

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 017**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2000 E 10183870 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2347770**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de una formulación medicamentosa inyectable**

30 Prioridad:

09.06.1999 DE 19926154

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**VERGELL MEDICAL S.A. (100.0%)
5, Rue des l'Eveche
1204 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

KRATZ, FELIX

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 623 017 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

Procedimiento para la preparación de una formulación medicamentosa inyectable

5 El presente invento se refiere a una sustancia para la utilización como medicamento inyectable para el tratamiento de un cáncer, que se compone de una sustancia activa, una molécula espaciadora y por lo menos una molécula que fija proteínas. Después de haberse reunido con el cuerpo, la sustancia se fija covalentemente a componentes de líquidos corporales o de tejidos a través de la molécula que fija proteínas, de tal manera que se presenta una forma de transporte de la sustancia activa que es dissociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos, de un modo dependiente del pH, mediando liberación de la sustancia activa.

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

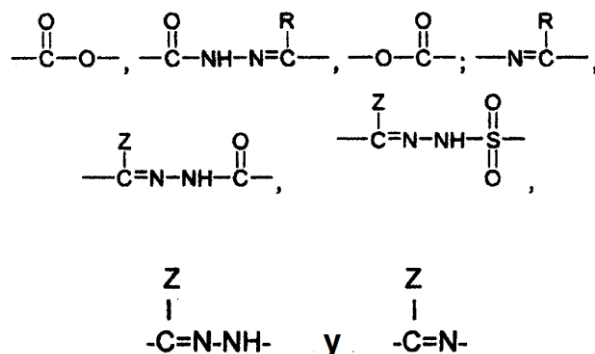
15 A fin de mejorar la selectividad de fármacos de bajo peso molecular, se siguen varias estrategias, por ejemplo la derivatización química de estructuras directoras, la formulación como profármacos o el acoplamiento de los fármacos a moléculas de vehículo y soporte. El presente invento parte de aquellos conceptos, en los que ciertos fármacos se habían fijado químicamente a macromoléculas propias del cuerpo. Se conocen unos conjugados, en los que, por lo general, unos agentes citostáticos se fijan a proteínas séricas, predominantemente a determinadas moléculas de vehículo, tales como albúmina sérica humana y transferrina sérica humana, y luego se administran. Estos conocidos conjugados de proteínas se preparan mediante el recurso de que o bien *ex vivo* en un "procedimiento de un solo recipiente" (es decir, sin aislamiento de los productos intermedios), el agente citostático se acopla a la proteína sérica (véase el documento de solicitud de patente alemana DE 41 22 210.A1) y se obtiene el resultante conjugado de una albúmina y del agente citostático, o bien en primer lugar el agente citostático se derivatiza con una molécula espaciadora apropiada, el producto resultante se aísla y en una segunda etapa el agente citostático derivatizado de esta manera se acopla a través de un grupo maleinimido a la proteína (véanse el documento DE 196 36 889 A1 y el documento de solicitud de patente internacional PCT/DE 97/02000) y el resultante conjugado de una albúmina y del agente citostático se aísla. Ambos procedimientos tienen la desventaja de que se utilizan unas proteínas plasmáticas, que pueden contener agentes patógenos. Otras desventajas de los descritos conjugados de una proteína y de una sustancia activa las constituyen su estabilidad y su resistencia en almacenamiento que son insatisfactorias, y el esfuerzo técnico para su preparación.

20 El invento está basado en la misión de superar estas desventajas. El problema planteado por esta misión se resuelve mediante una sustancia para la utilización como medicamento inyectable para el tratamiento de un cáncer, estando caracterizada la sustancia por que tiene la fórmula:



en la que

40 W es una sustancia activa, siendo la sustancia activa un agente citostático,
 SM es una molécula espaciadora,
 PM es una molécula que fija proteínas,
 X es un grupo químico entre la sustancia activa y el espaciador, escogido entre:



en las que

R es = H, alquilo, fenilo o fenilo sustituido,

5 Z es = es un grupo químico de la sustancia activa.

El enlace entre la sustancia activa y el espaciador es dependiente del pH y dissociable en el cuerpo por medios hidrolíticos o enzimáticos. Al realizarse la disociación, se pone en libertad la sustancia activa o un derivado de la sustancia activa. Por un derivado de la sustancia activa se entienden unas sustancias, que comprenden la sustancia activa, pero que pueden contener adicionalmente algunas partes del espaciador o de los grupos, a través de los cuales estaba unida la sustancia activa con la molécula que fija proteínas. La actividad de la sustancia activa no debería ser perjudicada por su liberación como un derivado. Preferiblemente, la sustancia activa o su derivado desarrollan su actividad tan sólo después de la liberación.

10

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

15

20

25

Las sustancias para la utilización como medicamento inyectable para el tratamiento de un cáncer modifican y mejoran de manera decisiva el perfil farmacocinético de las sustancias activas debido a sus propiedades de fijación de proteínas. Cuando estas sustancias eficaces terapéuticamente llegan a líquidos corporales, ellas se fijan covalentemente a componentes de líquidos corporales o de tejidos, preferiblemente a proteínas séricas, de manera más preferida a una albúmina sérica, para presentarse de esta manera como profármacos macromoleculares, que transportan la sustancia activa al sitio de destino y/o la liberan en una forma dosificada.

30

La sustancia para la utilización de acuerdo con el invento se compone de una sustancia activa W, de una molécula espaciadora SM y de por lo menos una molécula que fija proteínas PM, con la siguiente estructura general:

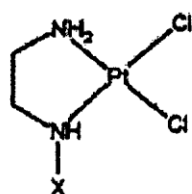


35

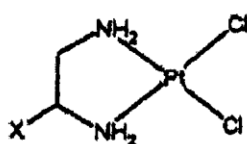
Adicionalmente la sustancia obtenida puede tener grupos de marcación o respectivamente elementos o moléculas marcados/as. Unos marcadores preferidos son uno o varios radionúclidos, uno o varios ligandos que comprenden radionúclidos, uno o varios radiadores de positrones, uno o varios agentes de contraste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

40 La sustancia activa es un agente citostático.

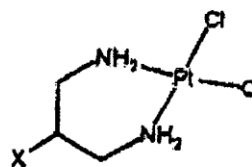
5 Unos agentes citostáticos preferidos para la sustancia para la utilización de acuerdo con el invento, son las antraciclina doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona y ametantrona así como derivados afines, los agentes alquilantes clorambucil, bendamustin, melfalán y oxazafosforinas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



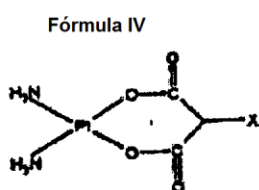
Fórmula I



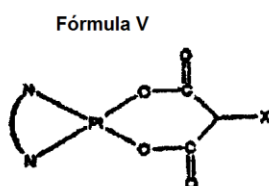
Fórmula II



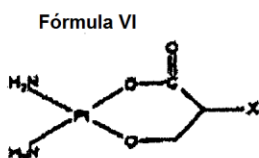
Fórmula III



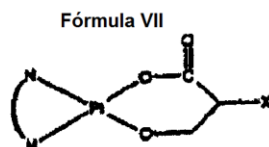
Fórmula IV



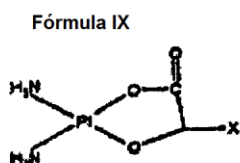
Fórmula V



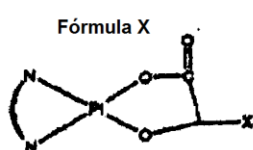
Fórmula VI



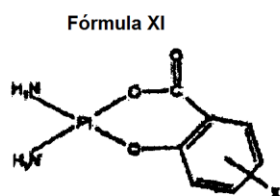
Fórmula VII



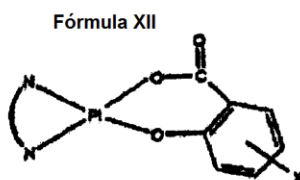
Fórmula IX



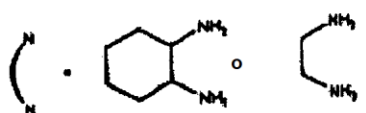
Fórmula X



Fórmula XI



Fórmula XII



10 La molécula espaciadora SM es una molécula orgánica que se compone de una cadena alifática de carbonos y/o de un anillo alifático de carbonos y/o de por lo menos un radical aromático. La/el cadena/anillo alifática/o de carbonos se compone de manera preferida de 1-12 átomos de carbono, que pueden estar reemplazados parcialmente por átomos de oxígeno, y puede estar eventualmente sustituida/o, en particular con uno o varios grupos solubles en agua, tales como grupos de ácido sulfónico, aminoalquilo o hidroxilo. El radical aromático es preferiblemente un anillo de benceno, que puede estar eventualmente sustituido, tal como ilustrativamente con los grupos solubles en agua antes citados.

15 La cadena alifática de carbonos puede contener átomos de oxígeno para la mejor solubilidad en agua, y para esto convenientemente se puede derivar de una cadena de un oligo-(óxido de etileno u óxido de propileno), p.ej. puede ser una cadena de di(etilenglicol), tri(etilenglicol) o di(propilenglicol).

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

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

Las sustancias para la utilización según el presente invento contienen entre SM y W un grupo químico X definido. Este grupo es disociable o respectivamente disociable hidrolíticamente, dependiendo del pH, preferiblemente de modo inestable frente a ácidos, o él contiene por lo menos un enlace, que es disociado enzimáticamente en el cuerpo..

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

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

Otras proteasas, que constituyen enzimas dianas para sustancias eficaces terapéuticamente y/o para diagnóstico del

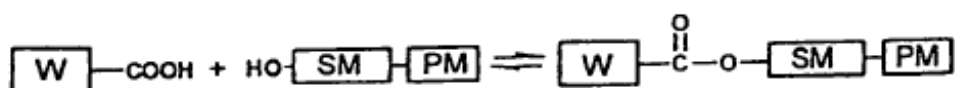
presente invento, son catepsinas, en particular las catepsinas B, H y L, que se han identificado como enzimas claves en los casos de enfermedades inflamatorias y malignas.

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

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

10 La sustancia para la utilización de acuerdo con el presente invento se puede preparar de acuerdo con una de las descripciones generales que se encuentran más abajo:

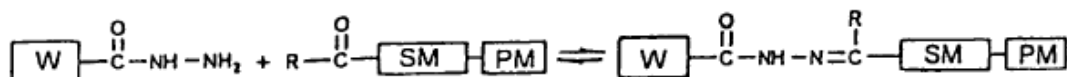
Unas sustancias activas, que poseen un grupo -HOOC, se derivatizan de la siguiente manera:



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

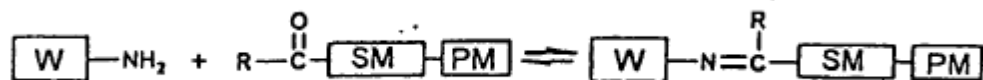
Además, es posible transformar el grupo -HOOC en un grupo hidrazido, p.ej. mediante una reacción con terc.-alquil-carbazatos y una subsiguiente disociación con ácidos (como se describe en el documento DE 196 36 889), y hacer reaccionar el fármaco, que tiene un grupo hidrazido, con un espaciador que contiene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

20



R = H, alquilo, fenilo, fenilo sustituido

Unas sustancias activas, que poseen un grupo H₂N, se derivatizan de la siguiente manera:

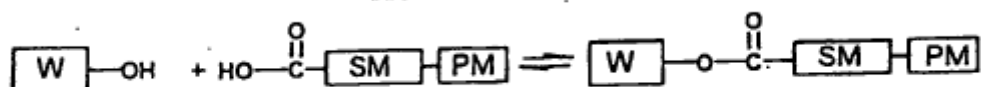


25

R = H, alquilo, fenilo, fenilo sustituido

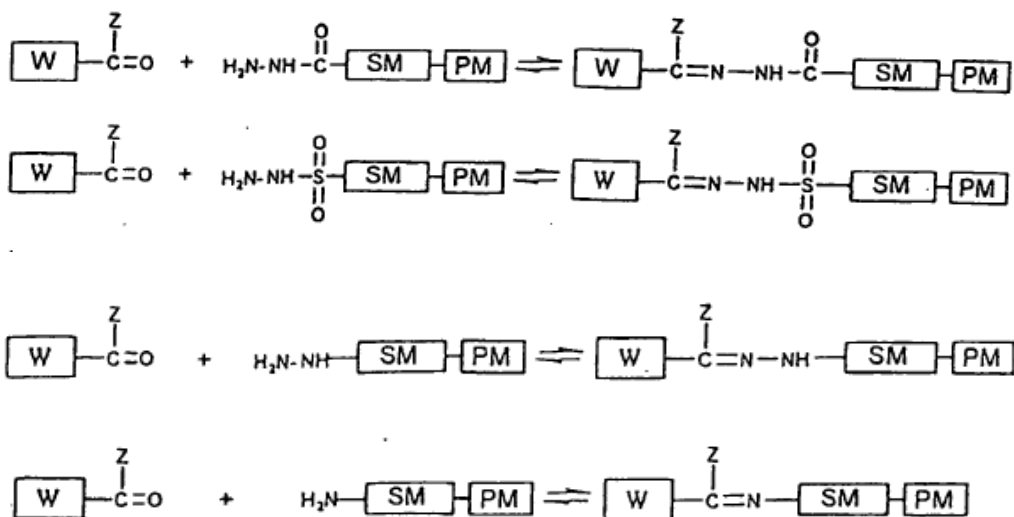
La reacción para dar los derivados de iminas se efectúa en este caso mediante procedimientos usuales, que son conocidos para un experto en la especialidad.

Unas sustancias activas, que poseen un grupo HO, se derivatizan de la siguiente manera:



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

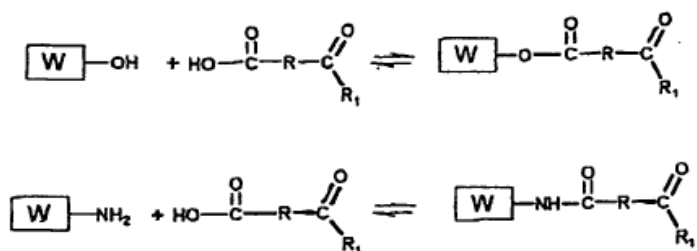
Unas sustancias activas, que poseen un componente carbonílico, se derivatizan de la siguiente manera:



Z = grupo químico de la sustancia activa

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

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



- 15 siendo R una cadena alifática de carbonos y/o un anillo alifático de carbonos y/o un radical aromático y R₁ = H, o un grupo alquilo, fenilo o fenilo sustituido. R se compone, por regla general, de 1 a 12 átomos de carbono, que pueden estar eventualmente sustituidos, p.ej. con grupos solubles en agua, tales como grupos de ácido sulfónico, aminoalquilo o hidroxilo. El radical aromático es, por lo general, un anillo de benceno, que puede estar eventualmente sustituido, tal como ilustrativamente con los grupos solubles en agua antes mencionados.

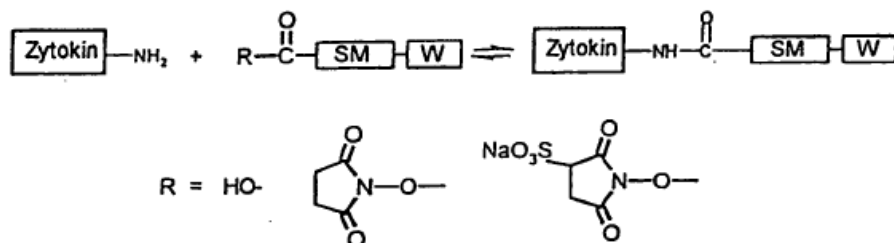
- 20 El componente carbonílico puede ser introducido, por lo demás, a través de otras reacciones químicas, así p.ej. mediante una sustitución electrófila junto al grupo HO o NH₂ de la sustancia activa con un componente carbonílico apropiado.

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

Los espaciadores, que se componen de la molécula que fija proteínas PM y de la molécula espaciadora SM, se pueden preparar p.ej. según unos procedimientos que se han descrito, entre otros, en el documento DE 196 36 889 A1, y en las

citadas de U. Beyer y colaboradores *Chemical Monthly*, 128, 91, **1997**, R. S. Greenfield y colaboradores, *Cancer Res.*, 50, 6.600, **1990**, T. Kaneko y colaboradores, *Bioconjugate Chem.*, 2, 133, **1991**, Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, **1996**, o en el documento de patente de los EE.UU. US 4.251.445.

- 5 Unas sustancias eficaces terapéuticamente para la utilización de acuerdo con el invento, que contienen una citocina, se pueden preparar haciendo reaccionar la citocina con una molécula espaciadora que contiene un grupo que fija proteínas, que tiene un ácido carboxílico o un ácido carboxílico activado:



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

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

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

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

Preferiblemente, el líquido de vehículo se debería escoger de tal manera que el proceso de disolución de la sustancia

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

Adicionalmente, una molécula de vehículo, tal como ilustrativamente una de las citadas al comienzo, también se puede poner en contacto con la sustancia eficaz, estando en situación la sustancia eficaz de fijarse a esta molécula de vehículo. Es posible por consiguiente la etapa de la reunión ex vivo de la molécula de vehículo y la sustancia eficaz terapéuticamente que fija proteínas y la subsiguiente aplicación por vía parenteral. Por esta vía se puede mejorar – caso de que se desee o sea necesario – la selectividad de la sustancia eficaz terapéuticamente para una molécula de vehículo, por ejemplo para una albúmina. Las moléculas de vehículo se escogen preferiblemente a partir de las citadas, en particular proteínas séricas.

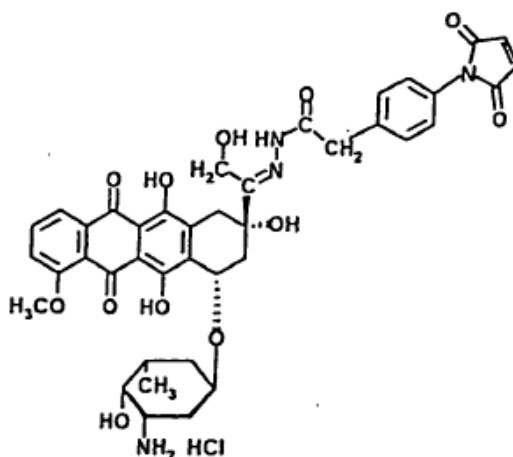
La sustancia eficaz terapéuticamente para la utilización de acuerdo con el invento es apropiada por consiguiente para el tratamiento de enfermedades cancerosas.

Los siguientes Ejemplos ilustran el invento más detalladamente.

Ejemplo 1

Preparación de DOXO-HYD

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



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

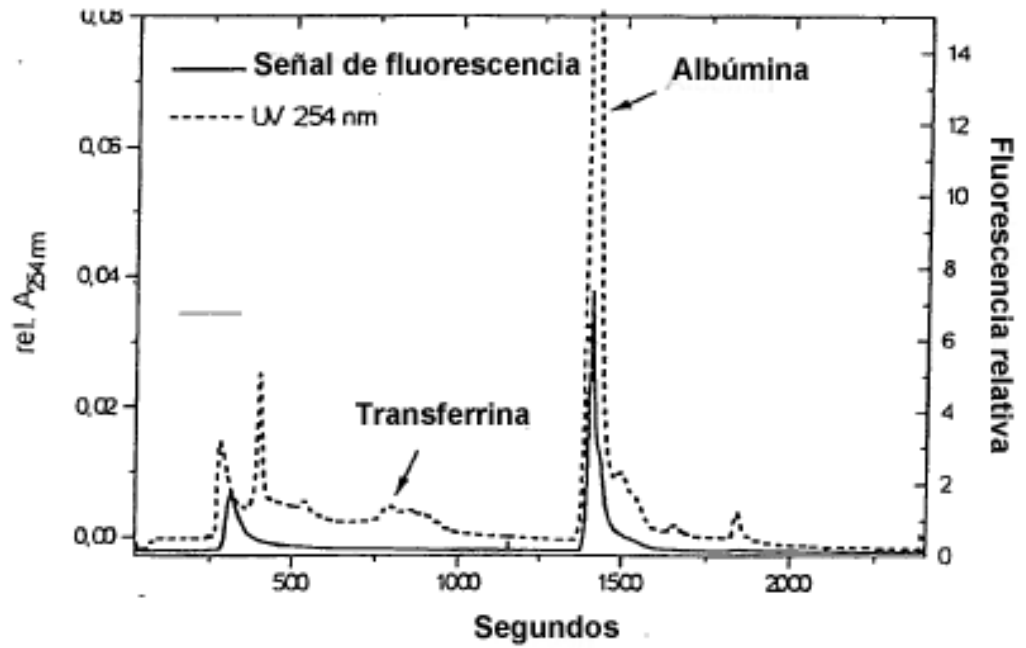
Ejemplo 2

Fijación de DOXO-HYD a un plasma humano

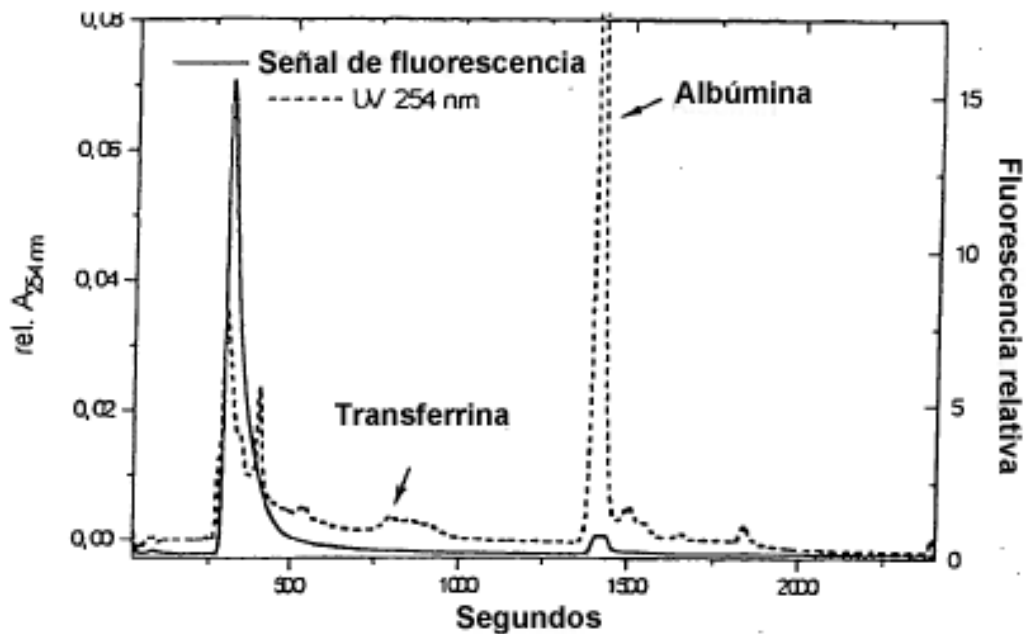
Después de que la DOXO-HYD llega al torrente sanguíneo, tiene lugar una fijación a proteínas séricas, preferiblemente a una albúmina sérica, de tal manera que la DOXO-HYD se presenta, entre otras, en forma de un conjugado de albúmina y doxorubicina que es inestable frente a ácidos.

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

A



B



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

5

Ejemplo 3

La actividad de la DOXO-HYD *in vivo*

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

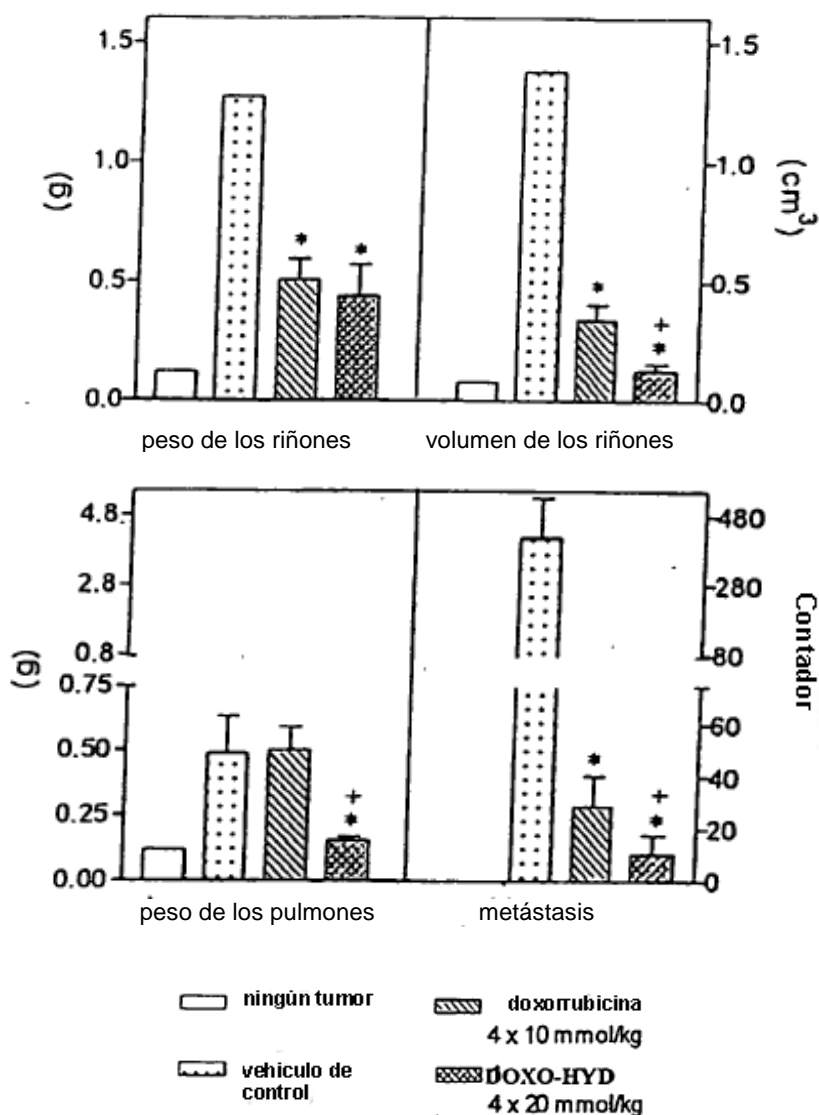
10

Animales: Ratones Balb/c, hembras; tumor: RENCA, renal cell carcinoma (carcinoma de células renales)
 Terapia: Días (d) 10, 13, 17 y 20 por vía intravenosa (i.v.), final del ensayo d24

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

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

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

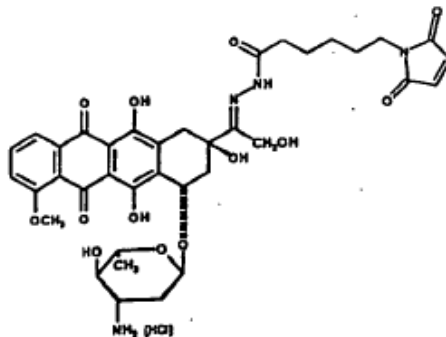


* significativo con respecto al conjunto de control (testigo)
 + significativo con respecto al conjunto que recibió doxorubicina.

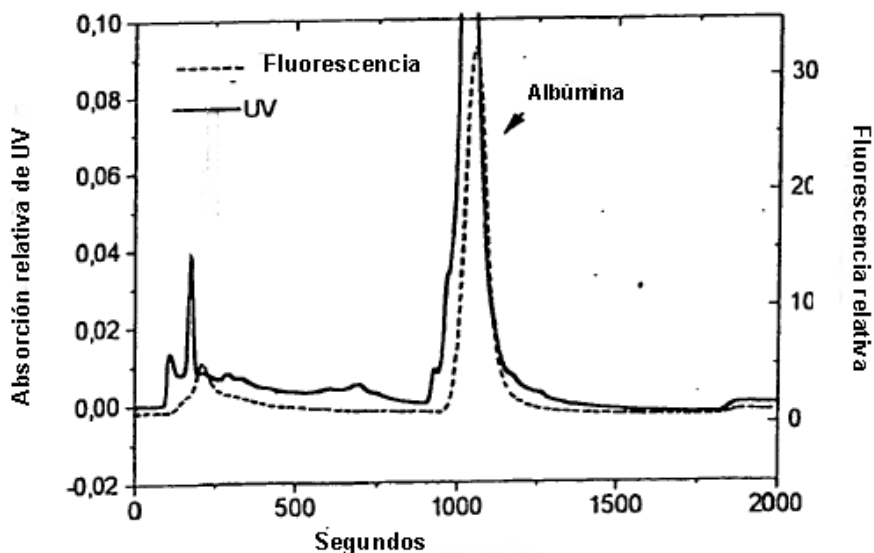
Ejemplo 4

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

5 1,6 mg del derivado de hidrazona de ácido 6-maleinimidocaproico de doxorubicina (denominado abreviadamente DOXO-EHMC) con la fórmula estructural representada más abajo



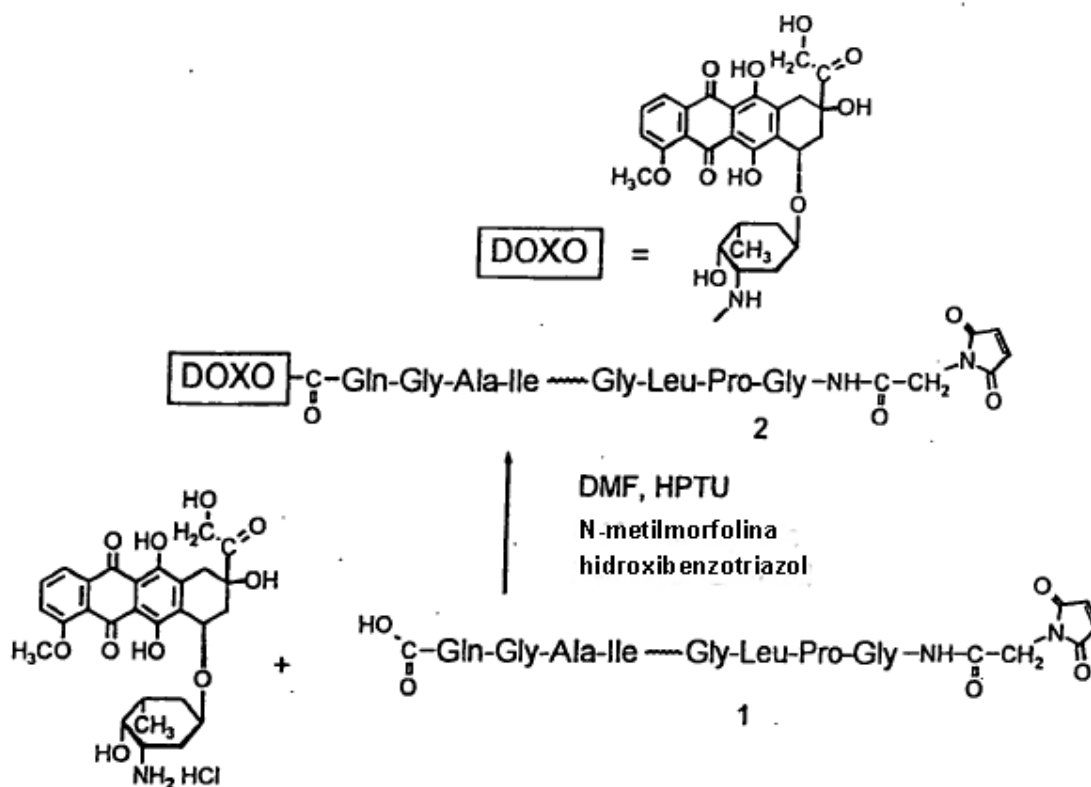
10 se disuelven en 1,0 ml de un tampón de fosfato (NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,004 M, de pH 6,5) a la temperatura ambiente (solución 2.000 μ M). Cuando se incuban 250 μ l de esta solución con 1,0 ml de un plasma humano durante 30 segundos a 37 °C, y a continuación se separa la muestra en un intercambiador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



Ejemplo 5

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

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

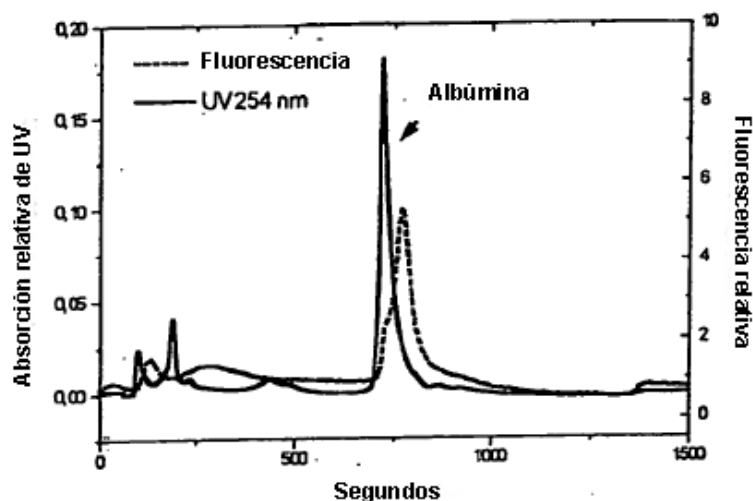


En este caso, el octapéptido derivatizado con maleinimido-glicina, Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (PM (peso molecular) 848, preparado por medio de una síntesis en fase sólida por la entidad Bachem AG, Suiza) se hace reaccionar con doxorubicina según la siguiente prescripción:

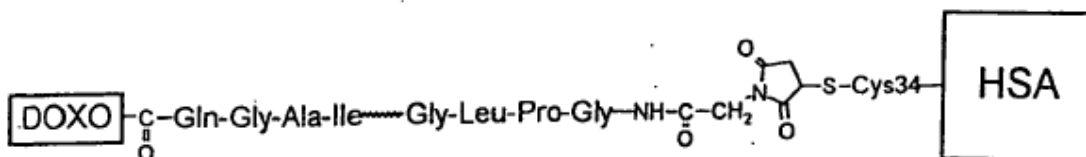
- 5 A una solución ligeramente turbia de 17,1 mg de doxorubicina en 3 ml de DMF (dimetil-formamida) se le añaden 25 mg de 1 (en forma de la sal trifluoroacetato) disueltos en 500 μ l de DMF, 33,5 mg de hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HPTU) disueltos en 200 μ l de DMF,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

Estudio de incubación con un plasma humano

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

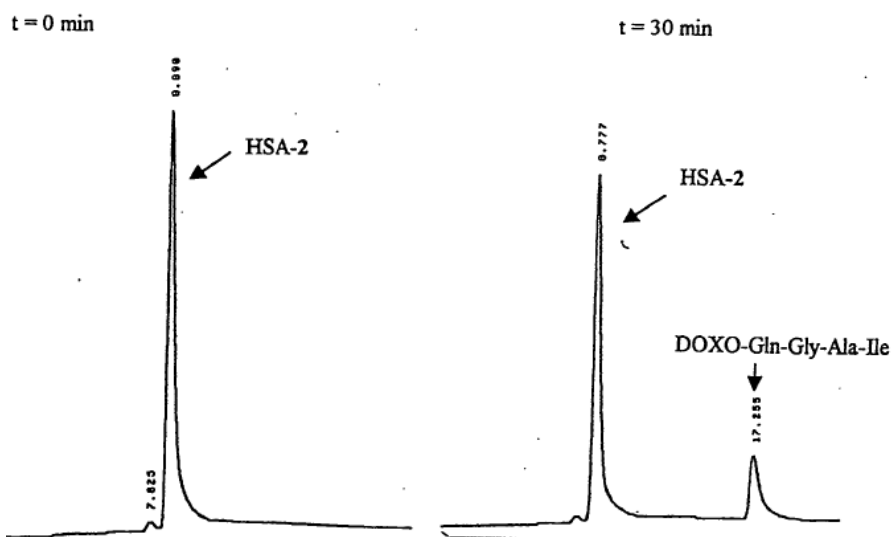


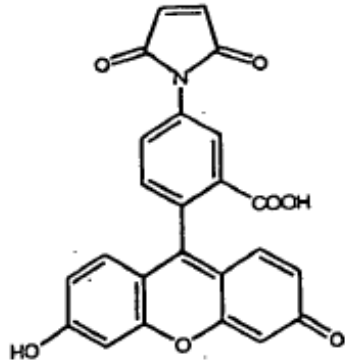
La secuencia peptídica Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly es reconocida por la metaloproteasa de la matriz MMP 9 y es disociada entre isoleucina y glicina. Esto se demostró por medio del siguiente ensayo: 200 μ l de una solución de 100 μ M del conjugado de 2 con una albúmina que tiene la siguiente estructura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



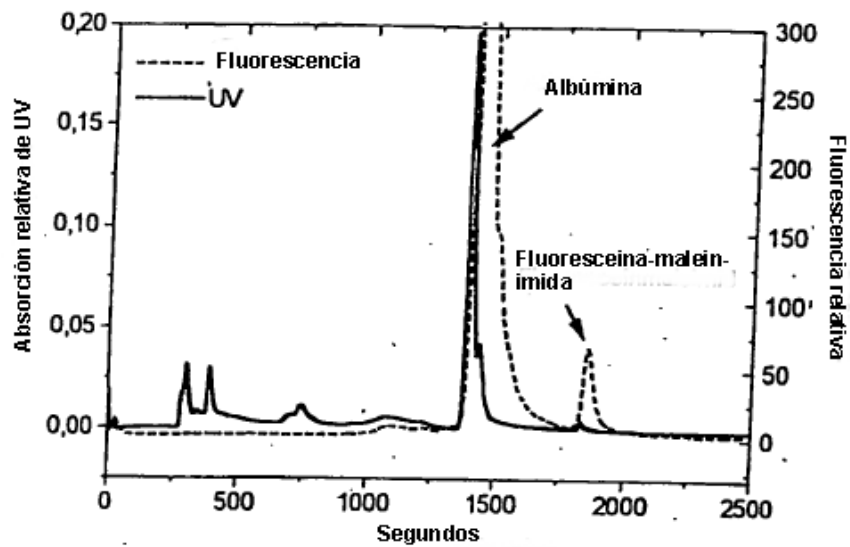
HSA = albúmina sérica humana

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



Ejemplo 6**Fijación de fluoresceína-maleimida a una albúmina en un plasma humano**

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



REIVINDICACIONES

1. Sustancia para la utilización como medicamento inyectable para el tratamiento de un cáncer, **estando caracterizada**

la sustancia **porque** tiene la fórmula:



5

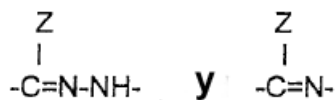
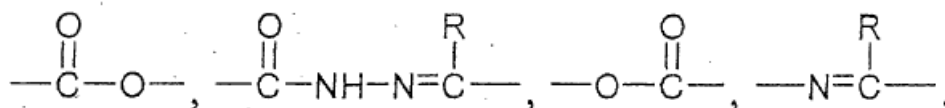
en la que

W es una sustancia activa, siendo la sustancia activa un agente citostático,

SM es una molécula espaciadora,

PM es una molécula que fija proteínas,

10 **X** es un grupo químico entre la sustancia activa y el espaciador, escogido entre:



en las que

R es H, alquilo, fenilo o fenilo sustituido, y

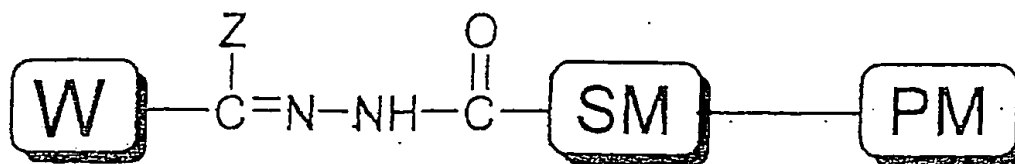
Z es = un grupo químico de la sustancia activa.

15

2. Sustancia para la utilización de acuerdo con la reivindicación 1,

estando caracterizada

la sustancia **porque** tiene la fórmula:



20

en la que **W**, **Z**, **SM** y **PM** están definidos como en la reivindicación 1.

3. Sustancia para la utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-2,

caracterizada porque

la sustancia activa es una antraciclina

25

4. Sustancia para la utilización de acuerdo con la reivindicación 3,

caracterizada porque

la antraciclina es doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona o ametantrona.

30

5. Sustancia para la utilización de acuerdo una de las reivindicaciones 1 hasta 4,

caracterizada porque

la antraciclina es doxorubicina.

6. Sustancia para la utilización de acuerdo una de las reivindicaciones 1 hasta 5,

caracterizada porque

el radical que fija proteínas es un grupo escogido entre un grupo maleinimido, un grupo de halógeno-acetamida, un grupo de halógeno-acetato, un grupo piridilditio, un grupo de éster de N-hidroxi-succinimida o un grupo de isotiocianato, un grupo de disulfuro, un grupo vinilcarbonilo, un grupo de aziridina o un grupo de acetileno, cuyo grupo puede estar eventualmente sustituido.

5

7. Sustancia para la utilización de acuerdo con la reivindicación 6,

caracterizada porque

el radical de la molécula que fija proteínas es un grupo maleinimido eventualmente sustituido.

10

8. Sustancia para la utilización de acuerdo una de las reivindicaciones 1 hasta 7,

caracterizada porque

el espaciador es un radical de molécula orgánica, que contiene una cadena alifática de carbonos y/o un anillo alifático de carbonos con 1-12 átomos de carbono, que pueden estar reemplazados parcialmente por átomos de oxígeno, y/o contiene por lo menos un radical aromático, que pueden estar eventualmente sustituidos.

15

9. Sustancia para la utilización de acuerdo con la reivindicación 8,

caracterizada porque

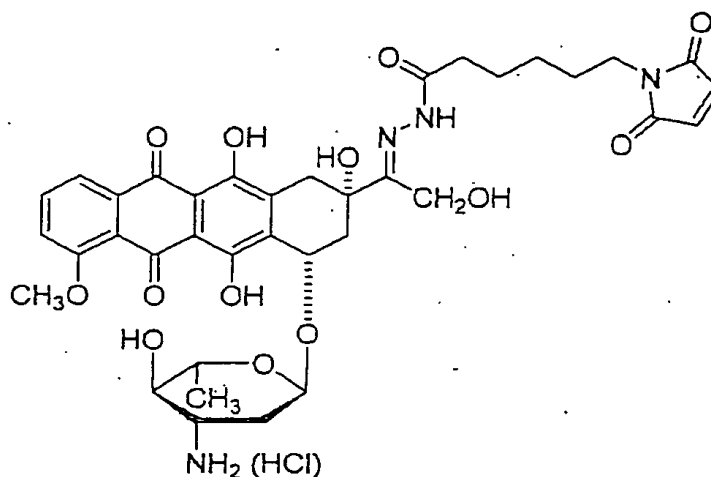
el espaciador es por lo menos una cadena alifática de carbonos eventualmente sustituida que abarca 1 hasta 12 átomos de carbono.

20

10. Sustancia para la utilización de acuerdo una de las reivindicaciones 1 hasta 9,

estando **caracterizada**

la sustancia **porque** es



25

11. Composición para la utilización como un medicamento inyectable para el tratamiento de un cáncer, que abarca una sustancia de acuerdo una de las reivindicaciones 1-10 y un líquido de vehículo, realizándose que la sustancia, después de su utilización, se fija covalentemente a un líquido corporal.