(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 778**

(51) Int. CI.:

A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 9/02 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2012 PCT/CN2012/001498**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13067767**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12848228 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2777713**

(54) Título: **Conjugado farmacéutico de polietilenglicol-oligopéptido de aminoácidos-irinotecán y composición farmacéutica del mismo**

(30) Prioridad:

07.11.2011 CN 201110348708

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2018

(73) Titular/es:

JENKEM TECHNOLOGY CO. LTD. (BEIJING) (50.0%)
4/F Building C 2 Shangdi Xinxi Road Haidian District
Beijing 100085, CN y
JENKEM TECHNOLOGY CO. LTD. (TIANJIN) (50.0%)

(72) Inventor/es:

XU, LIHUA;
HUANG, WENZHE y
ZHAO, XUAN

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Conjugado farmacéutico de polietilenglicol-oligopéptido de aminoácidos-irinotecán y composición farmacéutica del mismo.

Campo técnico

La presente invención se refiere a los conjugados de polietilenglicol, particularmente al conjugado de polietilenglicol con oligopéptidos y fármaco irinotecán, y a sus composiciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

El irinotecán (CPT-11) es un derivado de camptotecina con buenas actividades anticancerosas y un mecanismo de acción único. Es, con creces, uno de los fármacos anticancerosos mejor vendidos. Su venta a nivel mundial en el año 2003 fue más de mil millones de dólares, y tuvo una tasa de crecimiento de ventas anual del 20%, convirtiéndose de ese modo en uno de los fármacos anticancerosos mejor vendidos en el mundo. El irinotecán tiene un espectro antitumoral muy amplio. Los resultados de los estudios clínicos de etapa I y II mostraron que el fármaco tuvo un efecto positivo frente a tumores resistentes a la quimioterapia, tales como cáncer colorrectal metastásico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer ovárico y cáncer de cuello uterino. Además, tiene cierto efecto frente al cáncer gástrico, linfoma no maligno, linfoma no de Hodgkin, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de piel y cáncer pancreático. Actualmente, se usa principalmente como un fármaco eficaz para el tratamiento de cáncer colorrectal avanzado, incluso para aquellos casos resistentes a 5-FU. Pero irinotecán tiene efectos secundarios y tóxicos significativos, y una baja solubilidad en agua. Las reacciones adversas habituales incluyen pérdida de apetito, náuseas, vómitos, diarrea, leucopenia y neutropenia, anemia y trombocitopenia, alopecia y síndrome colinérgico. De los cuales, el más frecuente es la diarrea. Casi el 90% de los sujetos sufrieron diarrea, y casi el 30% de los cuales sufrió diarrea aguda. Por lo tanto, se requiere particularmente un tipo de irinotecán con bajas toxicidades, para mejorar el efecto antineoplásico clínico incrementando las dosis de irinotecán.

La tecnología de modificación con polietilenglicol (PEG) es una nueva tecnología de suministro de fármacos desarrollada recientemente de forma rápida, y se usa principalmente en sistemas de medicación de inyección. Es una tecnología que relaciona el polietilenglicol activado con la molécula o superficie del fármaco. Los derivados de PEG-fármaco obtenidos tras la modificación con PEG liberarán lentamente las pequeñas moléculas de fármaco para lograr la eficacia del tratamiento. Las pequeñas moléculas de fármaco se caracterizan principalmente por las siguientes ventajas tras la PEGilación: 1. mayor solubilidad en agua; 2. menor toxicidad; 3. semivida circulante prolongada de los fármacos, lo que reduce la frecuencia de la administración del fármaco, mejora el cumplimiento del paciente, mejora la calidad de vida, y reduce el coste del tratamiento; 4. degradación enzimática reducida, que incrementa la biodisponibilidad. Tras el enlazamiento con PEG, la farmacocinética del fármaco cambia; además, se cambia la farmacodinámica. En particular, el PEG puede mantener el fármaco en sangre a la concentración diana, o cerca de ella, durante más tiempo, manteniendo de ese modo la eficacia total del fármaco.

Actualmente, la tecnología de PEGilación se ha usado ampliamente en la modificación de las proteínas de grado terapéutico. Hasta finales de 2010, 4 de 6 de los tipos principales de productos farmacéuticos modificados con PEG, a saber, PEG-intron®, PEGasys®, Neulasta® y Macugen®, tuvieron ventas de más de cien millones de dólares. Además, las ventas de Neulasta® y Macugen® fueron de más de mil millones de dólares. MICERA (PEG-EPO producido por Roche) apareció en el mercado en Europa en la segunda mitad del año 2007. Actualmente, docenas de fármacos de proteínas PEGiladas están en estudios preclínicos, y los fármacos de proteínas PEGiladas en los ensayos clínicos incluyeron superóxido dismutasa producida por la compañía Enzon (que estará pronto en el mercado), interleucina-2, producida por Chiron Corporation (etapa II), etc. Las aplicaciones de la tecnología de PEGilación en el campo médico en los Estados Unidos de América solo ha creado ventas por casi 6 mil millones de dólares de nuevos fármacos, y ha conducido al desarrollo floreciente en el dominio de nuevas formulaciones. Con la investigación exitosa continua y el desarrollo de un gran número de nuevos derivados de PEG, la tecnología de PEGilación no se usa solamente en la modificación de proteínas, péptidos y otros fármacos macromoleculares, sino también se usa gradualmente en la solubilización y atenuación de pequeñas moléculas, así como en la mejora de la eficacia. Actualmente, los fármacos de pequeñas moléculas PEGilados no han sido todavía aprobados para su comercialización en el mercado internacional, pero varios productos han entrado en ensayos clínicos de fase II y III.

La aplicación de la tecnología de PEGilación en fármacos de pequeñas moléculas está siendo desarrollada rápidamente. Se da a conocer que el PEG se puede usar para conectarlo con muchos fármacos de pequeñas moléculas. Las patentes US nº 5.824.701, nº 5.840.900, y la patente china CN1283643, dieron a conocer los profármacos producidos enlazando tales derivados con el paclitaxel. En tal modelo de fármaco, ambos extremos del polietilenglicol estaban enlazados solamente a una molécula de taxol. Para mejorar la capacidad de carga de moléculas farmacéuticas, la patente US6153655 declaró una estructura de polietilenglicol ramificado terminalmente. Se generaron dos grupos funcionales enlazando la estructura a ambos extremos del

polietilenglicol a través de grupos amino. Sin embargo, la introducción de pequeña molécula ramificada no biológica también condujo a la incertidumbre de los fármacos. Las patentes US nº 5.977.163, nº 6.262.107 y el documento CN1164533 describen un fármaco de paclitaxel soportado en PGA. En este modelo de fármaco, los paclitaxel se conectaron al azar al grupo carboxilo activo de ácido glutámico a lo largo de la cadena principal del poliglutamato. La distribución relativamente amplia de la velocidad de polimerización, y la incertidumbre de la toxicidad del poliácido glutámico, limitaron las aplicaciones de la invención. La patente U.S. US7744861 describió una clase de estructuras con PEG multirramificado que se une a irinotecán. Sin embargo, en estas estructuras, cada grupo terminal del polietilenglicol solo estaba conectado a una molécula de irinotecán, limitando de ese modo la capacidad de carga de fármaco.

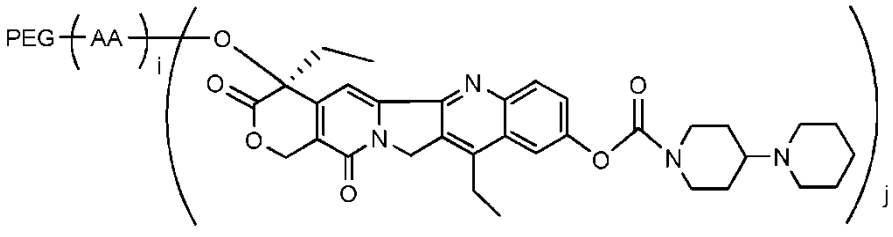
Beijing Jenkem technology Co., Ltd. comenzó las investigaciones sobre PEGilación de fármacos de pequeña molécula allá por el año 2002, y se han registrado un gran número de patentes (ZL03801109.3, ZL 200410029615.3, ZL 2004 8 0005763.X, ZL 200810093688.7, ZL 02107842.4 y ZL 02108778.4). De ellas, el "conjugado de polímero hidrófilo-oligopéptido policarboxílico con molécula farmacéutica, conteniendo la composición el conjugado, y el uso" (documento ZL 02106691.4) proporciona un derivado de PEG enlazado a oligopéptido multicarboxílico y adecuado para el enlace con múltiples fármacos de pequeña molécula.

La invención se basa en el trabajo previo, particularmente la patente de invención previa (ZL 200410048016.6) de nuestro laboratorio. El documento ZL200410048016.6 describe un polietilenglicol que se ramifica-oligopéptido, y el conjugado farmacéutico que comprende el mismo para reducir la dosis de fármaco y evitar algunos efectos tóxicos y secundarios mediante la mejora del factor de carga de la molécula farmacéutica; en el que el PEG puede tener un peso molecular de 300 a 60.000 Daltons, y el peso molecular del polímero de PEG son todos 10.000 Daltons entre la forma de realización 1-15 descrita en la descripción, y el documento ZL200410048016.6 describe además que la estructura ramificante conduce a portar más moléculas farmacéuticas, lo que indica explícitamente que, en comparación con PEG de cadena lineal-pentapéptidos, el PEG que se ramifica-pentapéptidos se puede usar para portar más moléculas de fármaco, y disuade a un experto en la materia de usar un conjugado farmacéutico con una porción de PEG de cadena lineal. Los inventores de la presente invención adoptan el PEG que tiene una estructura de cadena lineal y un peso molecular de 20.000-40.000 Daltons, y el oligopéptido que consiste en 2 restos de ácido glutámico y 3 restos de glicina, o 3 restos de ácido glutámico y 4 restos de glicina, para proporcionar un nuevo conjugado de PEG-oligopéptido de aminoácidos-irinotecán.

En el contexto de la presente solicitud se resuelven los problemas tales como la baja solubilidad en agua y los efectos secundarios tóxicos de irinotecán al usar la técnica de PEGilación. El nuevo conjugado de PEG-oligopéptido de aminoácidos-irinotecán proporcionado tiene buena solubilidad en agua, y puede lograr los fines de una liberación lenta a través de la regulación de la enzima en el cuerpo humano. Tiene una duración de eficacia prolongada. Su actividad antitumoral es equivalente, e incluso superior, a la del irinotecán. Puesto que el efecto antitumoral de irinotecán depende de la dosis, el irinotecán PEGilado de baja toxicidad puede mejorar además el efecto antitumoral clínico del irinotecán al incrementar la dosis.

Sumario de la invención

Por un lado, la presente invención proporciona un conjugado de PEG-oligopéptido-irinotecán, con la fórmula general (I):



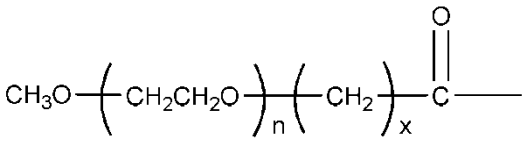
(I)

en la que:

PEG representa polietilenglicol;
$(AA)_i$ representa un oligopéptido;
j es un número entero de 2-12 que representa el número de irinotecán enlazados con oligopéptido.

El PEG presenta un peso molecular promedio de 20.000 a 40.000 daltons. El PEG presenta una estructura de cadena lineal.

En las formas de realización de la presente invención, PEG es un metoxi-PEG lineal con la siguiente estructura:



en la que:

n es un número entero de 400-500;
x es un número entero de 0-6, el x preferido es 1.

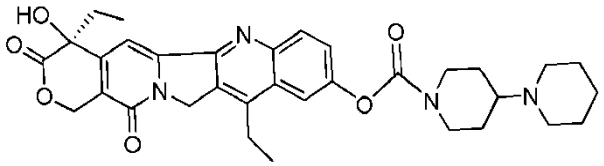
El oligopéptido de aminoácidos consiste en dos ácidos glutámicos y tres glicinas. En protocolos de implementación adicionales de la presente invención, los aminoácidos descritos son la combinación de ácido glutámico y glicina, que consiste en tres ácidos glutámicos y cuatro glicinas.

Por otro lado, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados descritos más arriba y el excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas son formas de dosificación de comprimido, supositorio, pastilla, cápsula de gelatina blanda y dura, polvo, disoluciones, suspensión, y aerosol. Las composiciones farmacéuticas descritas tienen actividad anticancerosa, incluyendo específicamente actividad inhibidora contra el cáncer de colon, cáncer ovárico y cáncer de pulmón.

La presente invención proporciona una modificación a través del polímero hidrófilo para proteger el irinotecán, ofreciendo de ese modo un fármaco de irinotecán modificado con una absorción del fármaco mejorada, una duración de acción prolongada, una eficacia potenciada, una dosis reducida, así como pocos efectos tóxicos y secundarios.

Modo de poner en práctica la invención

El irinotecán es un compuesto de camptotecina con una estructura representada en la fórmula (III).



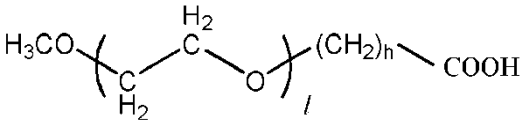
(III)

Estructura del irinotecán

La estructura de irinotecán contiene un grupo hidroxilo, que se une con el polímero que ha sufrido modificación de grupo terminal a través del grupo éster, grupo carbonato, grupo amida, y otros modos para lograr la protección eficaz y la utilización racional de las moléculas de irinotecán. En particular, los grupos éster pueden liberar principios activos del fármaco en el organismo a través de la biodegradación. Las formulaciones farmacéuticas mediante este método son muy solubles en agua, trabajan de forma rápida, son duraderas, y son eficaces en el tratamiento del cáncer.

Los conjugados implicados en la presente invención se preparan como sigue: el PEG polimérico hidrófilo se modifica introduciendo el grupo funcional reactivo carboxilo, que está enlazado a un oligopéptido; mientras tanto, el grupo hidroxilo en el irinotecán reacciona con el grupo carboxilo de glicina para formar ésteres, y después los grupos carboxilo en el oligopéptido se combinan con el grupo amino de glicina en el irinotecán. Este modo de reacción no solo asegura la actividad in vivo de irinotecán, sino también maximiza el rendimiento y la pureza del producto de reacción.

La estructura del PEG de cadena lineal-ácido carboxílico se muestra en la fórmula IV:



(IV)

Fórmula estructural de PEG de cadena lineal-ácido carboxílico

El PEG se representa habitualmente como peso molecular, n es alrededor de 450, que corresponde a un peso molecular de 20.000 para PEG.

Los oligopéptidos en la presente invención no presentan unas estructuras de cadena lineal; los enlaces amídicos en los oligopéptidos se forman en las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Los oligopéptidos son el ácido glutámico y la glicina.

Los conjugados de la invención se pueden administrar en forma de compuesto puro, o como composición farmacéutica apropiada, mediante cualesquiera vías aceptables de administración o reactivos usados en la utilización similar. Por lo tanto, las vías adoptables de administración incluyen las rutas oral, intranasal, parenteral, tópica, transdérmica, o rectal. Las formas incluyen sólida, semisólida, polvo liofilizado, o preparación líquida, tales como comprimidos, supositorios, pastillas, cápsulas de gelatina blandas y duras, polvos, disoluciones, suspensión, y aerosoles, y se prefiere la forma unitaria de dosificación adecuada para la administración simple con una dosis precisa. Las composiciones pueden contener vehículos o excipiente farmacéuticos convencionales y los conjugados de la presente invención que funcionan como principios activos (uno o más tipos), así como otros agentes, vehículos, adyuvantes, etc.

Típicamente, dependiendo del modo deseado de administración, la composición farmacéuticamente aceptable contiene el conjugado de esta invención de aproximadamente 1% a 99% en peso, y los excipientes farmacéuticos adecuados de 99% a 1% en peso. Preferentemente, la composición contiene el conjugado de la presente invención de aproximadamente 5% a 75% en peso, y el resto es excipiente farmacéutico adecuado.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de líquido. Específicamente, el conjugado de la presente invención (de aproximadamente 0,5% a 20%) y el adyuvante farmacéutico seleccionado se pueden disolver y dispersar en los vehículos tales como agua, disolución salina, hidrato de dextrosa, glicerol, y etanol, en la práctica para formar una disolución o suspensión.

Si se indica, en la composición farmacéutica de la presente invención pueden estar contenidas pequeñas cantidades de auxiliares tales como agente humectante o agente emulsionante, agente amortiguador del pH y antioxidante, a saber, ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado, etc.

Las formas de realización siguientes son ilustrativas y no limitativas de la invención.

Formas de realización

El PEG-dipéptido de ácido glutámico usado en las formas de realización es proporcionado por Beijing JenKem technology Co., Ltd; los irinotecán se adquirieron de Shanghai Longxiang Biomedical Development Co. Ltd; los ácidos L(+)-glutámicos se adquirieron de Beijing Chemical Reagent Company; el ácido p-toluenosulfónico, el alcohol bencílico y la diciclohexilcarbodiimida (DCC) se adquirieron de Chemical reagent Co., Ltd. de Sinopharm Group Corporation; la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) se adquirieron de Shanghai Covalent Chemical Technology Co., Ltd.; la N-(terc-butiloxicarbonil)glicina se adquirió de Sichuan Tongsheng Amino Acid Co. Ltd.; la N-(terc-butiloxicarbonil)glicina se adquirió de Chengdu Jingtian Biology Co., Ltd.

Forma de 1: Preparación de conjugado de PEG de cadena lineal (20 k)-pentapéptido-irinotecán (CPT-1)

Se disolvieron ácido L(+)-glutámico 29,4 g, ácido p-toluenosulfónico 40 g y 80 ml de alcohol bencílico en 500 ml de tolueno, las disoluciones se pusieron a reflujo bajo nitrógeno, y se separaron 11 ml de agua, el reflujo se continuó durante 3 h, y se evaporaron 150 ml de agua. Las disoluciones se enfriaron hasta 50ºC, las disoluciones de la reacción se vertieron en un vaso de precipitados que contiene 600 ml de éter de petróleo y se agitaron durante 1 h, y el precipitado se recogió por filtración. La torta del filtro se disolvió en 280 ml de etanol al 95% calentando, y se dejó enfriar toda la noche. El precipitado se recogió mediante filtración y se secó a vacío, después se prepararon 61 g de p-toluenosulfonato de éster dibencílico de ácido L(+)-glutámico.

Se disolvieron 30 g de p-toluenosulfonato de éster dibencílico de ácido L(+)-glutámico en 500 ml de diclorometano, al que se añadieron bajo nitrógeno 20,86 g de éster 5-bencílico del ácido t-butiloxicarbonil-L-glutámico, se añadieron 7,55 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 8,35 g de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) después de que los reactivos anteriores se disolvieran totalmente, posteriormente se añadieron 40 ml de diclorometano con 14,3 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC) tras la disolución completa de los reactivos previamente añadidos. Después de que se terminó la titulación, el sistema de reacción se cerró y se dejó reaccionar toda la noche. La terminación de la reacción se monitorizó mediante TLC. Después de que los disolventes se eliminaron por filtración, se añadieron 20 ml de acetato de etilo a la disolución concentrada, los sólidos se filtraron entonces, y se añadieron 400 ml de éter de petróleo al licor madre para la precipitación. Finalmente, se obtuvieron por filtración 15,8 g de producto de reacción Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl.

Se disolvieron 0,776 g de Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl en 7 ml de diclorometano, y se añadieron 3 ml de ácido trifluoroacético antes de que la disolución se dejara reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente

se eliminó y se añadieron 100 ml de diclorometano, y entonces se usó disolución de bicarbonato sódico al 5% (NaHCO3) para ajustar el valor del pH a 7-8. Se llevaron a cabo la extracción y el desespumado; la fase orgánica se lavó dos veces con disolución de bicarbonato sódico al 5% ($NaHCO_3$), y se secó con sulfato de sodio anhidro. El producto seco se filtró, y el filtrado se añadió directamente al matraz de reacción. Se añadieron 20,0 g de PEG-ácido acético (peso molecular 20000), 245 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 135 mg de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), bajo protección de nitrógeno. Después de que se disolvieran todos los reactivos, se añadieron 412 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC). La disolución se agitó para reacción a temperatura ambiente toda la noche. Las sustancias sólidas se filtraron, el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria, se añadieron 500 ml de alcohol isopropílico (IPA) al residuo, y el producto se obtuvo por filtración y se secó a vacío. El producto seco se disolvió en 200 ml de metanol anhidro, y entonces se añadió 1,0 g de paladio-carbono, el hidrógeno (H2) se ventiló en la disolución para reaccionar a temperatura ambiente toda la noche. El paladio-carbono se eliminó por filtración, y el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria, se añadieron 500 ml de alcohol isopropílico (IPA) al residuo, el producto se obtuvo por filtración y se secó a vacío. Finalmente, se obtuvieron 13,4 g de PEG-dipéptido de Glu (peso molecular 20000).

Se disolvieron 13,3 g de hidrocloruro de irinotecán y 20,1 g de N-(terc-butiloxicarbonil)-glicina (BOC-gly-OH) en 120 ml diclorometano anhidro, y entonces se añadieron a la disolución 18,8 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 7,4 g 4-de dimetilaminopiridina (DMAP), y el sistema de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El producto de reacción sólido se separó por filtración, y la disolución se concentró a presión reducida, y se añadieron 100 ml de éter de petróleo a la disolución. El precipitado se recogió por filtración y se secó a vacío; de este modo se prepararon 23 g de éster de N-terc-butoxicarbonil glicinato de irinotecán. Se disolvieron 23 g de N-terc-butoxicarbonil glicinato de irinotecán obtenido en la etapa previa en 100 ml de diclorometano, que entonces se añadió con 30 ml de ácido trifluoroacético, la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se concentró a presión reducida antes de añadir 500 ml de éter dietílico. El producto de reacción se filtró, y el precipitado se recogió y se secó al vacío, y de este modo se prepararon 20 g de glicinato de irinotecán.

Se disolvieron en 50 ml de diclorometano anhidro, bajo protección con nitrógeno, 5,0 g de PEG-dipéptido de ácido glutámico (peso molecular 20000), 1,02 g glicinato de irinotecán, 115 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 153 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), y la disolución se añadió entonces con 309 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC). El sistema de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Las sustancias sólidas se separaron por filtración, y el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria, y entonces se añadieron al residuo 100 ml de alcohol isopropílico (IPA), el producto se obtuvo mediante filtración y se secó a vacío, y de este modo se obtuvieron 4,4 g de PEG-pentapéptido de Glu-Gly-irinotecán (CPT-1). El punto de fusión fue 56 a 64ºC. RMN 1H (DMSO-d6): 0,84-0,89 (m, 8H), 1,24 (m, 9H), 1,40-1,50 (m, 21H), 1,79 (m, 8H), 2,12 (m, 10H), 2,89 (m, 4H), 3,50 (m, 1800H), 4,05 (m, 9H), 4,26 (m, 5H), 5,26 (m, 5H), 5,48 (m, 5H), 7,07 (m, 2H), 7,55-7,60 (m, 3H), 7,89 (m, 3H), 8,11 (m, 4H), 8,20 (m, 3H).

Forma de realización 2: Preparación de conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético (20k)-heptapéptido-irinotecán

Se disolvieron ácido L(+)-glutámico 29,4 g, ácido p-toluenosulfónico 40 g y 80 ml de alcohol bencílico en 500 ml de tolueno. Las disoluciones se pusieron a reflujo bajo nitrógeno, y se separaron 11 ml de agua, el reflujo se continuó durante 3 h, y se evaporaron 150 ml de agua. Las disoluciones se enfriaron hasta 50ºC, las disoluciones de la reacción se vertieron en un vaso de precipitados que contiene 600 ml de éter de petróleo y se agitaron durante 1 h, y el precipitado se recogió por filtración. La torta del filtro se disolvió en 280 ml de etanol al 95% mediante calentamiento, y se dejó enfriar toda la noche. El precipitado se recogió por filtración y se secó a vacío, y entonces se prepararon 61 g de p-toluenosulfonato de éster dibencílico del ácido L(+)-glutámico.

Se disolvieron 30 g de p-toluenosulfonato de éster dibencílico del ácido L(+)-glutámico en 500 ml de diclorometano, al que se añadieron 20,86 g de éster 5-bencílico del ácido t-butiloxicarbonil-L-glutámico bajo nitrógeno, se añadieron 7,55 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 8,35 g de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) después de que los reactivos anteriores se disolvieron completamente, y entonces se añadieron 40 ml de diclorometano con 14,3 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC) tras la disolución completa de los reactivos previamente añadidos. Después de que se terminó la valoración, el sistema de reacción se cerró y se dejó reaccionar toda la noche. La terminación de la reacción fue monitorizada mediante TLC. Después de que los disolventes se eliminaron por filtración, se añadieron 20 ml de acetato de etilo a la disolución concentrada, los sólidos se filtraron entonces, y se añadieron 400 ml de éter de petróleo al licor madre para la precipitación. Finalmente, se obtuvieron mediante filtración 15,8 g de producto de reacción Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl.

Se disolvieron 6,47 g de Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl en 15 ml de diclorometano, y se añadieron 6 ml de ácido trifluoroacético antes de que se dejara reaccionar la reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminó el disolvente y se añadieron 100 ml de diclorometano, y entonces se usó disolución al 5% de bicarbonato sódico (NaHCO3) para ajustar el valor del pH a 7-8. Se llevó a cabo la extracción y desespumado, y la fase orgánica se lavó dos veces con disolución al 5% de bicarbonato sódico ($NaHCO_3$), y se secó con sulfato sódico anhidro. El producto seco se filtró, y el filtrado se añadió directamente al matraz de reacción, y se añadieron 3,37 g de éster 5-bencílico del ácido Boc-L-glutámico bajo protección con nitrógeno. Después de que se disolvieron todos los

reactivos, se añadieron 1.22 g 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 1,35 g de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), después de que se disolvieran los reactivos totalmente, se añadieron a la disolución 20 ml de diclorometano que contiene 2,39 g de diciclohexilcarbodiimida (DCC). Después de que se terminó la valoración, el sistema de reacción se cerró y se dejó reaccionar toda la noche. La terminación de la reacción se monitorizó mediante TLC. El producto de reacción filtrado se extrajo usando 30 ml de ácido cítrico al 10% tres veces, hidrogenocarbonato de sodio al 5% y cloruro sódico acuoso saturado al 5%, tres veces por turno, y entonces se secó usando sulfato de sodio anhidro. Después de que el producto se filtró para eliminar el disolvente, se añadieron 25 ml de acetato de etilo a la disolución concentrada. Las sustancias sólidas se filtraron, y se añadieron 400 ml de éter de petróleo al licor madre para la precipitación. Se obtuvieron 6,8 g de producto de Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl tras la filtración.

Se disolvieron 1,039 g de Boc-Glu (obzl)-Glu (obzl)-Glu (obzl)-obzl en 7 ml de diclorometano, y se añadieron 3 ml de ácido trifluoroacético antes de que se dejara reaccionar la disolución a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se eliminó, y se añadieron 200 ml de diclorometano, y entonces se usó disolución de bicarbonato sódico al 5% (NaHCO3) para ajustar el valor del pH a 7-8. Se llevó a cabo la extracción y desespumado; la fase orgánica se lavó dos veces con disolución de bicarbonato sódico al 5% ($NaHCO_3$), y se secó con sulfato sódico anhidro. El producto seco se filtró, y el filtrado se añadió directamente al matraz de reacción, se añadieron 20,0 g de PEG-ácido acético (peso molecular 20000), 245 mg 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 135 mg de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), bajo protección con nitrógeno. Después de que se disolvieran todos los reactivos, se añadieron 412 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC). La disolución se agitó para reacción a temperatura ambiente toda la noche. Las sustancias sólidas se filtraron, el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria, se añadieron 500 ml de alcohol isopropílico (IPA) al residuo, y el producto se obtuvo mediante filtración y se secó a vacío. El producto seco se disolvió en 200 ml de metanol anhidro, y entonces se añadió 1,0 g de paladio sobre carbono, el hidrógeno (H2) se ventiló en la disolución para la reacción a temperatura ambiente toda la noche. El paladio sobre carbono se eliminó mediante filtración, y el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria, se añadieron 500 ml de alcohol isopropílico (IPA) al residuo, el producto se obtuvo mediante filtración, y se secó a vacío. Finalmente, se obtuvieron 15,4 g de PEG-tripéptido de Glu (peso molecular 20000).

Se disolvieron 5,0 g de PEG-tripéptido de Gly (preparado en la presente forma de realización, el peso molecular fue 20000), 1,36 g de glicinato de irinotecán (preparado en la forma de realización 1), 115 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 153 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), en 50 ml de diclorometano anhidro, y entonces se añadieron 309 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC) bajo protección con nitrógeno. El sistema de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El producto sólido se separó por filtración, y el disolvente redundante se eliminó mediante evaporación giratoria. El residuo se mezcló con 100 ml de alcohol isopropílico (IPA), y entonces la disolución se filtró, y el producto se secó a vacío. De este modo, se obtuvieron 4,5 g de PEG de cadena lineal-heptapéptido de Glu-Gly-irinotecán. El punto de fusión fue 57-64ºC, RMN 1H (DMSO-d6): 0,84-0,89 (m, 8H), 1,24 (m, 9H), 1,71-1,74 (m, 23H), 2,12 (m, 16H), 2,95-2,99 (m, 19H), 3,50 (m, 1800H), 4,22 (m, 18H), 5,45 (m, 5H), 5,49 (m, 5H), 7,07 (m, 2H), 7,55-7,60 (m, 3H), 7,89 (m, 3H), 8,11 (m, 4H), 8,20 (m, 3H).

Forma de realización 3: Efecto inhibidor de diversas preparaciones de irinotecán sobre tumores trasplantados de células de cáncer de colon humanas HCT-116 en ratones atímicos

Sustancias de ensayo

CPT-1 fue un conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético-pentapéptidos-irinotecán.

Fármaco utilizado como control positivo

Inyección de hidrocloruro de irinotecán 40 mg/2 ml (CPT-11) producida por la compañía Aventis Pharma (Dagenham), número de lote 8UL002-B. El fármaco se diluyó con disolución salina hasta la concentración deseada justo antes de la utilización.

Dosis y administración

La dosis de CPT-1 se ajustó a 45 mg/kg (contenido de irinotecán), que se administró intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas; el CPT-11 se administró intravenosamente una vez a la semana a 45 mg/kg, y se administró intravenosamente tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas a 15 mg/kg.

Animales

Los ratones atímicos BALB/cA (machos, 4-6 semanas, peso 19 ± 2 g) fueron proporcionados por el Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. El número de certificado de producción fue SCXK (Shanghai) 2008-0017. Números de animales de cada grupo: 12 ratones en el grupo de control negativo, y 6

ratones en el grupo de tratamiento.

Estirpes celulares

La estirpe celular de tumor de colon humana HCT-116 se adquirió de ATCC. Se inocularon subcutáneamente 5 x 10^6 células en la axila derecha de cada ratón atímico. Los tumores trasplantados se transfirieron a ratones atímicos durante dos generaciones antes de la utilización.

Métodos experimentales

Tejidos tumorales vigorosos se cortaron en trozos de aproximadamente 1,5 mm3, y entonces se inocularon subcutáneamente a ratones atímicos en la axila derecha en condiciones estériles. Los diámetros de los tumores trasplantados subcutáneos se midieron usando un calibrador vernier. Los animales se agruparon al azar cuando los tumores crecieron hasta 100-200 mm3.

A los animales en el grupo de tratamiento y en el grupo de control se les administró intravenosamente 45 mg/kg de CPT-1 y la disolución salina equivalente, respectivamente, una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. CPT-11 (15 mg/kg) se administró intravenosamente como fármaco de control positivo, tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Tras la administración, los animales se observaron consecutivamente durante una semana. Durante todo el experimento, los diámetros de los tumores trasplantados se midieron, y los animales se pesaron dos veces a la semana. El volumen tumoral (TV) se calculó como sigue: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Según los resultados de las medidas, los volúmenes tumorales relativos (RTV) se calcularon como sigue: RTV = Vt/V0, en la que V0 fueron los volúmenes medidos en la administración tras el enjaulado (es decir, d0), Vt fueron los volúmenes tumorales de cada una de las medidas. El índice usado en la evaluación de la actividad antitumoral fue la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), calculada como sigue: T/C (%) = (TRTV/CRTV) x 100%, TRTV fue RTV del grupo de tratamiento, CRTV fue RTV del grupo de control negativo.

Resultados y discusión

Los resultados se mostraron en la Tabla 1. CPT1 (45 mg/kg), administrado intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, inhibió significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células de la estirpe de cáncer de colon humana HCT-116 en ratones atímicos, el T/C % fue 27,60%, y los efectos inhibidores fueron superiores a aquellos de CPT-11 administrado con la misma dosis y régimen. El tratamiento experimental que usa CPT-11, administrado con el mismo régimen, también inhibió el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células HCT-116, pero el T/C % fue solamente 63,56%. El control positivo CPT-11, administrado intravenosamente a 15 mg/kg tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas, también pudo inhibir significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células HCT-116, con un valor T/C de 39,84%. Durante todo el experimento, los ratones atímicos en cada grupo de tratamiento sufrieron pérdida de peso. Solamente los ratones atímicos en el grupo CPT-11 a 45 mg/kg sufrieron una pérdida de peso ligeramente mayor, en comparación con aquellos en el grupo de control de disolvente.

Tabla 1 Efectos del tratamiento experimental de irinotecán PEGilado sobre tumores trasplantados de células de cáncer de colon humanas HCT-116 en ratones atímicos

Grupo	Dosis y administración		Número de animales		Peso (g)		TV (mm^3, media±SD)		RTV (media±SD)	T/C (%)
			Al comienzo	Al comienzo	Al comienzo	Al final	d_0	d_{28}		
Control de disolvente	0,4ml/ratón qw×3w	iv	12	12	19,7	17,3	132±32	804±82	6,45±1,83	
CPT-11	15mg/kg, q3w×3w	iv	6	6	19,1	16,6	129±26	322±37	2,57±0,66**	39,84
CPT-11	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	19,2	15,1	126±25	512±99	4,10±0,73*	63,56
CPT-1	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	18,8	16,8	132±30	234±54	1,78±0,23**,##	27,60

Nota: prueba de la t, frente al grupo de control de disolvente, * p <0,01, ** p <0,001; frente al grupo de 45 mg/kg de CPT-11, # p <0,001

ES 2 659 778 T3

Forma de realización 4: Efecto inhibidor de diversas preparaciones de irinotecán sobre tumores trasplantados de células de cáncer de colon humanas HT-29 en ratones atímicos

Sustancias de ensayo

CPT-1 fue un conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético-pentapéptidos-irinotecán.

Fármaco usado como control positivo

Inyección de hidrocloruro de irinotecán 40 mg/2 ml (CPT-11) producida por la compañía Aventis Pharma (Dagenham), número de lote 8UL002-B. El fármaco se diluyó con disolución salina hasta la concentración deseada justo antes de la utilización.

Dosis y administración

La dosis de CPT-1 se ajustó a 45 mg/kg (contenido de irinotecán), que se administró intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas; el CPT-11 se administró intravenosamente una vez a la semana a 45 mg/kg, y se administró intravenosamente tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas a 15 mg/kg.

Animales

Los ratones atímicos BALB/cA (machos, 5-6 semanas, peso 18 ± 2 g) fueron proporcionados por el Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. El número de certificado de producción fue SCXK (Shanghai) 2008-0017. Números de animales de cada grupo: 12 ratones en el grupo de control negativo, y 6 ratones en el grupo de tratamiento.

Estirpes celulares

Las cepas de células de tumor de colon humanas HT-29 se adquirieron de ATCC. Se inocularon subcutáneamente 5 x 10^6 células en la axila derecha de cada ratón atímico. Los tumores trasplantados se transfirieron a ratones atímicos durante dos generaciones antes de la utilización.

Métodos experimentales

Tejidos tumorales vigorosos se cortaron en trozos de aproximadamente 1,5 mm3, y entonces se inocularon subcutáneamente a ratones atímicos en la axila derecha en condiciones estériles. Los diámetros de los tumores trasplantados subcutáneos se midieron usando un calibrador vernier. Los animales se agruparon al azar cuando los tumores crecieron hasta 100-200 mm3.

A los animales en el grupo de tratamiento y en el grupo de control se les administró intravenosamente 45 mg/kg de CPT-1 y la disolución salina equivalente, respectivamente, una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. CPT-11 (15 mg/kg) se administró intravenosamente como fármaco de control positivo, tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Tras la administración, los animales se observaron consecutivamente durante una semana. Durante todo el experimento, los diámetros de los tumores trasplantados se midieron, y los animales se pesaron dos veces a la semana. El volumen tumoral (TV) se calculó como sigue: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Según los resultados de las medidas, los volúmenes tumorales relativos (RTV) se calcularon como sigue: RTV = Vt/V0, en la que V0 fueron los volúmenes medidos en la administración tras el enjaulado (es decir, d0), Vt fueron los volúmenes tumorales de cada una de las medidas. El índice usado en la evaluación de la actividad antitumoral fue la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), calculada como sigue: T/C (%) = (TRTV/CRTV) x 100%, TRTV fue RTV del grupo de tratamiento, CRTV fue RTV del grupo de control negativo.

Resultados y discusión

Los resultados se mostraron en la Tabla 2. CPT1 (45 mg/kg), administrado intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, inhibió significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células de la estirpe de cáncer de colon humana HT-29 en ratones atímicos. La velocidad de crecimiento del tumor en los ratones del grupo experimental se redujo una semana tras la administración. El T/C % fue 41,08% cuando se terminó el experimentó. El control positivo CPT-11, administrado intravenosamente a 15 mg/kg tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas, pudo también inhibir significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células HT-29 con un valor de T/C de 27,27%. Durante todo el experimento, los ratones atímicos en cada grupo de tratamiento tuvieron buenas condiciones de crecimiento; solamente los ratones atímicos en dos grupos tratados con diferentes dosis de CPT-11 sufrieron pérdida de peso.

Tabla 2. Efectos del tratamiento experimental de irinotecán PEGilado sobre tumores trasplantados de células de cáncer de colon humanas HT-29 en ratones atímicos

Grupo	Dosis y administración		Número de animales	Peso (g)		TV (mm^3, media±SD)		RTV (media±SD)	T/C (%)
			Al comienzo	Al comienzo	Al comienzo	Al final	d_0	d_{28}		
Control de disolvente	0,4ml/ratón qw×3w	iv	12	12	19,0	19,2	119±29	1588±578	13,90± 5,38	
CPT-11	15mg/kg, q3w×3w	iv	6	6	18,2	16,0	121±14	460±152	3,79± 1,21*,	27,27
CPT-11	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	18,6	16,2	116±13	995±368	8,69± 3,43***	62,52
CPT-1	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	18,7	18,4	115±25	642±105	5,71± 1,21**	41,08

Nota: prueba de la t, frente al grupo de control de disolvente, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,01; frente al grupo de 45 mg/kg de CPT-11, # p <0,05

ES 2 659 778 T3

Forma de realización 5: Efecto inhibidor de diversas preparaciones de irinotecán sobre tumores trasplantados de células de cáncer de pulmón humanas A549 en ratones atímicos

Sustancias de ensayo

CPT-1 fue un conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético-pentapéptidos-irinotecán.

Fármaco utilizado como control positivo

Inyección de hidrocloruro de irinotecán 40 mg/2 ml (CPT-11) producida por la compañía Aventis Pharma (Dagenham), número de lote 8UL002-B. El fármaco se diluyó con disolución salina hasta la concentración deseada justo antes de la utilización.

Dosis y administración

La dosis de CPT-1 se ajustó a 45 mg/kg (contenido de irinotecán), que se administró intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas; el CPT-11 se administró intravenosamente una vez a la semana a 45 mg/kg, y se administró intravenosamente tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas a 15 mg/kg.

Animales

Los ratones atímicos BALB/cA (machos, 5-6 semanas, peso 18 ± 2 g) fueron proporcionados por el Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. El número de certificado de producción fue SCXK (Shanghai) 2008-0017. Números de animales de cada grupo: 12 ratones en el grupo de control negativo, y 6 ratones en el grupo de tratamiento.

Estirpes celulares

Las cepas de células de tumor de pulmón humanas A549 se adquirieron de ATCC. Se inocularon subcutáneamente 5 x 10^6 células en la axila derecha de cada ratón atímico. Los tumores trasplantados se transfirieron a ratones atímicos durante dos generaciones antes de la utilización.

Métodos experimentales

Unos tejidos tumorales vigorosos se cortaron en trozos de aproximadamente 1,5 mm3, y entonces se inocularon subcutáneamente a ratones atímicos en la axila derecha en condiciones estériles. Los diámetros de los tumores trasplantados subcutáneos se midieron usando un calibrador vernier. Los animales se agruparon al azar cuando los tumores crecieron hasta 100-200 mm3.

A los animales en el grupo de tratamiento y en el grupo de control se les administró intravenosamente 45 mg/kg de CPT-1 y la disolución salina equivalente, respectivamente, una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. CPT-11 (15 mg/kg) se administró intravenosamente como fármaco de control positivo, tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Tras la administración, los animales se observaron consecutivamente durante una semana. Durante todo el experimento, los diámetros de los tumores trasplantados se midieron, y los animales se pesaron dos veces a la semana. El volumen tumoral (TV) se calculó como sigue: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Según los resultados de las medidas, los volúmenes tumorales relativos (RTV) se calcularon como sigue: RTV = Vt/V0, en la que V0 fueron los volúmenes medidos en la administración tras el enjaulado (es decir, d0), Vt fueron los volúmenes tumorales de cada una de las medidas. El índice usado en la evaluación de la actividad antitumoral fue la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), calculada como sigue: T/C (%) = (TRTV/CRTV) x 100%, TRTV fue RTV del grupo de tratamiento, CRTV fue RTV del grupo de control negativo.

Resultados y discusión

Los resultados se mostraron en la Tabla 3. CPT1 (45 mg/kg), administrado intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, inhibió significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células de la estirpe de cáncer de pulmón humana A549 en ratones atímicos, la T/C % fue 20,62%, y los efectos inhibidores fueron superiores a aquellos de CPT-11 administrado con la misma dosis y régimen. La velocidad de crecimiento de los tumores trasplantados subcutáneos en ratones portadores de tumores se redujo una semana tras el tratamiento experimental que usa CPT-1. El control positivo CPT-11, administrado intravenosamente a 15 mg/kg tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas, también pudo inhibir significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células A-549 con un valor de T/C de 53,26%. Durante todo el experimento, los ratones atímicos en cada grupo de tratamiento tuvieron buenas condiciones de crecimiento y una ganancia de peso ligeramente inferior, en comparación con los ratones en el grupo de control de disolvente.

Tabla 3. Efectos del tratamiento experimental de irinotecán PEGilado sobre tumores trasplantados de células de cáncer de pulmón humanas A549 en ratones atímicos

Grupo	Dosis y administración		Número de animales		Peso (g)		TV (mm^3, media±SD)		RTV (media±SD)	T/C (%)
			Al comienzo	Al comienzo	Al comienzo	Al final	d_0	d_{28}		
Control de disolvente	0,4ml/ratón qw×3w	iv	12	12	18,4	23,1	108+21	1546±496	14,40± 4,38	
CPT-11	15mg/kg, q3w×3w	iv	6	6	18,1	21,2	112+21	831±305	7,67± 2,88**,	53,26
CPT-11	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	18,4	21,7	110±15	1055+432	9,87± 4,87	68,54
CPT-1	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	19,1	22,0	105+21	320+154	2,97±1,04*,#	20,62

Nota: prueba de la t, frente al grupo de control de disolvente, * p <0,001; frente al grupo de 45 mg/kg de CPT-11, # p <0,01

ES 2 659 778 T3

Forma de realización 6: Efecto inhibidor de diversas preparaciones de irinotecán sobre tumores trasplantados de células de cáncer de ovario humanas SKOV-3 en ratones atímicos

Sustancias de ensayo

CPT-1 fue un conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético-pentapéptidos-irinotecán.

Fármaco utilizado como control positivo

Inyección de hidrocloruro de irinotecán 40 mg/2 ml (CPT-11) producida por la compañía Aventis Pharma (Dagenham), número de lote 8UL002-B. El fármaco se diluyó con disolución salina hasta la concentración deseada justo antes de la utilización.

Dosis y administración

La dosis de CPT-1 se ajustó a 45 mg/kg (contenido de irinotecán), que se administró intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas; el CPT-11 se administró intravenosamente una vez a la semana a 45 mg/kg, y se administró intravenosamente tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas a 15 mg/kg.

Animales

Los ratones atímicos BALB/cA (machos, 5-6 semanas, peso 18 ± 2 g) fueron proporcionados por el Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. El número de certificado de producción fue SCXK (Shanghai) 2008-0017. Números de animales de cada grupo: 12 ratones en el grupo de control negativo, y 6 ratones en el grupo de tratamiento.

Estirpes celulares

Las cepas de células de tumor de pulmón humanas SKOV-3 se adquirieron de ATCC. Se inocularon subcutáneamente 5 x 10^6 células en la axila derecha de cada ratón atímico. Los tumores trasplantados se transfirieron a ratones atímicos durante dos generaciones antes de la utilización.

Métodos experimentales

Unos tejidos tumorales vigorosos se cortaron en trozos de aproximadamente 1,5 mm3, y entonces se inocularon subcutáneamente a ratones atímicos en la axila derecha en condiciones estériles. Los diámetros de los tumores trasplantados subcutáneos se midieron usando un calibrador vernier. Los animales se agruparon al azar cuando los tumores crecieron hasta 100-200 mm3.

A los animales en el grupo de tratamiento y en el grupo de control se les administró intravenosamente 45 mg/kg de CPT-1 y la disolución salina equivalente, respectivamente, una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. CPT-11 (15 mg/kg) se administró intravenosamente como fármaco de control positivo, tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Tras la administración, los animales se observaron consecutivamente durante una semana. Durante todo el experimento, los diámetros de los tumores trasplantados se midieron, y los animales se pesaron dos veces a la semana. El volumen tumoral (TV) se calculó como sigue: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Según los resultados de las medidas, los volúmenes tumorales relativos (RTV) se calcularon como sigue: RTV = Vt/V0, en la que V0 fueron los volúmenes medidos en la administración tras el enjaulado (es decir, d0), Vt fueron los volúmenes tumorales de cada una de las medidas. El índice usado en la evaluación de la actividad antitumoral fue la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), calculada como sigue: T/C (%) = (TRTV/CRTV) x 100%, TRTV fue RTV del grupo de tratamiento, CRTV fue RTV del grupo de control negativo.

Resultados y discusión

Los resultados se mostraron en la Tabla 4. CPT1 (45 mg/kg), administrado intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, inhibió significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células de la estirpe de cáncer de ovario humana SKOV-3 en ratones atímicos, la T/C % fue 0,53%, y los efectos inhibidores fueron superiores a aquellos de CPT-11 que se administró con la misma dosis y tuvo una T/C % de 96,46%. Una semana después de la administración, el volumen del tumor portado en cada ratón disminuyó. El control positivo CPT-11, administrado intravenosamente a 15 mg/kg tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas, también pudo inhibir significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células SKOV-3 con un valor de T/C de 55,69%. Durante todo el experimento, los ratones atímicos en el grupo de control de disolvente y en dos grupos de tratamiento de CPT-11 sufrieron una ligera pérdida de peso; solamente los ratones en el grupo de CPT-1 tuvieron buenas condiciones de crecimiento.

Tabla 4. Efectos del tratamiento experimental de irinotecán PEGilado sobre tumores trasplantados de células de cáncer de ovario humanas SKOV-3 en ratones atímicos

Grupo	Dosis y administración		Número de animales	Peso (g)		TV (mm^3, media±SD)		RTV (media±SD)	T/C (%)
			Al comienzo	Al comienzo	Al final	d_0	d_{28}		
Control de disolvente	0,4ml/ratón qw×3w	iv	12	12	19,8	18,7	136±28	1770± 588(0)	13,27± 4,75	
CPT-11	15mg/kg, q3w×3w	iv	6	6	18,9	18,0	137±33	924± 443(0)	7,39± 5,22**	55,69
CPT-11	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	19,7	18,4	136±44	1753± 878(0)	12,80± 3,91	96,46
CPT-1	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	20,7	22,7	135±35	1,27± 1,98(4)	0,07:1:0,01*,#	0,53

Nota: prueba de la t, frente al grupo de control de disolvente, * p <0,001; frente al grupo de 45 mg/kg de CPT-11, # p<0,001, el número entre paréntesis indicó el número de animales con regresión tumoral

ES 2 659 778 T3

Forma de realización 9: Efecto inhibidor de diversas preparaciones de irinotecán sobre tumores trasplantados de células de cáncer de colon humanas SW-620 en ratones atímicos

Sustancias de ensayo

CPT-1 fue un conjugado de PEG de cadena lineal-ácido acético-pentapéptidos-irinotecán.

Fármaco utilizado como control positivo

Inyección de hidrocloruro de irinotecán 40 mg/2 ml (CPT-11) producida por la compañía Aventis Pharma (Dagenham), número de lote 8UL002-B. El fármaco se diluyó con disolución salina hasta la concentración deseada justo antes de la utilización.

Dosis y administración

La dosis de CPT-1 se ajustó a 45 mg/kg (contenido de irinotecán), que se administró intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas; el CPT-11 se administró intravenosamente una vez a la semana a 45 mg/kg, y se administró intravenosamente tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas a 15 mg/kg.

Animales

Los ratones atímicos BALB/cA (machos, 5-6 semanas, peso 18 ± 2 g) fueron proporcionados por el Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences. El número de certificado de producción fue SCXK (Shanghai) 2008-0017. Números de animales de cada grupo: 12 ratones en el grupo de control negativo, y 6 ratones en el grupo de tratamiento.

Estirpes celulares

Las cepas de células de tumor de pulmón humanas SW-620 se adquirieron de ATCC. Se inocularon subcutáneamente 5 x 10^6 células en la axila derecha de cada ratón atímico. Los tumores trasplantados se transfirieron a ratones atímicos durante dos generaciones antes de la utilización.

Métodos experimentales

Unos tejidos tumorales vigorosos se cortaron en trozos de aproximadamente 1,5 mm3, y entonces se inocularon subcutáneamente a ratones atímicos en la axila derecha en condiciones estériles. Los diámetros de los tumores trasplantados subcutáneos se midieron usando un calibrador vernier. Los animales se agruparon al azar cuando los tumores crecieron hasta 100-200 mm3. A los animales en el grupo de tratamiento y en el grupo de control se les administró intravenosamente 45 mg/kg de CPT-1 y la disolución salina equivalente, respectivamente, una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. CPT-11 (15 mg/kg) se administró intravenosamente como fármaco de control positivo, tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Tras la administración, los animales se observaron consecutivamente durante una semana. Durante todo el experimento, los diámetros de los tumores trasplantados se midieron, y los animales se pesaron dos veces a la semana. El volumen tumoral (TV) se calculó como sigue: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Según los resultados de las medidas, los volúmenes tumorales relativos (RTV) se calcularon como sigue: RTV = Vt/V0, en la que V0 fueron los volúmenes medidos en la administración tras el enjaulado (es decir, d0), Vt fueron los volúmenes tumorales de cada una de las medidas. El índice usado en la evaluación de la actividad antitumoral fue la tasa de proliferación tumoral relativa T/C (%), calculada como sigue: T/C (%) = (TRTV/CRTV) x 100%, TRTV fue RTV del grupo de tratamiento, CRTV fue RTV del grupo de control negativo.

Resultados y discusión

Los resultados se mostraron en la Tabla 5. CPT1 (45 mg/kg), administrado intravenosamente una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, inhibió significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células de la estirpe de células de tumor de colon humanas SW-620 en ratones atímicos, y los efectos inhibidores fueron superiores a los de CPT-11 administrado con la misma dosis y régimen. Después de tres semanas de tratamiento experimental de seis ratones portadores de tumores en cada grupo, los tumores de dos ratones portadores de tumores en el grupo de tratamiento de CPT-1 lograron la regresión completa sin rebote una semana después de la descontinuación del fármaco. El control positivo CPT-11, administrado intravenosamente a 15 mg/kg tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas, también pudo inhibir significativamente el crecimiento de tumores trasplantados subcutáneos de células SW-620 con un valor de T/C de 0,13%. Durante todo el experimento, los ratones atímicos en cada grupo de tratamiento tuvieron buenas condiciones de crecimiento y una mayor ganancia de peso, en comparación con los ratones en el grupo de control de disolvente.

Tabla 5. Efectos del tratamiento experimental de irinotecán PEGilado sobre tumores trasplantados de células de tumor de colon humanas SW-620 en ratones atímicos

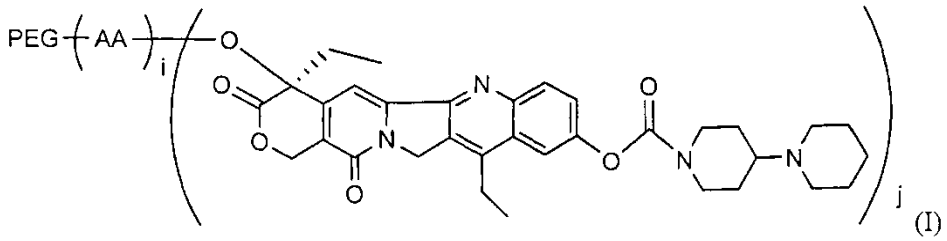
Grupo	Dosis y administración		Número de animales		Peso (g)		TV (mm^3, media±SD)		RTV (media±SD)	T/C (%)
			Al comienzo	Al final	Al comienzo	Al final	d_0	d_{28}		
Control de disolvente	0,4ml/ratón qw×3w	iv	12	12	19,4	19,9	132±29	1920±590(0)	15,40±6,40	
CPT-11	15mg/kg, q3w×3w	iv	6	6	19,7	24,2	133±33	2,09±1,51(0)	0,02±0,02**,	0,13
CPT-11	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	18,8	21,8	132±25	877±324(0)	6,60±1,56*	42,86
CPT-1	45mg/kg, qw×3w	iv	6	6	19,2	24,6	130±43	0,37± 0,29(2)	0,003±0,002* *,#	0,02

Nota: prueba de la t, frente al grupo de control de disolvente, * p <0,01, ** p <0,00; frente al grupo de 45 mg/kg de CPT-11, # p <0,001, el número entre paréntesis indicó el número de animales con regresión tumoral

ES 2 659 778 T3

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de PEG-oligopéptido-irinotecán según la fórmula (I):



(I)

en el que:

PEG representa polietilenglicol que presenta una estructura de cadena lineal y un peso molecular medio de 20.000-40.000 Daltons;

$(AA)_i$ representa un oligopéptido, en el que AA representa los mismos o diferentes aminoácidos del oligopéptido;

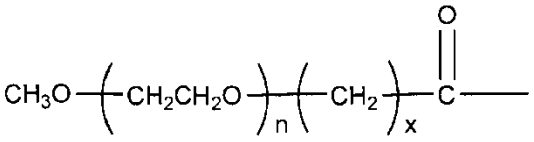
i y j pueden ser iguales o diferentes;

i es un número entero de 2 a 12 que representa el número de aminoácidos del oligopéptido; y

j es un número entero de 2 a 12 que representa el número de compuestos de irinotecán conectados con el oligopéptido;

en el que los aminoácidos son ácido glutámico y glicina y el oligopéptido consiste en 2 restos de ácido glutámico y 3 de glicina, o el oligopéptido consiste en 3 restos de ácido glutámico y 4 de glicina.

2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el PEG es un metoxi-PEG de cadena lineal con una estructura de:



en el que:

n es un número entero de 400 a 500; y
x es un número entero de 0 a 6, preferentemente x es 1.

3. Composición farmacéutica que comprende el conjugado según la reivindicación 1 o 2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que la composición farmacéutica se encuentra en una forma de dosificación de comprimidos, supositorios, gránulos, cápsulas de gelatina blanda y dura, polvos, disoluciones, suspensiones o aerosoles.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la composición farmacéutica presenta unas actividades anticancerosas que incluyen una propiedad inhibidora contra el cáncer de colon, cáncer ovárico o cáncer de pulmón.