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada de PEG de 4 brazos-Gly-(7-etil-10-hidroxycamptotecina) es significativamente mayor que la exposición descrita para la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada de CPT-11. El aclaramiento del compuesto precursor fue de 0,35 ml/h/kg en ratas. El volumen estimado de distribución en estado estacionario (V_{ee}) del compuesto precursor fue de 5,49 ml/kg. El aclaramiento de la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada fue de 131 ml/kg en ratas. El V_{ee} estimado de la 7-etil-10-hidroxi camptotecina liberada fue de 2.384 ml/kg en ratas. Se observó la circulación enterohepática de la 7-etil-10-hidroxycamptotecina liberada tanto en ratones y ratas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I):



5 en la que

R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, OH o (L)_m-D;

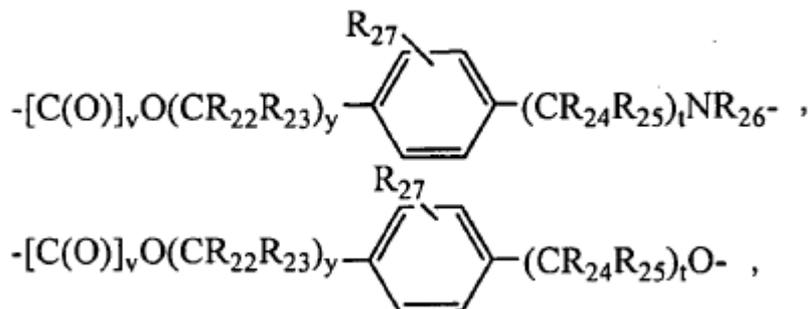
L es un residuo de un aminoácido o derivado de aminoácido, en donde el derivado de aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en:

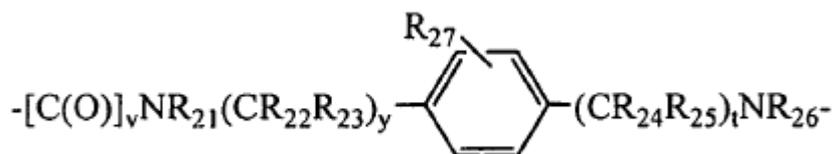
- 10 ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-aminobutírico, desmosina, ácido 2,2-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, *n*-etilglicina, *N*-etilasparagina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, *N*-metilglicina, sarcosina, *N*-metil-isoleucina, 6-*N*-metil-lisina, *N*-metilvalina, norvalina, norleucina y ornitina; o

L es un adaptador bifuncional seleccionado del grupo que consiste en:

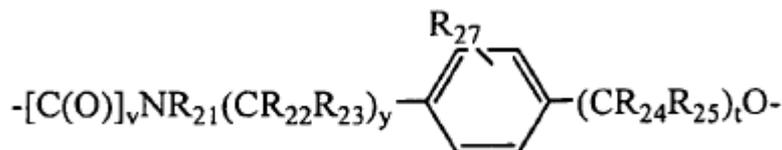
- 20 [C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃O)_t⁻,
 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃O)_t(CR₂₄R₂₅)_yO⁻,
 25 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃O)_t(CR₂₄R₂₅)_y⁻,
 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tO⁻,
 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_t(CR₂₄CR₂₅O)_yNR₂₆⁻
 30 -[C(O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆⁻,
 -[C(O)]_vO(CR₂₂R₂₃)_tO⁻,
 35 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_tNR₂₆⁻,
 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_t(CR₂₄CR₂₅O)_y⁻,
 -[C(O)]_vNR₂₁(CR₂₂R₂₃)_t(CR₂₄CR₂₅)_yNR₂₆⁻,

40





y



en los que:

5

R_{21} - R_{26} están seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilos C_{1-6} , alquenos C_{2-6} , alquinos C_{2-6} , alquilos C_{3-19} ramificados, cicloalquilos C_{3-8} , alquilos C_{1-6} sustituidos, alquenos C_{2-6} sustituidos, alquinos C_{2-6} sustituidos, cicloalquilos C_{3-8} sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos C_{1-6} sustituidos, alcoxi C_{1-6} , fenoxi y heteroalcoxi C_{1-6} ;

10

R_{27} está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilos C_{1-6} , alquenos C_{2-6} , alquinos C_{2-6} , alquilos C_{3-19} ramificados, cicloalquilos C_{3-8} , alquilos C_{1-6} sustituidos, alquenos C_{2-6} sustituidos, alquinos C_{2-6} sustituidos, cicloalquilos C_{3-8} sustituidos, arilos, arilos sustituidos, aralquilos, heteroalquilos C_{1-6} , heteroalquilos C_{1-6} sustituidos, alcoxi C_{1-6} , fenoxi, heteroalcoxi C_{1-6} , NO_2 , haloalquilo y halógeno;

15

t e y son números enteros positivos seleccionados individualmente de entre aproximadamente 1 a aproximadamente 4; y v es 0 o 1;

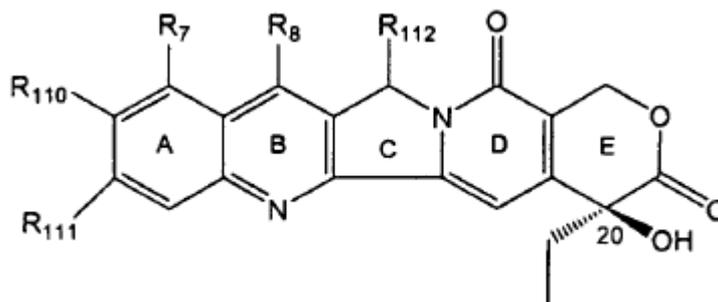
m es un número entero positivo de 1 a 10;

n es un número entero positivo;

20

con la condición de que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 no sean todos OH; y

D es un residuo de una camptotecina o del compuesto de Fórmula (II):



25

en la que:

R_7 está seleccionado del grupo que consiste en NO_2 , NH_2 , N_3 , hidrógeno, halógeno, F, Cl, Br, I, $COOH$, OH, O-alquilo C_{1-8} , SH, S-alquilo C_{1-3} , CN, CH_2NH_2 , NH-alquilo C_{1-3} , CH_2NH -alquilo C_{1-3} , N(alquilo C_{1-3})₂, CH_2N (alquilo C_{1-3}), O-, NH- y S- $CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- y S- $CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- y S- $CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- y S- CH_2CH_2N (alquilo C_{1-3})₂, O-, NH- y S- $CH_2CH_2CH_2N$ (alquilo C_{1-3})₂, CHO y alquilo C_{1-3} ; y

30

R_8 está seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo C_{1-8} y $CH_2NR_9R_{10}$

en donde

35

R_9 está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquil C_{3-7} -alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} -alquilo C_{1-6} ;

R_{10} está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquil C_{3-7} -alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} -alquilo C_{1-6} y COR₁₁;

en donde R_{11} está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , perhaloalquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , cicloalquil C_{3-7} -alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} y alcoxi C_{1-6} -alquilo C_{1-6} ; o

40

R₉, R₁₀ y nitrógeno del anillo B forman un anillo heterocíclico de 3-7 miembros que contiene O, S o NR₁₂;

en donde R₁₂ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, arilo, arilo sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, halógeno, nitro, amino, alquilamino C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, hidroxi-alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆ y -COR₁₃, en donde R₁₃ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, arilo y arilo sustituido con uno o más grupos alquilo C₁₋₆, perhalo-alquilo C₁₋₆, hidroxi-alquilo C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆;

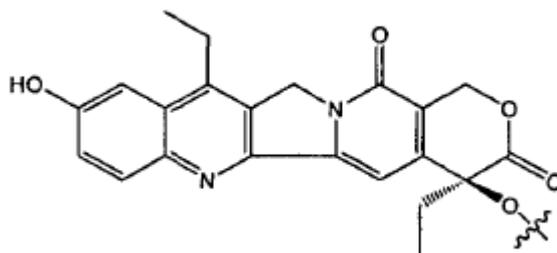
R₁₁₀-R₁₁₁ están seleccionados cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, acilo, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, ciano, nitro, azido, amido, hidrazina, amino, amino sustituido, hidroxicarbonilo, alcoxicarbonilo, alquilcarbonilo, alquilcarbonilamino, carbamoilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, -C(R₁₁₇)=N-(O)_j-R₁₁₈, en donde R₁₁₇ es H, alquilo, alqueno, cicloalquilo o arilo, j es 0 o 1, y R₁₁₈ es H, alquilo, alqueno, cicloalquilo o heterociclo, R₁₁₉C(O)O_r, en donde R₁₁₉ es halógeno, amino, amino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido o R₁₂₀-O-(CH₂)_k, donde k es un número entero de 1-10 y R₁₂₀ es alquilo, fenilo, fenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido; o

R₇ junto con R₁₁₀, o R₁₁₀ junto con R₁₁₁ forman metilendioxi, etilendioxi o etilenoxi sustituidos o no sustituidos; y

R₁₁₂ es H o OR', en donde R' es alquilo, alqueno, cicloalquilo, haloalquilo o hidroxialquilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que D es un residuo del compuesto de Fórmula (II), en la que R₁₁₀-R₁₁₁ están cada uno seleccionado de manera independiente del grupo que consiste en hidrógeno e hidroxilo; y R₁₁₂ es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el residuo del análogo de camptotecina es



4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que L es un residuo de glicina, alanina, metionina o sarcosina.

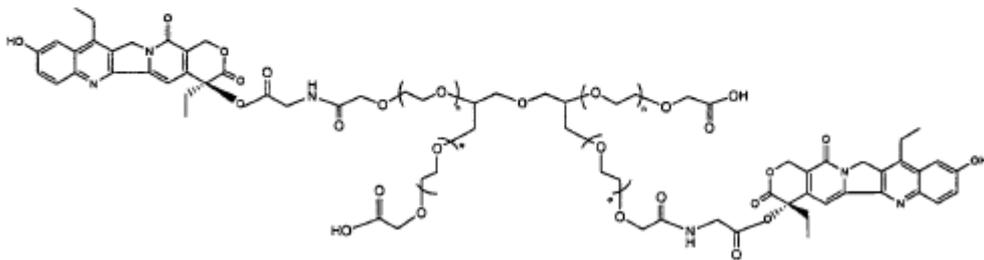
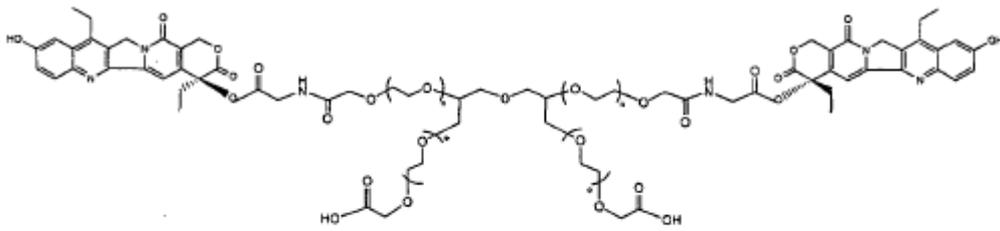
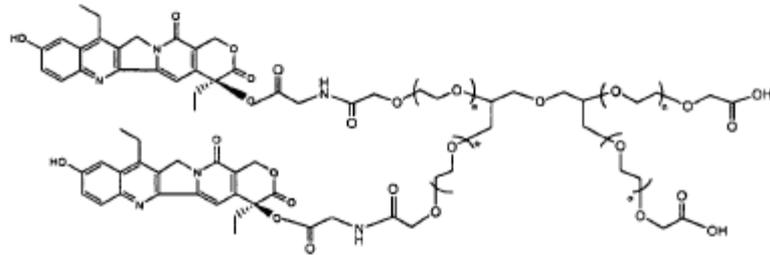
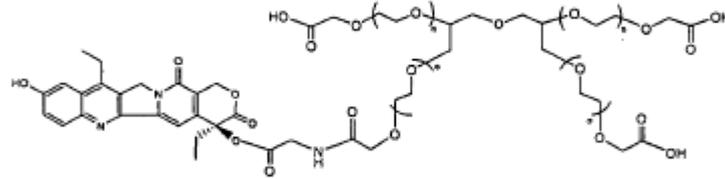
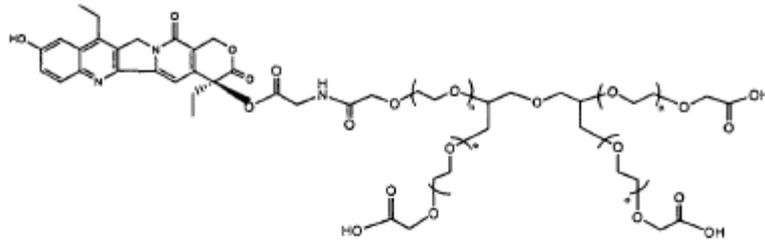
5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que L es un residuo de glicina.

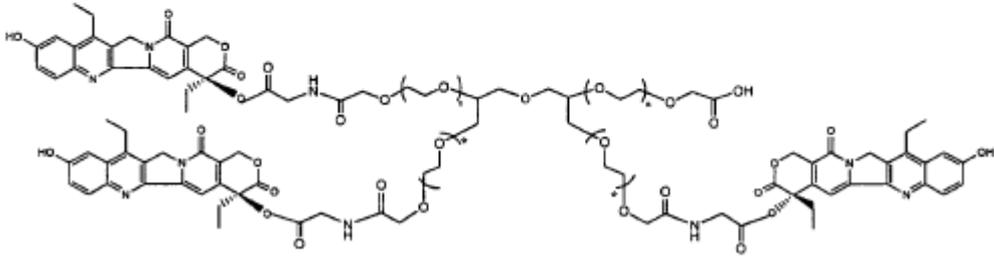
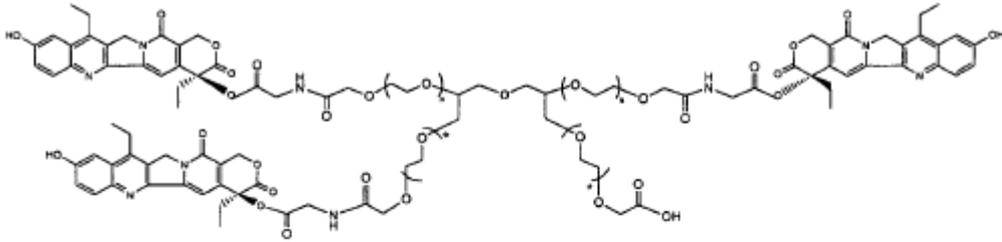
6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que m es 1.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que n es de 28 a 341, preferentemente de 114 a 227, más preferentemente 227, de manera que el peso molecular total de la parte polimérica del compuesto es de aproximadamente 40.000 daltons.

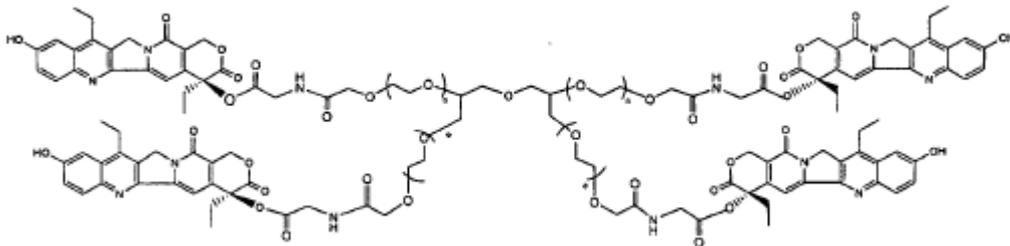
8. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene una carga de al menos aproximadamente 3,9 de (L)_m-D.

9. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

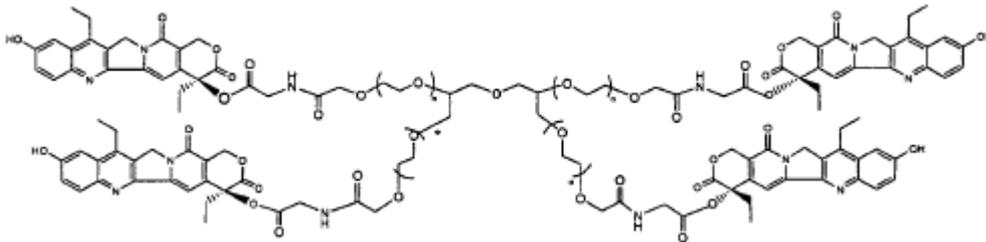




y



10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método para el tratamiento de un mamífero mediante terapia.
11. El compuesto de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz de compuesto de la reivindicación 1 a un paciente que lo necesita.
12. El compuesto para su uso en la reivindicación 11, en el que el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en tumores sólidos, linfomas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia linfocítica aguda (LLA), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico.
13. El compuesto para su uso en la reivindicación 11, en la que el cáncer es metastásico.
14. El compuesto para su uso en la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, de ovario o de páncreas, y el compuesto es



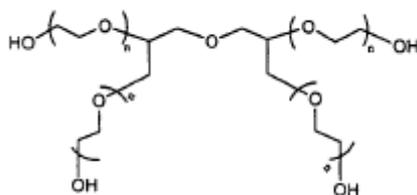
15. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en el que el compuesto es administrado en cantidades de aproximadamente 1 mg/kg/semana a aproximadamente 100 mg/kg/semana, preferentemente de aproximadamente 2 mg/kg/semana a aproximadamente 60 mg/kg/semana.

16. El compuesto para el uso de la reivindicación 14, en el que la enfermedad metastásica es cáncer de mama y el compuesto es administrado en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/kg/dosis.

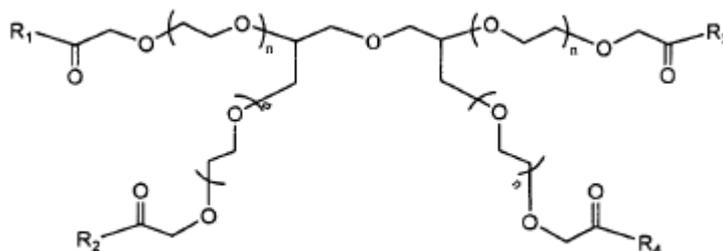
5 17. El compuesto para el uso de la reivindicación 14, en el que la enfermedad metastásica es cáncer colorrectal o cáncer de páncreas y el compuesto es administrado en cantidades de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg/kg/dosis.

18. Un método de preparación de un profármaco polimérico de múltiples brazos que comprende:

- 10 a) proporcionar un equivalente de una camptotecina o un análogo de camptotecina que contiene un grupo 20-hidroxilo disponible y uno o más equivalentes de un adaptador bifuncional que contiene un grupo de ácido carboxílico disponible;
- (b) hacer reaccionar los dos reactantes en condiciones eficaces para formar un intermedio adaptador bifuncional-camptotecina que tiene un grupo amina disponible; y
- 15 (c) hacer reaccionar uno o más equivalentes por sitio activo del producto intermedio resultante y un equivalente de un polímero activado de fórmula (I), en donde la fórmula (I) es



en condiciones eficaces para formar el profármaco polimérico de múltiples brazos que tiene la estructura de

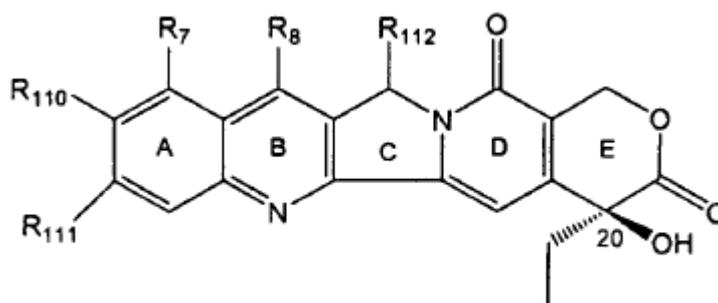


20

en la que

- 25 R₁, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, OH o (L)_m-D;
 L es un adaptador bifuncional;
 m es 0 o un número entero positivo;
 n es un número entero positivo;
 con la condición de que R₁, R₂, R₃ y R₄ no sean todos OH; y

30 D es un residuo de una camptotecina o del compuesto de Fórmula (II):



en la que:

35

R₇ está seleccionado del grupo que consiste en NO₂, NH₂, N₃, hidrógeno, halógeno, F, Cl, Br, I, COOH, OH, O-alquilo C₁₋₈, SH, S-alquilo C₁₋₃, CN, CH₂NH₂, NH-alquilo C₁₋₃, CH₂-NH-alquilo C₁₋₃, N(alquilo C₁₋₃)₂, CH₂N (alquilo C₁₋₃), O-, NH- y S-CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂CH₂OH)₂, O-, NH- y S-CH₂CH₂CH₂N(alquilo C₁₋₃)₂, CHO o alquilo C₁₋₃; y
 R₈ está seleccionado del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₈ y CH₂NR₉R₁₀

en donde

R₉ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆;

R₁₀ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆ y COR₁₁;

en donde R₁₁ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhaloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆; o R₉, R₁₀ y nitrógeno del anillo B forman un anillo heterocíclico de 3-7 miembros que contiene O, S o NR₁₂;

en donde R₁₂ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhaloalquilo C₁₋₆, arilo, arilo sustituido con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, halógeno, nitro, amino, alquilamino C₁₋₆, perhaloalquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆ y -COR₁₃, en donde R₁₃ está seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, perhaloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, arilo y arilo sustituido con uno o más de alquilo C₁₋₆, perhaloalquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆;

R₁₁₀-R₁₁₁ están seleccionados cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, acilo, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, ciano, nitro, azido, amido, hidrazina, amino, amino sustituido, hidroxicarbonilo, alcocarbonilo, alquilcarbonilo, alquilcarbonilamino, carbamoilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, -C(R₁₁₇)=N-(O)_j-R₁₁₈, en donde R₁₁₇ es H, alquilo, alqueno, cicloalquilo o arilo, j es 0 o 1, y R₁₁₈ es H, alquilo, alqueno, cicloalquilo o heterociclo, R₁₁₉C(O)O-, en donde R₁₁₉ es halógeno, amino, amino sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y R₁₂₀-O-(CH₂)_k-, donde k es un número entero de 1-10 y R₁₂₀ es alquilo, fenilo, fenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido; o

R₇ junto con R₁₁₀, o R₁₁₀ junto con R₁₁₁ forman metilendioxi, etilendioxi o etilenoxi sustituidos o no sustituidos; y

R₁₁₂ es H o OR', en donde R' es alquilo, alqueno, cicloalquilo, haloalquilo o hidroxialquilo.

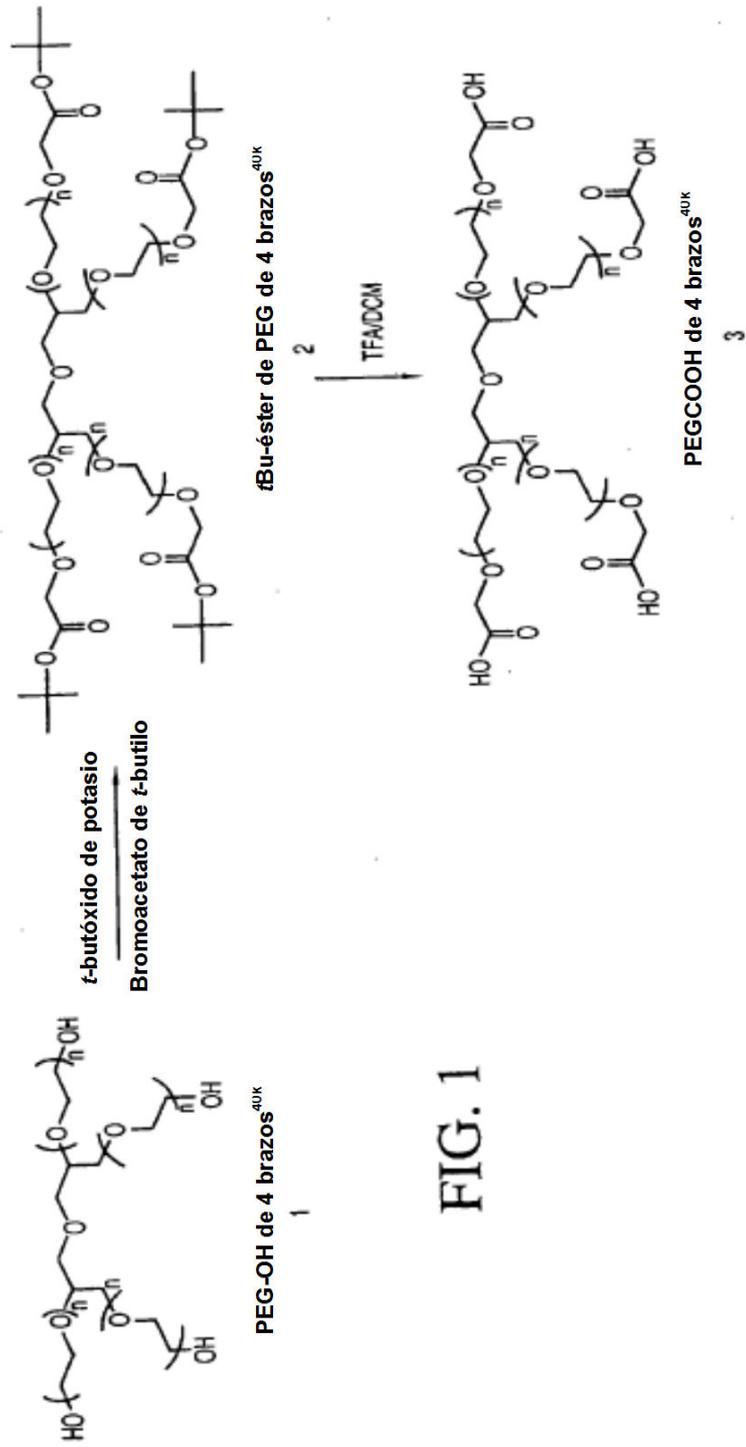


FIG. 1

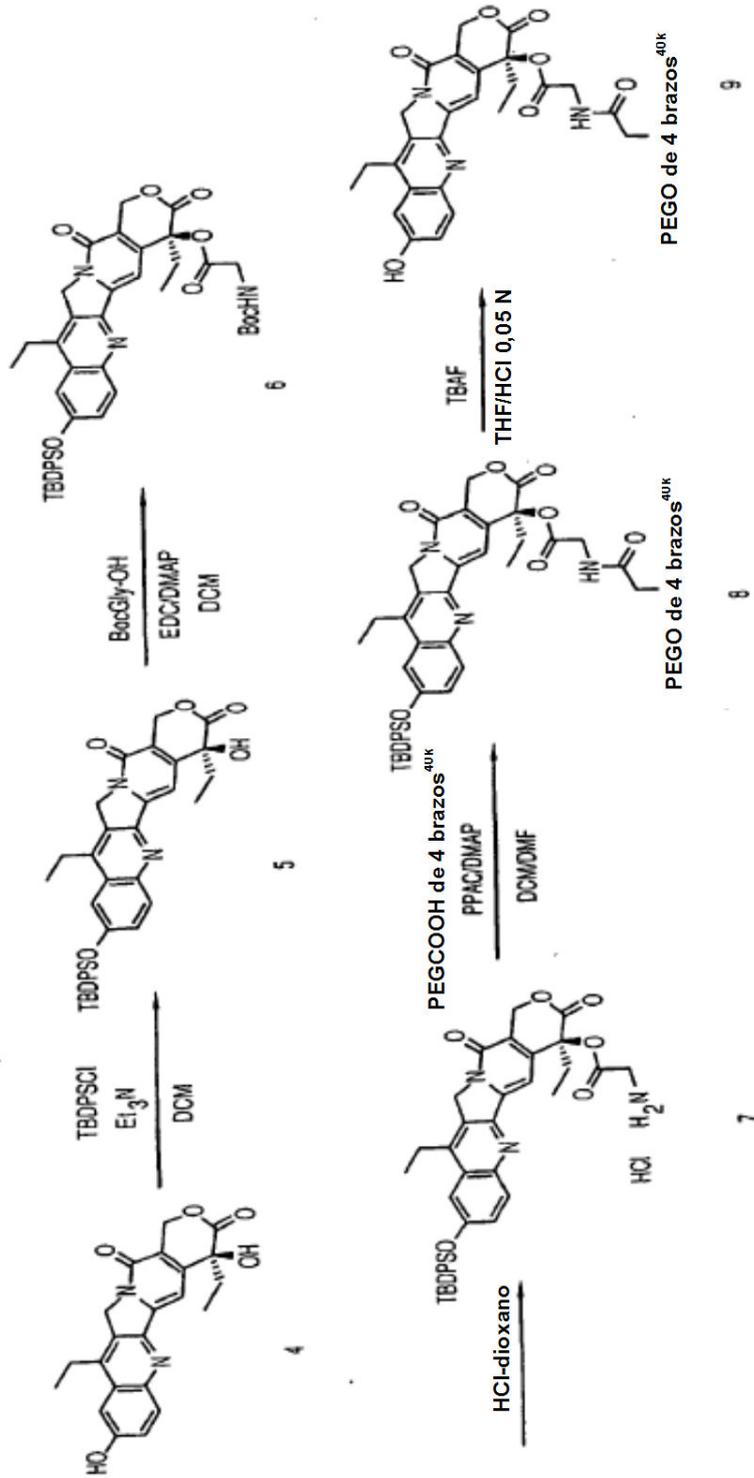


FIG. 2

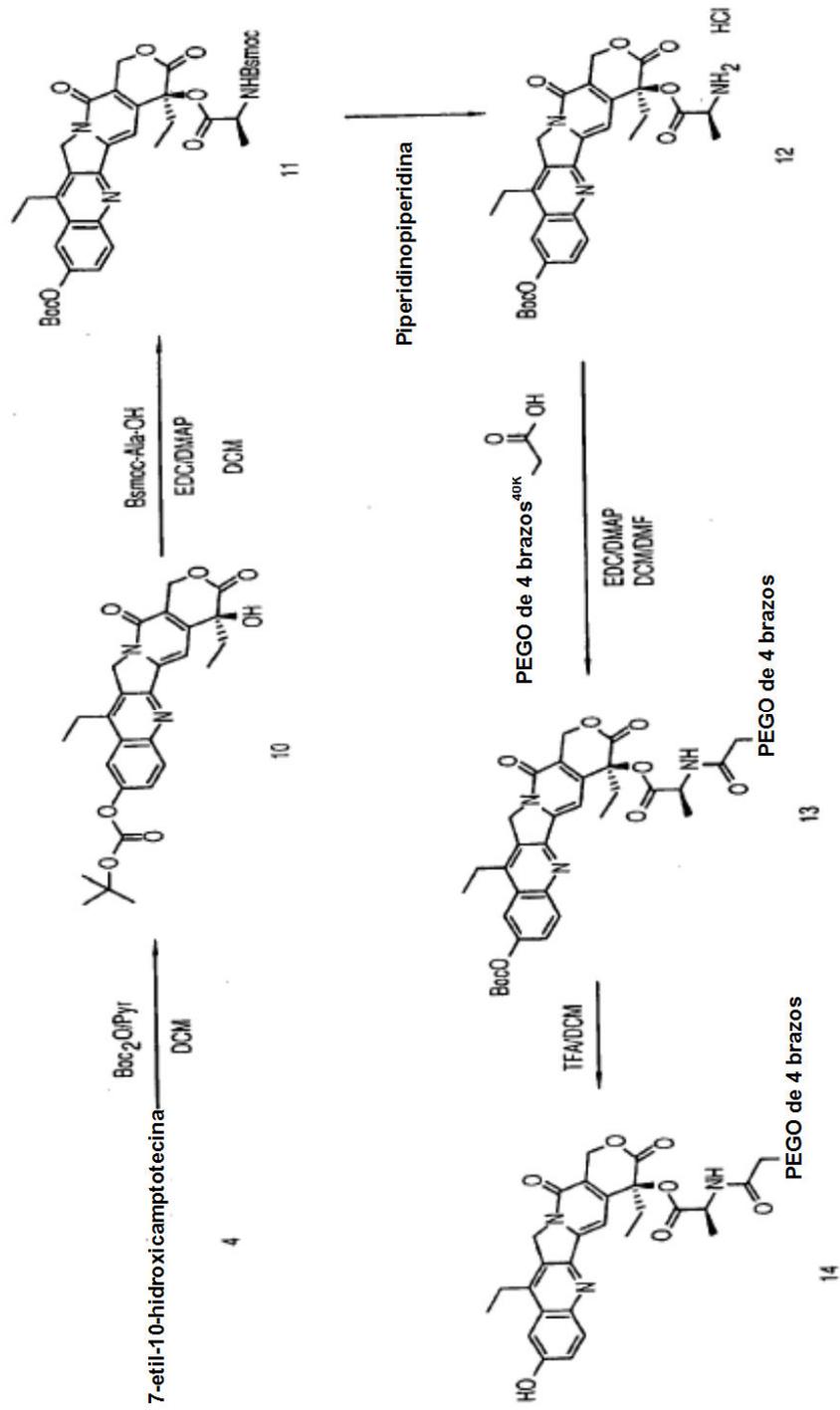


FIG. 3

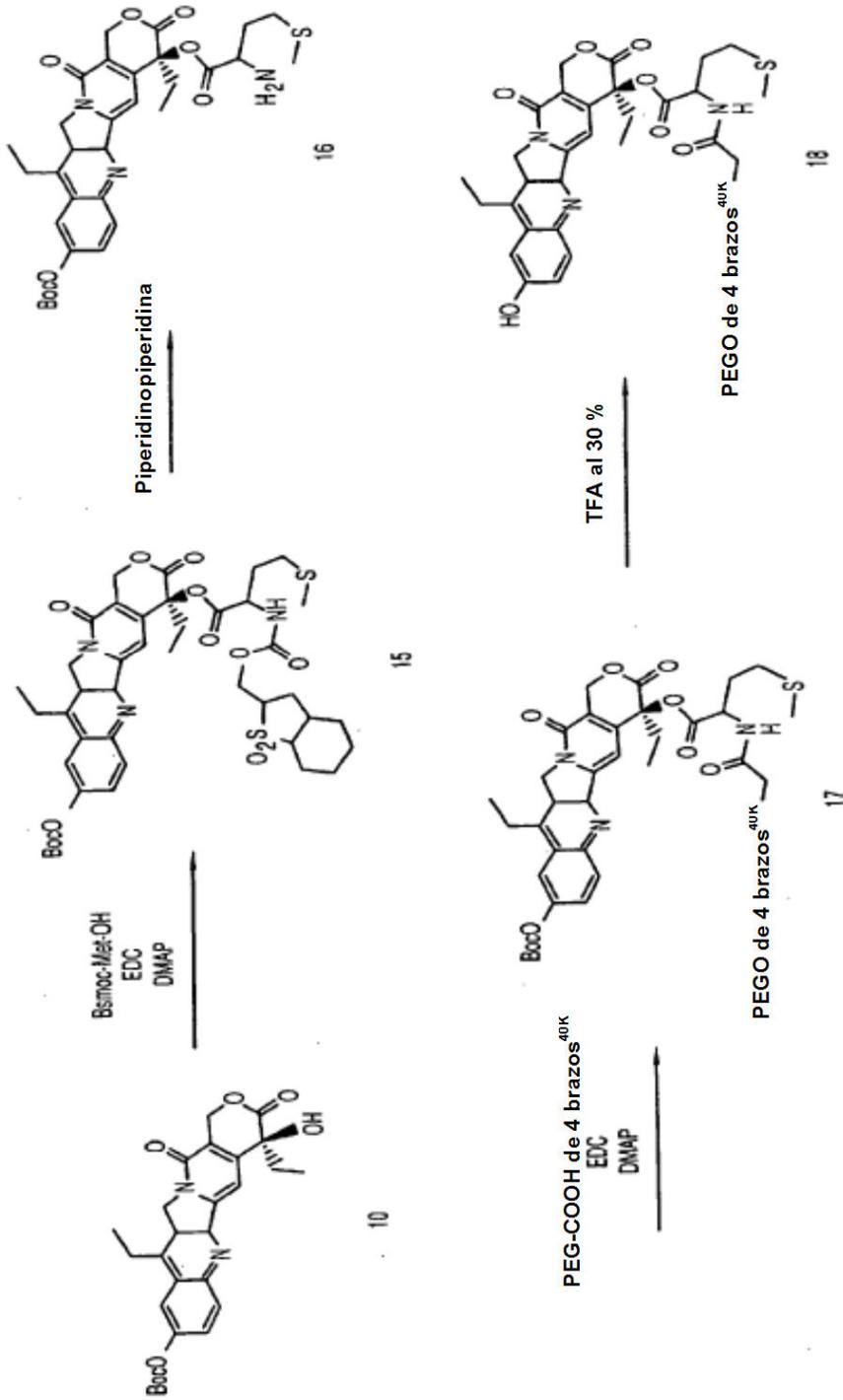


FIG. 4

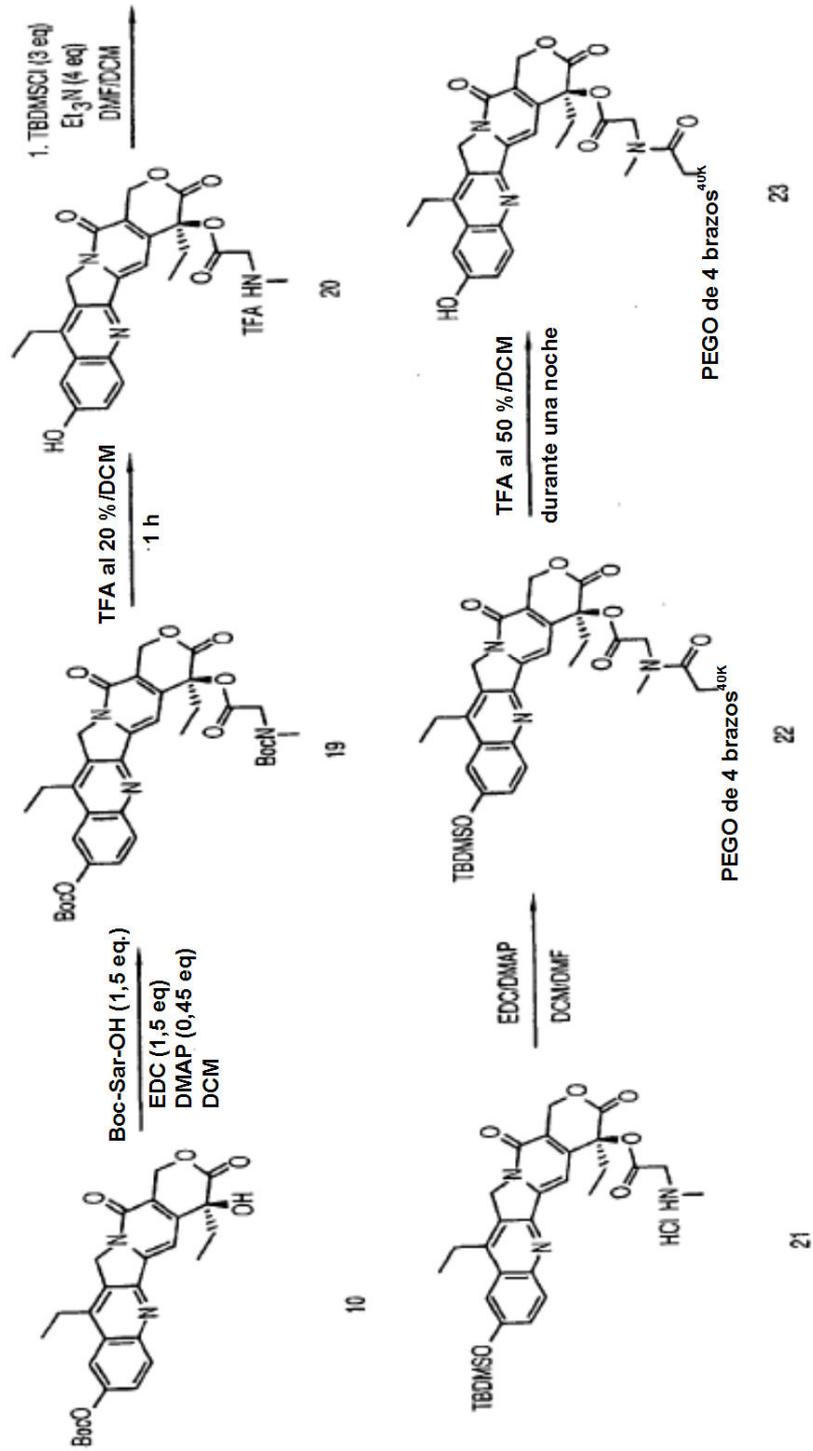


FIG. 5

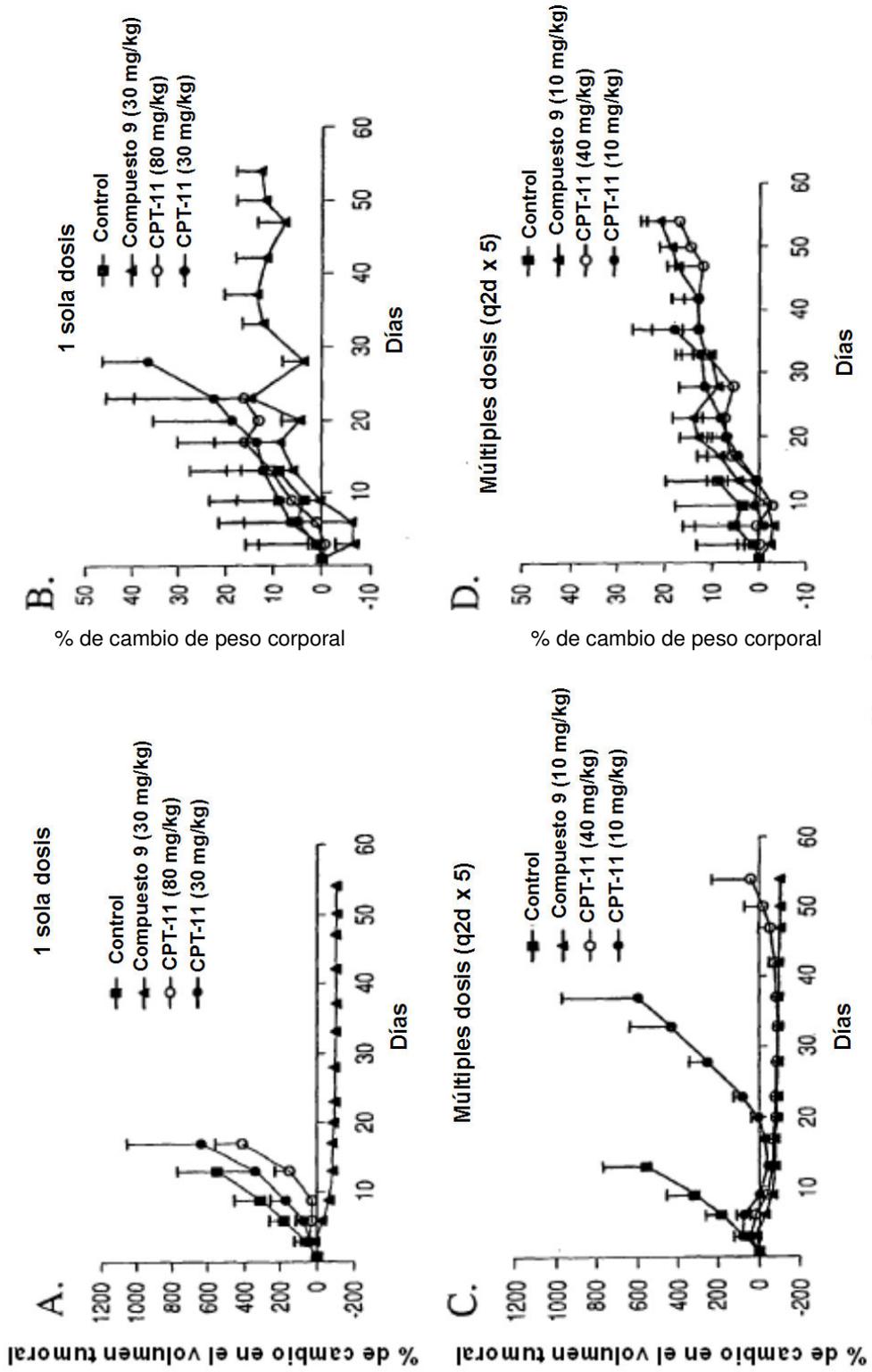


FIG. 6

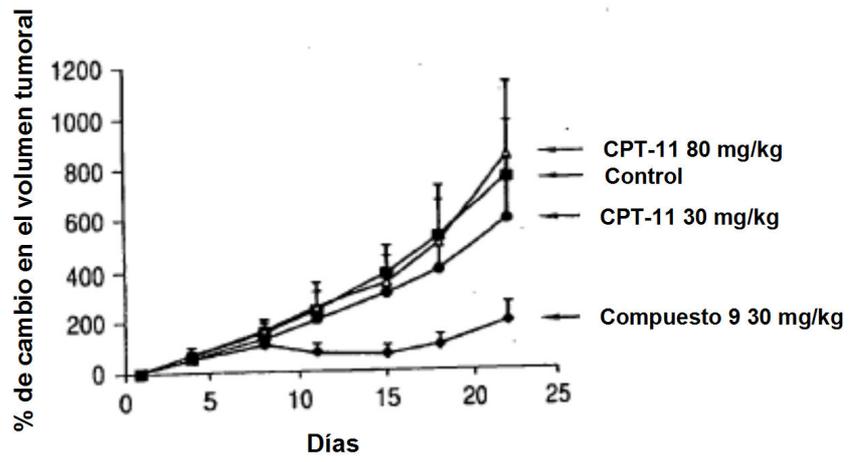


FIG. 7

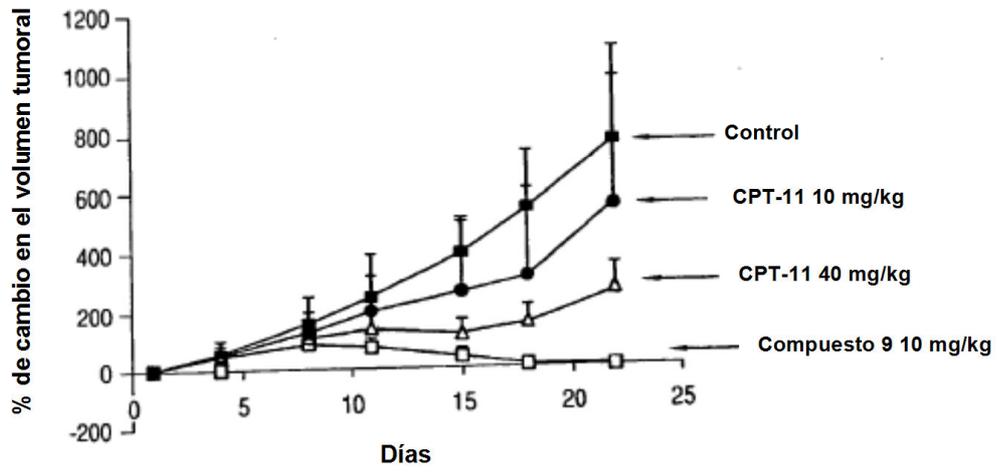


FIG. 8

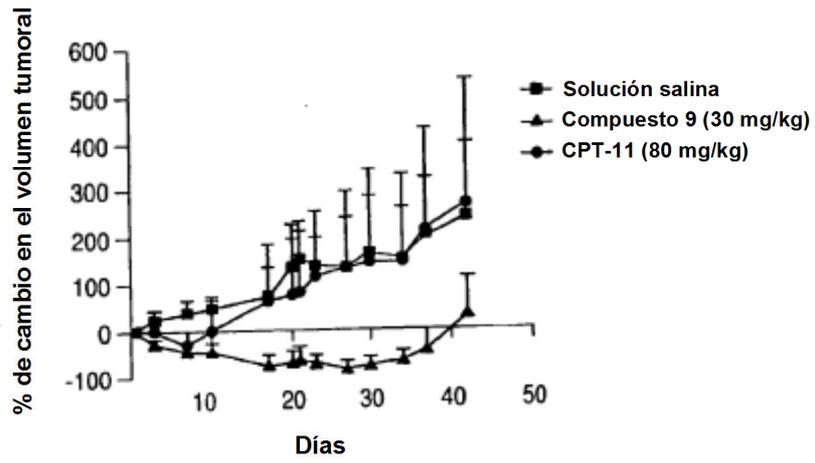


FIG. 9

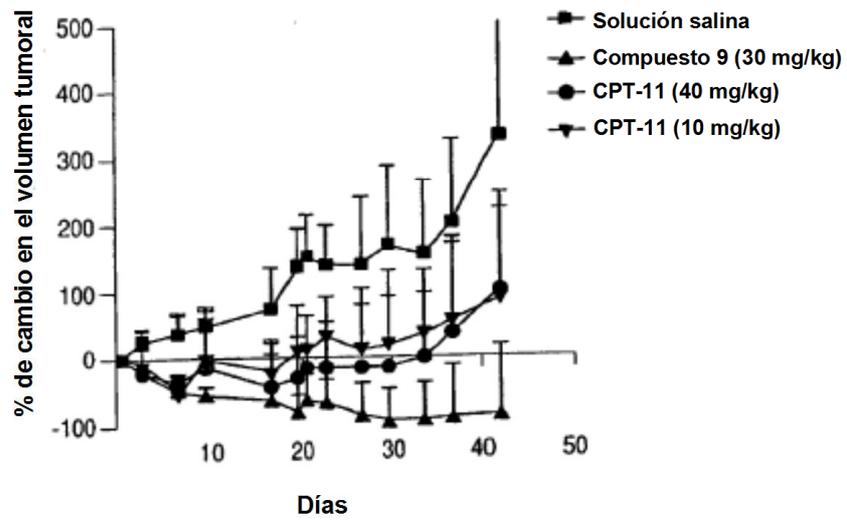


FIG. 10

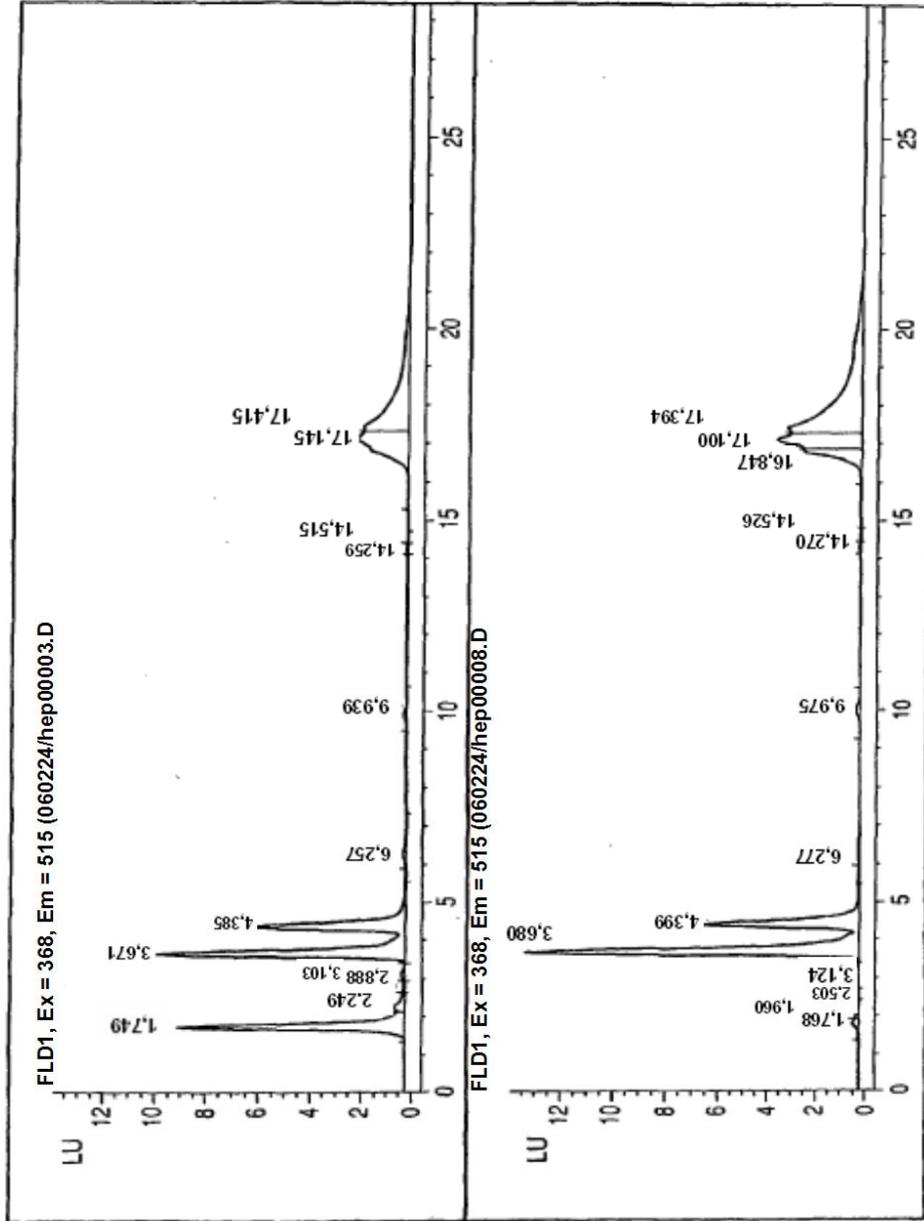


FIG. 11

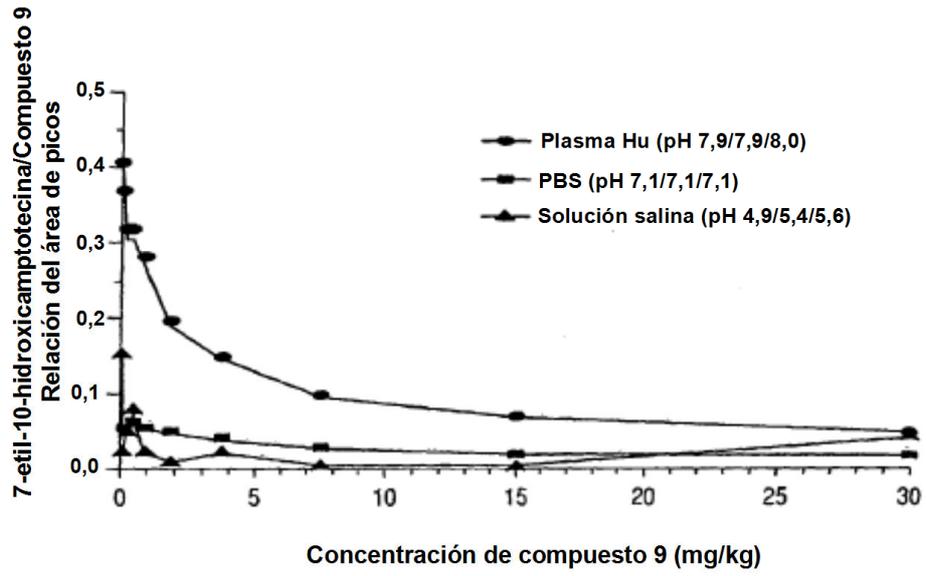


FIG. 12

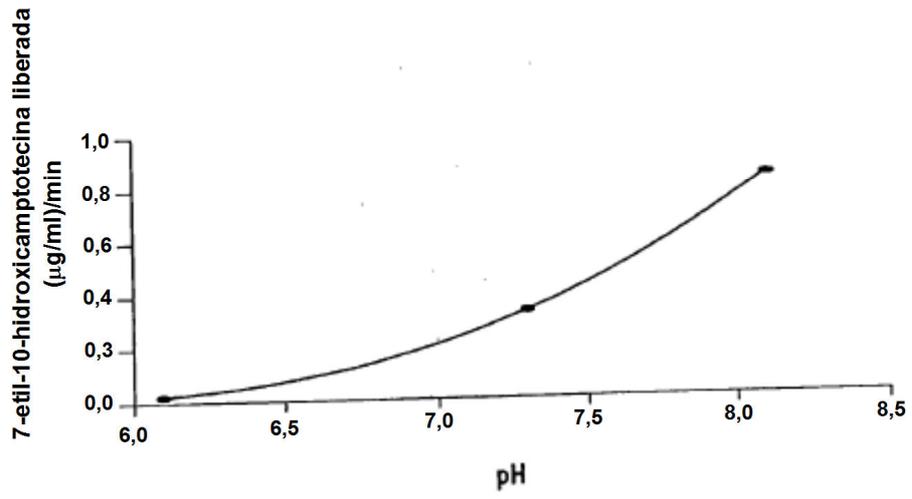


FIG. 13

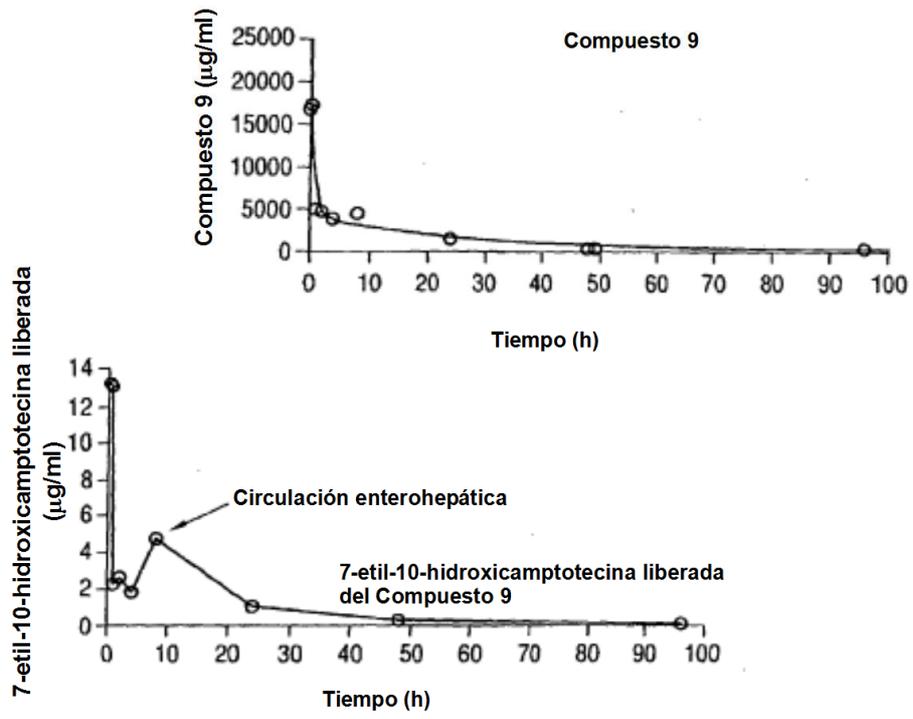


FIG. 14