

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 534**

51 Int. Cl.:

A61K 31/665 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

C07F 9/655 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 20186803 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3750545**

54 Título: **Análogos de éter de fosfolípidos como vehículos de fármacos contra el cáncer**

30 Prioridad:

17.11.2014 US 201462080436 P

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

13.09.2024

73 Titular/es:

**CELLECTAR BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
100 Campus Drive, Suite 207
Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**WEICHERT, JAMEY, P.;
PINCHUK, ANATOLY;
KOZAK, KEVIN;
LONGINO, MARC;
GRUDZINSKI, JOSEPH;
TITZ, BENJAMIN;
PAK, CHOROM y
STEHLE, NATHAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 978 534 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

Análogos de éter de fosfolípidos como vehículos de fármacos contra el cáncer

Antecedentes de la invención

5 En 2012, 14.1 millones de personas se diagnosticaron con cáncer en todo el mundo y 8.2 millones murieron de cáncer. En los Estados Unidos, alrededor del 40% de todas las personas se diagnosticarán con cáncer durante su vida. A pesar de recibir el mejor tratamiento disponible, el 44% de esos estadounidenses morirán de cáncer.

10 El cáncer es el resultado de una célula que se divide sin limitación. Las células sanas tienen puntos de control que impiden la división celular ilimitada. Algunos ejemplos de estos puntos de control son la disponibilidad de nutrientes, el daño al ADN y la inhibición del contacto (es decir, una célula entra en contacto con otra célula). Además, la mayoría de las células sólo pueden replicarse un número finito de veces y, por tanto, están programadas para morir después de un número determinado de divisiones celulares.

15 El cáncer es el resultado de una célula que supera estos puntos de control incorporados y prolifera sin control. Esta proliferación descontrolada conduce a la formación de un tumor. Hay dos tipos de tumores, benignos y malignos. Los tumores benignos son incapaces de cruzar los límites naturales entre los tipos de tejidos. Los tumores malignos, por otro lado, son capaces de invadir el tejido cercano o ingresar al torrente sanguíneo y hacer metástasis en una ubicación diferente. Sólo los tumores malignos se consideran cancerosos. Es esta capacidad de infiltrarse y hacer metástasis lo que hace que el cáncer sea una enfermedad tan mortal.

20 Para complicar aún más la lucha contra el cáncer, los tumores malignos tienen distintos tipos de células. Un tipo particularmente problemático son las células madre cancerosas ("CSC"). Las CSC son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en los distintos tipos de células cancerosas que se encuentran en un tumor maligno. Por tanto, las CSC son un factor primario en la capacidad metastásica de un tumor. Las CSC a menudo sobreviven a la radiación y la quimioterapia. Se plantea la hipótesis de que la recurrencia del cáncer después de la radiación y la quimioterapia es el resultado de la incapacidad de la radiación y la quimioterapia para destruir todas las CSC combinada con la capacidad de las CSC para establecer un nuevo tumor.

25 Un tipo de cáncer particularmente problemático es el cáncer de cerebro. Los cánceres de cerebro, tal como los gliomas de alto grado, a menudo se tratan con cirugía seguida de radioterapia. La cirugía de tumores cerebrales suele ser muy complicada. El cirujano debe extirpar el tumor sin dañar ningún tejido cerebral cercano que pueda provocar discapacidades físicas o cognitivas. A menudo, el cirujano es incapaz de eliminar los límites del tumor que entran en contacto con el tejido sano. La radioterapia se utiliza a menudo para matar estas células cancerosas restantes. Sin embargo, las dosis de radiación están limitadas por el daño potencial al tejido cerebral sano. Desafortunadamente, el cáncer de cerebro suele ser resistente a la quimioterapia. Esta resistencia es atribuible en gran medida a la barrera hematoencefálica ("BBB"). La BBB es una barrera física que separa el líquido que rodea el cerebro de las células sanguíneas y otros componentes del torrente sanguíneo. La mayoría de los fármacos contra el cáncer no pueden cruzar la BBB.

35 Un método para tratar el cáncer de cerebro es inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que son necesarios para la progresión del tamaño del tumor. Bevacizumab comercializado bajo la marca Avastin® (Avastin es una marca registrada de Genentech, Inc.) se utiliza para detener e incluso revertir la vascularización de tumores. Sin embargo, Rich J. y colegas, Cane Res, 2006, 66, 7843, descubrieron que cuando Avastin® se utilizó para tratar un tumor cerebral derivado de células madre de glioma y provocó hipoxia y disminución del pH. Sathornsumetee S., Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma, Neuro-Oncol, 2010, Dic, 12(12), 1300-1310. Se sabe que la hipoxia y el pH bajo causan la propagación de CSC y pueden promover la recurrencia del tumor impulsada por CSC.

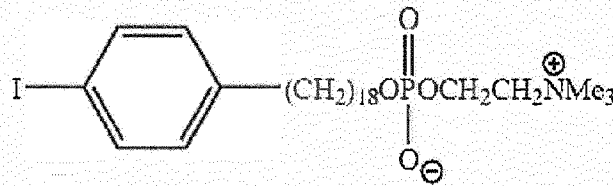
45 La quimioterapia es un término utilizado para describir un tipo particular de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de fármacos citotóxicos contra el cáncer. Los fármacos citotóxicos utilizados durante la quimioterapia se pueden dividir en varias categorías principales, que incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa e inhibidores mitóticos. Los fármacos citotóxicos contra el cáncer suelen provocar el cese de la división celular y, por tanto, afectan tanto al tejido sano como al canceroso. Los agentes alquilantes detienen la división de las células cancerosas al dañar el ADN de la célula cancerosa. Algunos agentes alquilantes comunes utilizados para tratar el cáncer son las mostazas nitrogenadas (por ejemplo, ciclofosfamida (Cytosan®, Cytosan es una marca registrada de Baxter International), nitrosoureas, alquilsulfonatos, triazeínas y etileniminas. Los fármacos con platino, tal como el cisplatino y el carboplatino, funcionan de manera similar a los agentes alquilantes. Los antimetabolitos detienen la división de las células cancerosas al inhibir la síntesis de ADN y ARN. Algunos antimetabolitos comunes utilizados para tratar el cáncer son 6-mercaptopurina, gemcitabina (Gemzar®; Gemzar es una marca registrada de Eli Lilly and Company), metotrexato y pemetrexed (Alimta®, Alimta es una marca registrada de Eli Lilly and Company).

55 Los inhibidores de la topoisomerasa detienen la división de las células cancerosas al inhibir que las enzimas topoisomerasas separe el ADN para su replicación. Algunos inhibidores de la topoisomerasa comunes son topotecán, irinotecán, etopósido y tenipósido. Los inhibidores mitóticos detienen la división de las células cancerosas al inhibir las enzimas clave de la división celular. Algunos inhibidores mitóticos comunes son los taxanos

(por ejemplo, paclitaxel (Taxol®; Taxol es una marca registrada de Bristol-Myers Squibb Company) y docetaxel (Taxotere®; Taxotere es una marca registrada de Aventis Pharma SA)), epotilonas y alcaloides de la vinca.

Una desventaja de todos estos fármacos contra el cáncer es el daño que causan al tejido sano. Debido a que los fármacos tratan el cáncer inhibiendo la función celular normal, el tejido sano que también depende de una división celular constante, tal como las células sanguíneas, las superficies mucosas y la piel, también puede resultar gravemente dañado. Este daño produce una morbilidad significativa y puede limitar la cantidad de quimioterapia que se puede administrar de forma segura. Ejemplos de efectos secundarios que ocurren durante el tratamiento de quimioterapia incluyen recuento sanguíneo bajo, caída del cabello, dolor muscular y articular, náuseas, vómitos, diarrea, llagas en la boca, fiebre y escalofríos. Para superar este problema se están desarrollando fármacos que afectan a las proteínas y a las funciones celulares que se producen sólo en las células cancerosas. Algunos de estos fármacos específicos contra el cáncer son imatinib (Gleevec®; Gleevec es una marca registrada de Novartis AG), gefitinib (Iressa®; Iressa es una marca registrada de AstraZeneca UK Limited), sunitinib (Sutent®; Sutent es una marca registrada de C.P. Pharmaceuticals, International C.V.) y bortezomib (Velcade®; Velcade es una marca registrada de Millennium Pharmaceuticals, Inc.). Sin embargo, estos fármacos no están aprobados para el tratamiento de todos los tipos de cáncer y están universalmente asociados con el desarrollo de resistencia al tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un vehículo de administración de fármacos anticancerígenos que pueda administrar fármacos anticancerígenos potentes, eficaces y de amplio espectro a células cancerosas, incluidas las CSC, evitando al mismo tiempo la absorción sustancial del fármaco por parte de células sanas. Además, el vehículo de administración del fármaco contra el cáncer debería poder cruzar la BBB y administrar el fármaco contra el cáncer a las células cancerosas del cerebro.

Actualmente, existen pocos compuestos químicos que se dirijan preferentemente a las células cancerosas. Uno de esos compuestos es CLR1404. En general, CLR1404 es un nuevo y prometedor agente de diagnóstico de formación de imágenes selectivo de tumores que se utiliza para controlar la respuesta al tratamiento de varias modalidades de tratamiento de tumores. CLR1404 radioyodado, un análogo de éter fosfolípido ("PLE") de segunda generación con la siguiente estructura,



ha mostrado una notable selectividad tumoral en xenoinjertos 55/60, cáncer ortotópico y transgénico y modelos animales derivados de células madre cancerosas, lo que convierte a la molécula central en una plataforma ideal para un vehículo de administración de fármacos contra el cáncer. Ver Patente EE. UU. No. 8535641; Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2014/0030187 y Weichert, JP, et al., Alkylphosphocholine analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy, *Sci Transl Med*, 2014, Jun 11, 6(240), 240ra75.

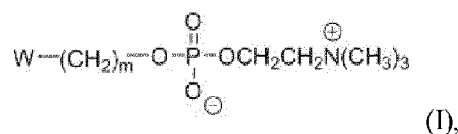
Lo que no se sabe es si un compuesto secuestrado y retenido selectivamente por las células cancerosas y las células madre cancerosas es capaz de administrar un fármaco anticancerígeno a estas mismas células. Además, no se sabe si este compuesto también es capaz de transportar fármacos contra el cáncer a través de la BBB para tratar el cáncer de cerebro. Finalmente, se desconoce si este o compuestos similares pueden hacer que la célula cancerosa retenga el fármaco anticancerígeno en cantidades suficientes y durante un período de tiempo suficiente para erradicar el tumor y prevenir un mayor crecimiento y metástasis. La presente invención adapta la molécula central CLR1404 para su uso como vehículo de administración de fármacos anticancerígenos capaz de dirigir el fármaco anticancerígeno a células cancerosas y células madre cancerosas, incluidas células cancerosas cerebrales. Además, los compuestos de la presente invención se retienen en las células cancerosas.

Resumen de la invención

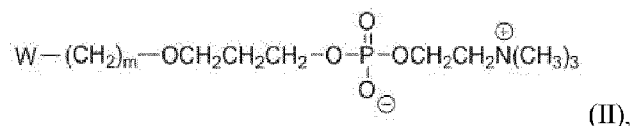
La presente invención está dirigida a compuestos terapéuticos capaces de atacar células cancerosas y células madre cancerosas, incluidas células tumorales cerebrales. La presente invención también está dirigida a compuestos terapéuticos capaces de ser secuestrados y retenidos por células cancerosas y células madre cancerosas, incluyendo células tumorales cerebrales, en cantidad suficiente y durante suficiente duración para tratar el cáncer y prevenir metástasis y recurrencia.

En una realización, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D en la que:

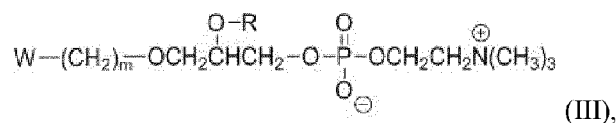
A es al menos un compuesto de fórmula (I),



al menos un compuesto de fórmula (II),



al menos un compuesto de fórmula (III),



5

o una combinación de los mismos,

en donde W se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un alquilo C₁-C₆, un alquenilo, un cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido, en el que R es H o un alquilo y en el que m es un número entero de 12 a 24;

10 B es un compuesto enlazador, preferiblemente un enlace o un compuesto de fórmula (IV), Y-(CH₂)_n-Z (IV), en donde:

Y está unido a A;

Z está unido a D;

Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace, O, NH, C=O, NHSO₂O, y

OC(=O)O;

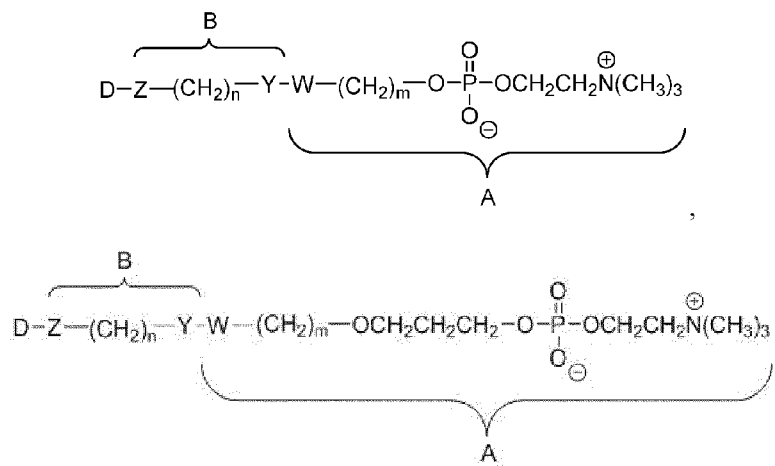
15 Z se selecciona del grupo que consiste en O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂, y -S-S-; y

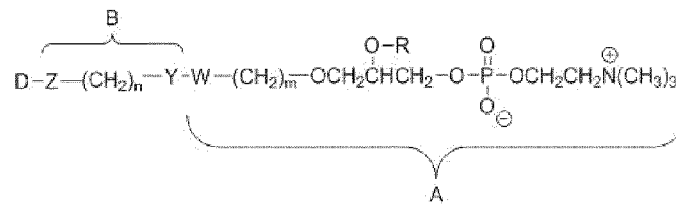
n es un número entero de 0 a 6; y

D es un fármaco anticancerígeno, seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina;

en el que la relación de A a D es de 1:2 a 2:1.

20 En otra realización, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D seleccionado del grupo que consiste en





y una combinación de los mismos, en donde:

W se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un alquilo C₁-C₆, un alquenilo, un cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido;

5 R es H o un alquilo;

m es un número entero de 12 a 24;

Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace, O, NH, NH, C=O, NHSO₂O, y OC(=O)O;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂, y -S-S-;

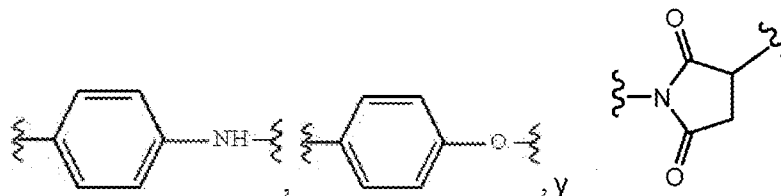
10 n es un número entero de 0 a 6; y

D es un fármaco anticancerígeno, seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina;

en donde B es opcionalmente un enlace entre A y D.

En una realización preferida, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D en la que:

15 A es un compuesto de fórmula (I), en la que W se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C₁,



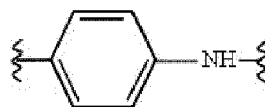
y en donde m es 18;

20 B es un compuesto enlazador seleccionado de un enlace y un compuesto de fórmula (IV), Y-(CH₂)_n-Z (IV), en donde n es un número entero de 0 a 6, Y está unido a A, Z está unido a D, Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace y C=O y Z se selecciona del grupo que consiste en de NH, C=O, C(=O)NH y C(=O)O; y

D se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina.

En una realización más preferida, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D en la que:

25 A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



y m es 18;

B es un compuesto de fórmula (IV), en la que Y es C=O y Z es C=O, C(=O)NH o C(=O)O y n es 3 o 4; y

D es paclitaxel,

30 en donde la relación de A a D es 1:1.

En otra realización más preferida, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D en la que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



5 y m es 18;

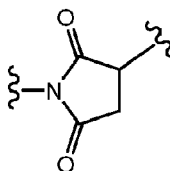
B es un enlace o un compuesto de fórmula (IV), en la que Y es C=O, Z es NH y n es 1 o 3; y

D es geldanamicina,

en donde la relación de A a D es 1: 1.

10 En otra realización más preferida, la presente invención se dirige a un compuesto terapéutico de fórmula A-B-D en la que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



y m es 18;

B es un enlace; y

15 D es mertansina

en donde la relación de A a D es 1:1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la presente invención en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en el que el cáncer comprende células madre cancerosas.

En otra realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en el que el cáncer es recurrente.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Los análogos de éter fosfolípido ("PLE") se secuestran mediante balsas lipídicas.

Figura 2. Captación preferencial de CLR1501 por las células cancerosas. Comparar la absorción de CLR1501 por líneas celulares cancerosas en (A) y (C)-(F) con células normales en (B). (A) Renal (Caki-2). (B) Fibroblasto de piel humana normal. (C) Ovárico (OVcar-3). (D) Pancreático (Panc-1). (E) Melanoma (A-375). (F) Próstata (PC-3).

30 Figura 3. Retención prolongada de ¹³¹I-CLR1404 mediante xenoinjerto de tumor RL-251 humano en ratón SCID.

Figura 4. Detección de glioma C6 en cerebro de rata utilizando ¹²⁵I-NM404. (A) Bioscan del cerebro de rata de control simulado. (B) Imagen bioescaneada del cerebro de rata de (A) superpuesta a una fotografía digital que muestra los niveles de fondo de ¹²⁵I-NM404 en tejido cerebral normal. (A') Fotografía digital de un cerebro de rata con glioma C6 4 días después inyección ¹²⁵I-NM404. (B') Imagen de bioescaneo del cerebro de rata de (A'). (C) Imágenes de posición y tamaño coincidente de (A') y (B') superpuestas para mostrar una localización intensa de NM404 en el tumor. (D') Muestra teñida con H&E que confirma la presencia de tumor.

35 Figura 5. Captación de ¹²⁴I-CLR1404 en una amplia gama de tumores malignos. (A)-(I) son modelos de roedores con xenoinjertos de cáncer humano. (J)-(M) son modelos de cáncer de roedores. (A) Glioma ortotópico U87 (rata). (B) Colón HCT-116. (C) Colón HT-29. La flecha indica la ubicación del tumor. (D) Mama MDA-MB-231. La flecha indica la

ubicación del tumor. (E) Próstata PC-3. (F) PC-3 metastásico. (G) Xenoinjerto tibial PC-3. (H) BxPC3 pancreático. La flecha inferior indica la ubicación del tumor. La flecha superior indica metástasis hepática. (I) Sarcoma de Ewing. La flecha indica la ubicación del tumor. (J) Vejiga de ratón SV40. (K) Mama de ratón 4T1. (L) c-myc pancreático de ratón. (M) Cerebro de rata CNS-1.

5 Figura 6. Detección de tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC") en pacientes humanos utilizando ¹³¹I-CLR1404. (A) muestra imágenes de cámara gamma del paciente 1 a los 4 y 11 días después de inyección ¹³¹I-CLR1404. Obsérvese la retención intensa y prolongada de CLR1404 en los tumores de NSCLC (flechas). (B y C) muestran la ubicación y el tamaño de la lesión focal de 3 cm en el pulmón izquierdo (A) y una gran masa infiltrativa en el pulmón derecho (B) (flechas). (D y E) muestran imágenes planas de medicina nuclear de todo el cuerpo del Paciente 2 1, 2 y 4 días después de administración intravenosa ¹³¹I-CLR1404. (F y G) muestran escaneos CT axiales (F) y coronales (G) que indican la ubicación de un tumor grande de NSCLC de 6 cm (flechas).

Figura 7. Detección de 3 metástasis de tumores cerebrales previamente desconocidas en pacientes con NSCLC utilizando ¹²⁴I-CLR1404. Las flechas indican la ubicación de los tumores según las imágenes obtenidas mediante PET/CT después de la captación de ¹²⁴I-CLR1404 por células cancerosas.

15 Figura 8. Detección de recurrencia tumoral de metástasis falcina frontal derecha mediante ¹²⁴I-CLR1404. (A) Resonancia magnética del cerebro después de la radiocirugía. La flecha indica lesión que se interpretó como necrosis por radiación. (B) Imagen PET usando ¹²⁴I-CLR1404 muestra la captación de ¹²⁴I-CLR1404 por lesión. (C) La resonancia magnética del cerebro 8 meses después de la radiocirugía estereotáxica muestra un aumento en el tamaño de la lesión, lo que indica una posible recurrencia.

20 Figura 9. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para MDA-MB-468. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 10. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para NCI-H1299. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 11. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para NCI-H460. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 12. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para Capan-2. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 13. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para MiaPaCa-1. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

25 Figura 14. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para HT29. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 15. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para HCT116. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Figura 16. Conjugados PLE-Paclitaxel IC₅₀ para PC-3. (A) paclitaxel libre, (B) CLR1601 y (C) CLR1603.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" incluye tratamiento preventivo, así como tratamiento remitente del trastorno que incluye reducir, suprimir e inhibir la progresión o recurrencia del cáncer. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "reducir", "suprimir" e "inhibir" tienen el significado comúnmente entendido de disminuir o disminuir. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "progresión" significa aumentar en alcance o gravedad, avanzar, crecer o empeorar. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "recurrencia" y "recurrente" se refieren al regreso de una enfermedad después de una remisión.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administrar" se refiere a poner en contacto a un paciente, tejido, órgano o células con un compuesto anticancerígeno de la presente invención. Tal como se utiliza en el presente documento, la administración se puede lograr *in vitro* (es decir, en un tubo de ensayo) o *in vivo*, (es decir, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, humanos). En determinadas realizaciones, la presente invención abarca la administración de los compuestos útiles en la presente invención a un paciente o sujeto. Un "paciente" o "sujeto", usado de manera equivalente en el presente documento, se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, que: (1) tiene un trastorno remediable o tratable mediante la administración de la sustancia anticancerígena usando un compuesto PLE o (2) es susceptible a un trastorno que se puede prevenir mediante la administración del compuesto anticancerígeno de la presente invención.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para afectar un efecto biológico deseado, tal como un resultado beneficioso, que incluye, entre otros, prevención, disminución, mejora o eliminación de signos o síntomas de una enfermedad o trastorno. Por tanto, la cantidad total de cada componente activo de la composición o método farmacéutico es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el sujeto. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" dependerá del contexto en el que se administre. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones profilácticas o terapéuticas.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto terapéutico" se refiere a cualquier compuesto químico capaz de proporcionar tratamiento para el cáncer.

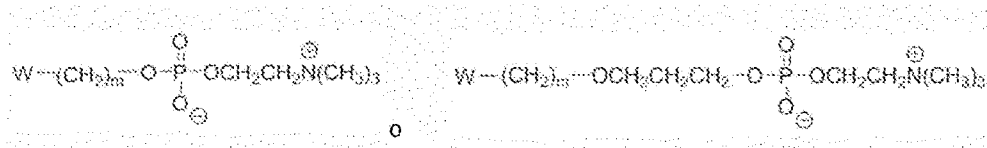
Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquier enfermedad que resulte de la división incontrolada de células capaces de metastatizar.

Los términos "fármaco de quimioterapia", "fármaco anticancerígeno" y "fármaco antitumoral" se utilizan indistintamente en toda la memoria descriptiva.

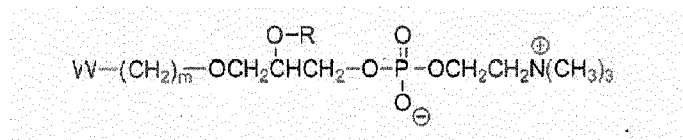
- 5 Los términos "célula tumoral maligna" y "célula cancerosa" se utilizan indistintamente en toda la memoria descriptiva. Los términos "célula madre de tumor maligno" y "célula madre de cáncer" se utilizan indistintamente en toda la memoria descriptiva.

- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de una combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "A" se refiere a un éter de fosfolípido de fórmula



o



- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "W" se refiere a un arilo, un alquilo C₁-C₆, un alquenilo, un cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un anillo aromático que incluye un grupo fenilo.

- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un alquilo de cadena lineal o ramificada que consiste en un grupo hidrocarbonado saturado de 1 a 24 átomos de carbono (C₁-C₂₄) a menos que se indique lo contrario. El grupo alquilo puede ser cíclico o acíclico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a un doble enlace carbono-carbono.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico de 3 a 24 átomos de carbono (C₃-C₂₄).

- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo cíclico de 3 a 24 átomos (C₃-C₂₄) seleccionado de carbono, nitrógeno, azufre, fosfato y oxígeno en el que al menos un átomo es carbono.

- 30 En general, el término "sustituido", ya sea precedido o no por el término "opcionalmente", significa que uno o más hidrógenos del resto designado se reemplazan con un sustituyente adecuado. A menos que se indique lo contrario, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede sustituirse con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por esta invención son preferiblemente aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables o químicamente viables.

- 35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "R" se refiere a un hidrógeno (H) o un alquilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "m" se refiere a un número entero de 12 a 24.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "n" se refiere a un número entero de 0 a 6.

- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "B" se refiere a un compuesto enlazador. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto enlazador" se refiere a cualquier compuesto o compuestos químicos capaces de formar un enlace químico con dos o más compuestos químicos distintos de modo que todos los compuestos formen un único compuesto más grande. En una realización, el compuesto enlazador es un enlace. Se pueden usar múltiples compuestos enlazadores en la formación del compuesto más grande. En realizaciones específicas, el término compuesto enlazador es un enlace o un compuesto de fórmula Y-(CH₂)_n-Z.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Y" se refiere a un enlace, O, NH, C=O, NHSO_2O , o OC(=O)O .

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "Z" se refiere a O, NH, C=O, C(=O)O , C(=O)NH , SO_2 , OC(=O)OCH_2 , y -S-S-.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "D" se refiere a cualquier fármaco anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina.

10 Tal como se define en el presente documento, el término "isómero" incluye, entre otros, isómeros y análogos ópticos, isómeros y análogos estructurales, isómeros y análogos conformacionales y similares. En una realización, esta invención abarca el uso de diferentes isómeros ópticos de la presente invención. Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos anticancerígenos útiles en la presente invención pueden contener al menos un centro esteriogénico. Por consiguiente, los compuestos usados en los métodos de la presente invención pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Algunos compuestos también pueden presentar polimorfismo.

15 Debe entenderse que la presente invención puede abarcar el uso de cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, cuya forma posea propiedades útiles en el tratamiento de afecciones relacionadas con el cáncer descritas y reivindicadas en el presente documento. En una realización, los compuestos anticancerígenos pueden incluir isómeros (R) puros. En otra realización, los compuestos antitumorales pueden incluir isómeros (S) puros. En otra realización, los compuestos pueden incluir una mezcla de los isómeros (R) y (S). En otra realización, los compuestos pueden incluir una mezcla racémica que comprende isómeros tanto (R) como (S). Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral).

20 La invención incluye el uso de sales farmacéuticamente aceptables de compuestos aminosustituídos con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, ácido cítrico y ácido clorhídrico. La invención también incluye N-óxidos de los sustituyentes amino de los compuestos descritos en el presente documento. También se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables a partir de compuestos fenólicos mediante tratamiento con bases inorgánicas, por ejemplo, hidróxido de sodio. Además, los ésteres de los compuestos fenólicos se pueden preparar con ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos, por ejemplo, ésteres de ácido acético y ácido benzoico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un compuesto formulado a partir de un compuesto base que logra sustancialmente el mismo efecto farmacéutico que el compuesto base.

30 Esta invención incluye además derivados de los compuestos anticancerígenos. El término "derivados" incluye, entre otros, derivados de éter, derivados de ácido, derivados de amida, derivados de éster y similares. Además, esta invención incluye además métodos que utilizan hidratos de los compuestos antitumorales. El término "hidrato" incluye, entre otros, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato y similares.

35 Esta invención incluye además metabolitos de los compuestos anticancerígenos. El término "metabolito" significa cualquier sustancia producida a partir de otra sustancia mediante metabolismo o proceso metabólico.

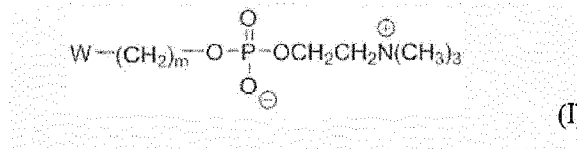
40 Los cánceres que pueden tratarse con compuestos de la presente invención incluyen, entre otros: cáncer de mama, incluyendo el cáncer de mama masculino; cánceres digestivos/gastrointestinales incluyendo cáncer anal, cáncer de apéndice, cáncer de conducto biliar extrahepático, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores del estroma gastrointestinal ("gist"), tumores de células de los islotes, cáncer primario de hígado en adultos, cáncer de hígado infantil, cáncer de páncreas, cáncer de recto, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago (gástrico); cánceres endocrinos y neuroendocrinos que incluyen adenocarcinoma de páncreas, carcinoma adrenocortical, tumores neuroendocrinos de páncreas, carcinoma de células de Merkel, tumor neuroendocrino de pulmón de células no pequeñas, tumor neuroendocrino de pulmón de células pequeñas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, tumor pituitario y cáncer de tiroides; cánceres oculares, incluidos melanoma intraocular y retinoblastoma; cáncer genitourinario incluyendo cáncer de vejiga, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de pelvis renal y uréter de células de transición, cáncer testicular, cáncer de uretra y tumor de Wilms; cánceres de células germinales incluyendo cáncer del sistema nervioso central infantil, tumor extracraneal de células germinales infantil, tumor extragonadal de células germinales, tumor de células germinales de ovario y cáncer testicular; cánceres ginecológicos que incluyen cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, tumor trofoblástico gestacional, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, sarcoma uterino, cáncer vaginal y cáncer de vulva; cánceres de cabeza y cuello, incluyendo cáncer de hipofaringe, cáncer de laringe, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de cuello escamoso metastásico con cáncer primario oculto, cáncer de boca, cáncer de nasofaringe, cáncer de orofaringe, cáncer de senos paranasales y de cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de faringe, cáncer de glándulas salivales y cáncer de garganta; leucemias incluyendo leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia linfoblástica aguda en niños, leucemia mieloide aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en niños, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas; linfomas que incluyen linfoma relacionado con el SIDA, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin durante el embarazo, micosis fungoide, linfoma no Hodgkin en adultos,

linfoma no Hodgkin infantil, linfoma no Hodgkin durante el embarazo, linfoma no Hodgkin durante el embarazo, linfoma central primario linfoma del sistema nervioso, síndrome de Sezary y macroglobulinemia de Waldenstrom; cánceres musculoesqueléticos que incluyen sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno de hueso, rhabdomyosarcoma infantil y sarcoma de tejido blando; cánceres neurológicos que incluyen tumor cerebral en adultos, tumor cerebral infantil, astrocitomas, glioma de tronco encefálico, tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, craneofaringioma, ependimoma, neuroblastoma, linfoma primario del sistema nervioso central (CNS); cánceres respiratorios/torácicos incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno, timoma y carcinoma tímico; y cánceres de piel, incluyendo el sarcoma de Kaposi, el melanoma y el carcinoma de células escamosas.

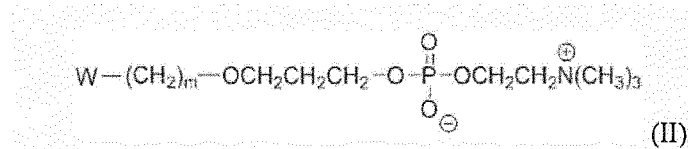
Se ha demostrado que los compuestos de fórmula (1) de la presente invención son secuestrados por células madre cancerosas. Véase Weichert J.P., et al. (2014) en 2, Figura 2 (que demuestra que CLR-1501, un análogo fluorescente de CLR1404, ha mejorado la absorción por parte de las células madre de glioblastoma humano y las células de glioblastoma humano cultivadas en suero en comparación con los astrocitos humanos normales y las células madre neurales fetales humanas). Las células madre cancerosas están asociadas con la mayoría, si no con todos, los principales tipos de cáncer. La hipoxia tumoral estimula la propagación de células madre cancerosas, lo que aumenta la resistencia y el potencial metastásico. Como tales, las células madre cancerosas están asociadas con la resistencia a la quimioterapia, el nuevo crecimiento de tumores y la metástasis después de la quimioterapia y la radioterapia. Por tanto, los compuestos de la presente invención tienen el potencial de tratar diversas formas de cáncer que han demostrado ser resistentes a los regímenes terapéuticos tradicionales.

Compuestos de la invención

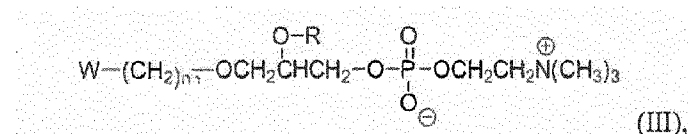
Los vehículos de administración de fármacos que son útiles para la presente invención incluyen, entre otros, compuestos de fórmula (I),



o fórmula (II),



o fórmula (III)



o una combinación de los mismos, en donde W se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un alquilo C₁-C₆, un alquenilo, un cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido, en el que R es H o un alquilo y en el que m es un número entero de 12 a 24.

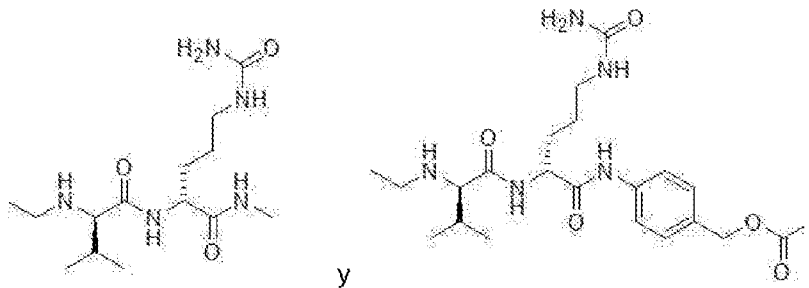
La base para el direccionamiento selectivo a tumores de los compuestos de la presente invención radica en las diferencias entre las membranas plasmáticas de las células cancerosas en comparación con las de la mayoría de las células normales. Específicamente, las membranas de las células cancerosas están altamente enriquecidas en "balsas de lípidos". Las células cancerosas tienen de cinco a diez veces más balsas de lípidos que las células sanas. Las balsas lipídicas son regiones especializadas de la bicapa de fosfolípidos de la membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos y sirven para organizar la superficie celular y las moléculas de señalización intracelular (por ejemplo, factores de crecimiento y receptores de citoquinas, la vía de supervivencia de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt). Los datos sugieren que las balsas de lípidos sirven como portales de entrada para los PLE. La marcada selectividad de estos compuestos por las células cancerosas frente a las células no cancerosas se atribuye a la alta afinidad de los PLE por el colesterol y a la abundancia de balsas lipídicas ricas en colesterol en las células cancerosas. El papel fundamental que desempeñan las balsas lipídicas se ve subrayado por el hecho de que la alteración de la arquitectura de las balsas lipídicas suprime la absorción de PLE en las células cancerosas. Se ha demostrado que la absorción de PLE se reduce en un 60% cuando se bloquea la formación de balsas de lípidos. (Ver Ejemplo 2 y Fig. 1).

Los resultados preliminares obtenidos en más de 55 modelos de xenoinjertos y tumores espontáneos han demostrado universalmente que CLR1404 sufre una captación selectiva y una retención prolongada en los tumores. Debido a que el agente se metaboliza hasta cierto punto en el hígado, los inventores evitaron la evaluación anterior del compuesto en modelos de tumores hepáticos debido a los altos niveles de radioactividad de fondo del hígado.

5 CLR1404 es un PLE. Los resultados obtenidos en una variedad de modelos tumorales indican que CLR1404 es secuestrado y retenido selectivamente por células cancerosas y células madre cancerosas. De hecho, se ha demostrado que CLR1404 permanece en las células cancerosas hasta por 20 días. Véase la Fig. 3. CLR1404 se localiza tanto en lesiones primarias como metastásicas, independientemente de la ubicación anatómica, incluyendo las que se encuentran en los ganglios linfáticos. Vea los Ejemplos 3-8. La alta avidéz tumoral de fondo y la selectividad tumoral de CLR1404 sugieren que la molécula central es muy adecuada para su uso como vehículo de administración de fármacos contra el cáncer.

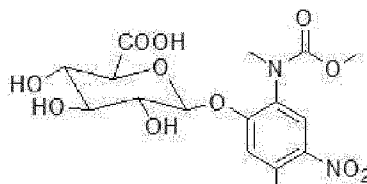
Los compuestos enlazadores que son útiles para la presente invención incluyen cualquier enlazador químico capaz de unir un vehículo de administración de fármacos de la presente invención a un fármaco anticancerígeno de la presente invención. Los compuestos enlazadores que son útiles para la presente invención incluyen enlazadores tanto escindibles como no escindibles. En una realización, los compuestos enlazadores que son útiles para la presente invención incluyen, entre otros, aminobutiramida, aminoácidos, ácidos glutarámicos, ácidos dicarboxílicos, ácidos carbámicos, un carbonilo, ácido 9,10-antracenedicarboxílico, ácido bifeníl-3,3',5,5'-tetracarboxílico, ácido bifeníl-3,4',5-tricarboxílico, ácido 5-bromoisoftálico, ácido 5-ciano-1,3-benzenodicarboxílico, 2,2'-diamino-4,4'-ácido estilbenodicarboxílico, ácido 2,5-diaminotereftálico, ácido 2,5-dihidroxitereftálico, ácido 5-etinil-1,3-benzenodicarboxílico, ácido 2-hidroxitereftálico, imidazol, 2-metilimidazol, ácido 2,6-naftalenodicarboxílico, ácido oxálico deshidratado, ácido tereftálico, ácido [1,1':4',1'']terfenil-3,3'',5,5''-tetracarboxílico, 3,3',5,5'-tetracarboxidifenilmetano, 1,2,4,5-tetrakis(4-carboxifenil)benzeno, ácido 4,4',4''-s-triazina-2,4,6-triil-tribenzoico, ácido trimésico, 1,3,5-tris(4'-carboxi[1, 1'-bifenil]-4-il)benzeno, 1,3,5-tris(4-carboxifenil)benzeno y 1,3,5-triscarboxifeniletinilbenzeno.

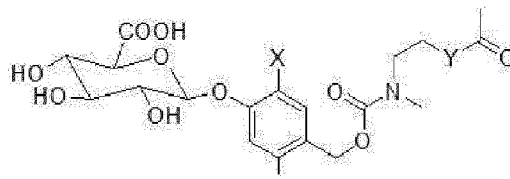
25 En otra realización, los compuestos enlazadores útiles para la presente invención también incluyen, entre otros, enlazadores sensibles a proteasas lisosomales con o sin un fragmento autoinmolable basado en anilina. Ejemplos no limitantes de enlazadores sensibles a proteasa lisosomal son



30 que contienen el enlazador dipéptido valina-citrulina diseñado para mostrar un equilibrio óptimo entre la estabilidad del plasma y la escisión de la proteasa intracelular. Véase, Tranoy-Opalinski I., Design of self-immolative linkers for tumour-activated prodrug therapy, Anticancer Agents Med Chem, 2008 Aug, 8(6):618-637.

35 En otra realización, los compuestos enlazadores útiles para la presente invención también incluyen, entre otros, enlazadores autoinmolables que se escinden mediante β -glucuronidasa. La β -glucuronidasa está presente en altas concentraciones en el área necrótica que rodea las células cancerosas. Ver, Tranoy-Opalinski I., β -glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: An update, Eur J Med Chem, 2014 Mar 3, 74, 302-313. Ejemplos no limitantes de enlazadores autoinmolantes escindibles por β -glucuronidasa son





en donde X es NH₂ o NO₂ y en donde Y es O o NCH₃.

Los compuestos enlazadores preferidos de la presente invención son un enlace o un compuesto de fórmula (IV), Y-(CH₂)_n-Z (IV), en donde:

5 Y está unido a A;

Z está unido a D;

Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace, O, NH, C=O, NHSO₂O, y

OC(=O)O; y

Z se selecciona del grupo que consiste en O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂, y -S-S-; y

10 n es un número entero de 0 a 6.

Los compuestos enlazadores más preferidos de la presente invención son un enlace o un compuesto de fórmula (IV), en la que n es un número entero de 0 a 6, Y está unido a A, Z está unido a D, Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace y C=O y Z se selecciona del grupo que consiste en NH, C=O, C(=O)NH y C(=O)O.

15 Los fármacos anticancerígenos que son útiles para la presente invención son paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina.

Los vehículos de administración de fármacos PLE de la presente invención pueden unirse singularmente o en múltiples a un fármaco anticancerígeno en cualquier número de posibles sitios de unión estable a través de un compuesto enlazador o directamente.

Composiciones de la invención

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la presente invención en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En un aspecto preferido la composición farmacéutica está libre de Kolliphor[®] EL (Kolliphor es una marca registrada de BASF SE). Kolliphor[®] EL se conocía anteriormente como Cremophor[®]EL (Cremophor es una marca registrada de BASF SE).

25 Los niveles de dosificación reales de ingredientes activos en las composiciones terapéuticas de esta invención se pueden variar para obtener una cantidad de compuesto(s) activo(s) que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composiciones y modo de administración en particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad del compuesto particular, la vía de administración, la gravedad de la afección que se está tratando y la afección y el historial médico previo del paciente que se está tratando. Sin embargo, está dentro de la experiencia en la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado.

30 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto de la invención significa una cantidad suficiente del compuesto para tratar trastornos, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico tratante dentro del alcance de su sólido criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, vía de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de los conocimientos de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

35 La dosis diaria total de los compuestos de esta invención administrada a un ser humano o un animal inferior puede oscilar de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 1000 mg/kg/día. Para fines de administración oral, las dosis más preferibles pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5 mg/kg/día. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para fines de administración; en consecuencia, las

composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas para completar la dosis diaria.

5 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la presente invención formulados junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse especialmente para administración oral en forma sólida o líquida, para administración parenteral o para administración rectal.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar a humanos y otros mamíferos por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, transdérmica (por ejemplo, usando un parche), transmucosa, sublingual, pulmonar, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos o gotas), por vía bucal o como aerosol oral o nasal. Los términos "parenteral" o "parenteralmente", como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un componente de la presente invención y un diluyente fisiológicamente tolerable. La presente invención incluye uno o más compuestos como se describe anteriormente formulados en composiciones junto con uno o más diluyentes, vehículos, adyuvantes o vehículos fisiológicamente tolerables o aceptables que se denominan colectivamente en el presente documento diluyentes, para inyección parenteral, para administración intranasal, para administración oral en forma sólida o líquida, para administración rectal o tópica, entre otros.

20 Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), aceites vegetales (tales como aceite de oliva), ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo, y mezclas adecuadas de los mismos.

25 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

35 Las formas de depósito inyectables se elaboran formando matrices de microencápsulas del fármaco en polímeros biodegradables tal como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

40 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso.

45 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un excipiente o portador inerte y farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; b) aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; c) humectantes tales como glicerol; d) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; e) agentes retardantes de solución tales como parafina; f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; g) agentes humectantes tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; 50 h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tampón.

55 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

5 Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal que liberen el o los ingredientes activos sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, dado el caso, con uno o más de los excipientes antes mencionados.

10 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencilo, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

15 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

20 Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y por tanto se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

25 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas generalmente derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilaminares que se encuentran dispersos en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas) naturales y sintéticos utilizados por separado o juntos. Los métodos para formar liposomas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, NY (1976), pág. 33 *et seq.* Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y tasa de eliminación *in vivo*.

30 En un método de la presente invención, se puede administrar una composición farmacéutica en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse mediante infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (ver Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En aún otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, por ejemplo, el hígado, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990).

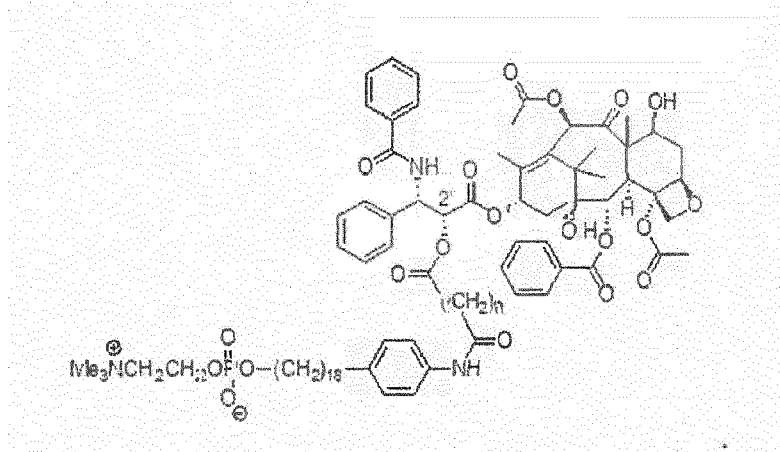
35 En otro aspecto, la invención se dirige a una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para uso en un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto.

40 En general, la invención no se limita al tratamiento de ninguna enfermedad o afección específica, sino que abarca el tratamiento de cualquier enfermedad o afección cuyo mecanismo pueda verse afectado por los compuestos de la presente invención.

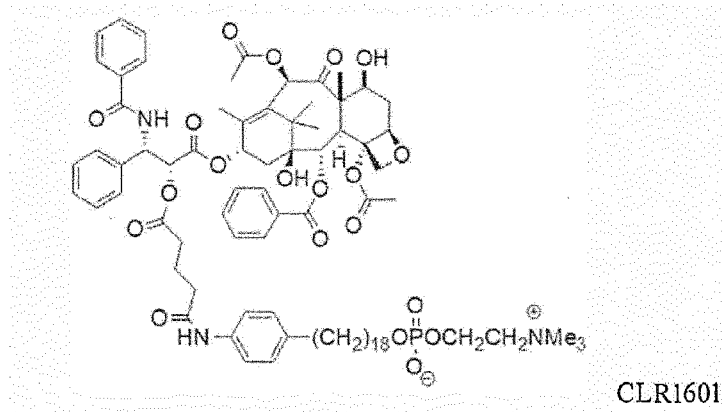
Realizaciones Representativas

Conjugados de paclitaxel-CLR1404

45 En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado a un compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel mediante un enlace éster en el grupo 2'-OH,

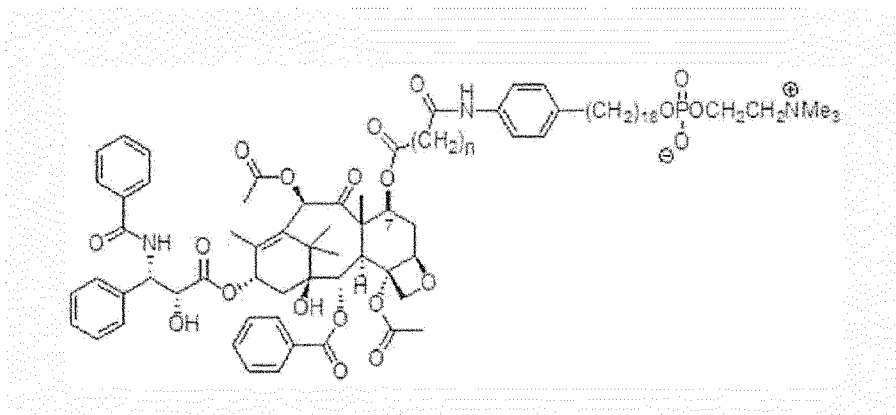


5 En una realización preferida de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido glutarámico, en el que el enlazador de ácido glutarámico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel mediante un éster unido en el grupo 2'-OH,

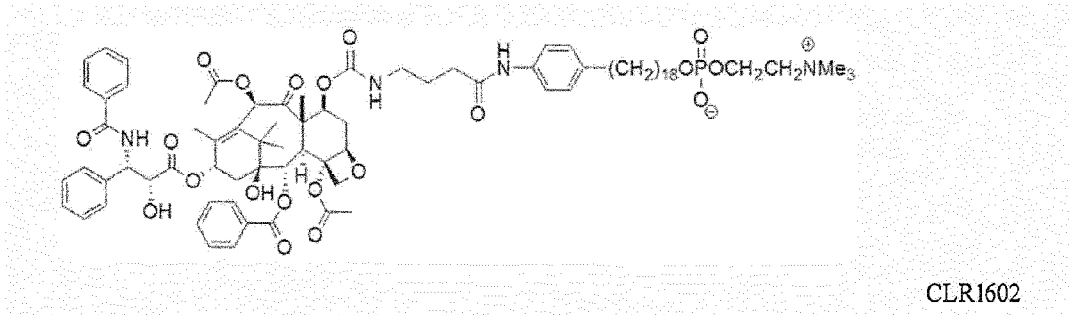


conjugado.

10 En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado al compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel mediante un enlace éster en el grupo 7-OH,

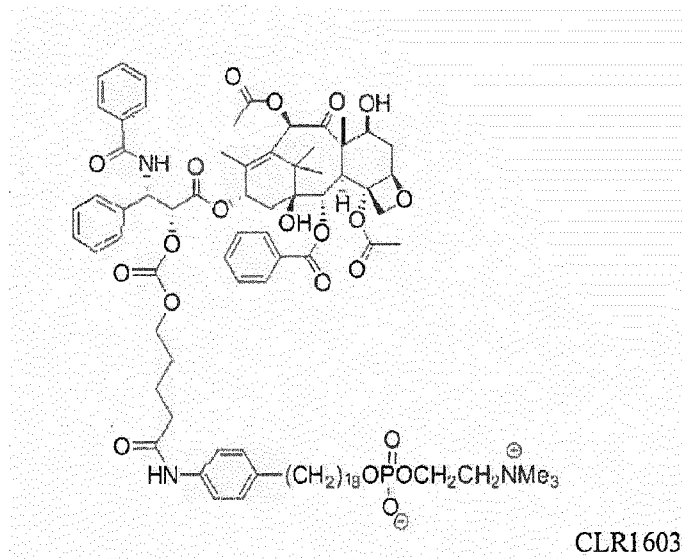


En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado al compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido carbámico, en el que el enlazador de ácido carbámico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel mediante un enlace éster en el grupo 7-OH,



conjugado.

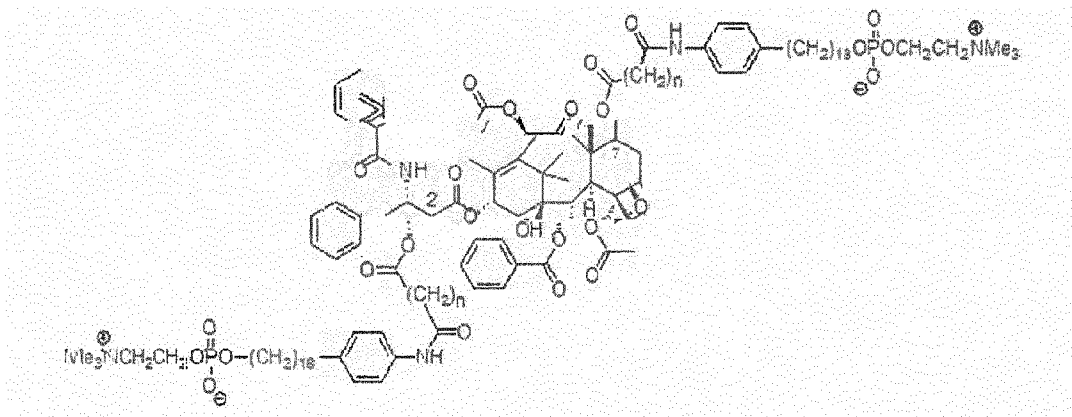
5 En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado al compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido carbónico-carboxílico, en el que el enlazador de ácido carbónico-carboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel a través de un enlace éster en el grupo 7-OH,



10 conjugado.

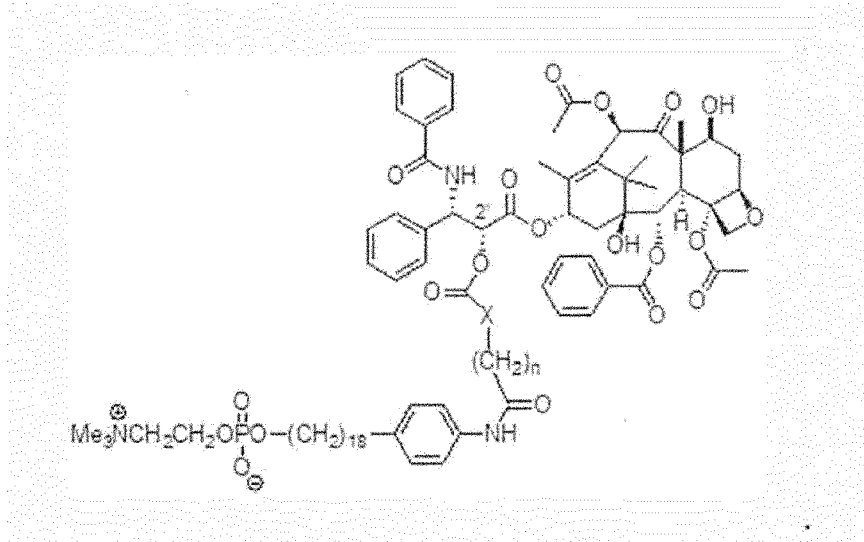
En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel unido a dos compuestos centrales de CLR1404 mediante enlaces de ácido dicarboxílico, en donde los enlazadores de ácido dicarboxílico están unidos a los compuestos centrales de CLR1404 mediante enlaces amida y a paclitaxel a través de enlaces éster tanto en el grupo 2'-OH como en el grupo 7-OH,

15



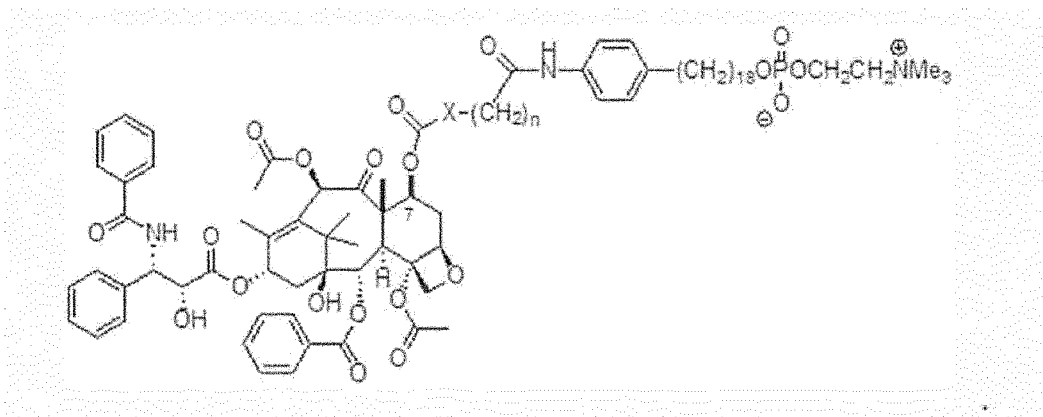
En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel a través de un enlace carbonato o carbamato en el grupo 2'-OH,

5



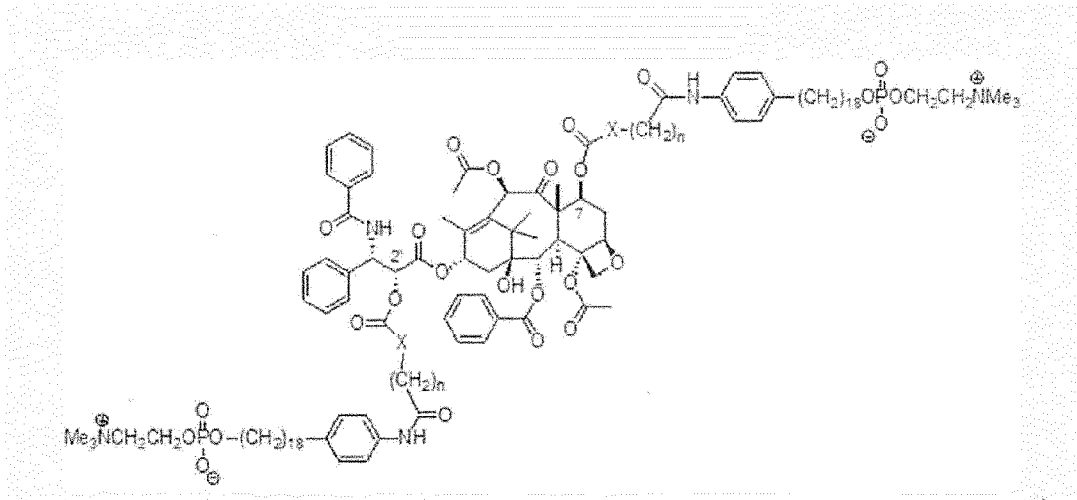
En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado a un compuesto central de CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace amida y al paclitaxel a través de un enlace carbonato o carbamato en el grupo 7-OH,

10

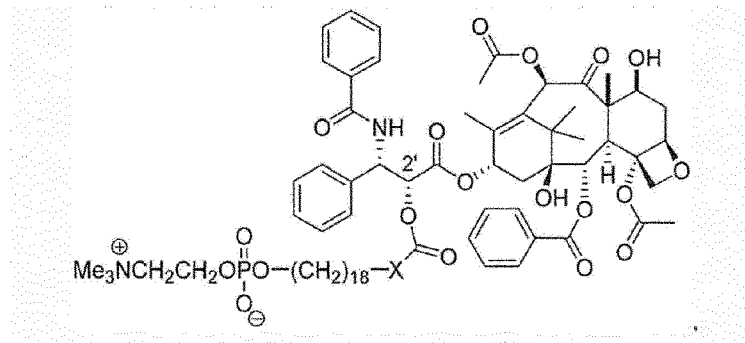


En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado a dos compuestos centrales de CLR1404 mediante enlazadores de ácido dicarboxílico, en donde los enlazadores de ácido dicarboxílico están unidos a las dos moléculas centrales de CLR1404 mediante enlaces amida y al paclitaxel mediante un enlace carbonato o carbamato en tanto el grupo 2'-OH como el grupo 7-OH,

15

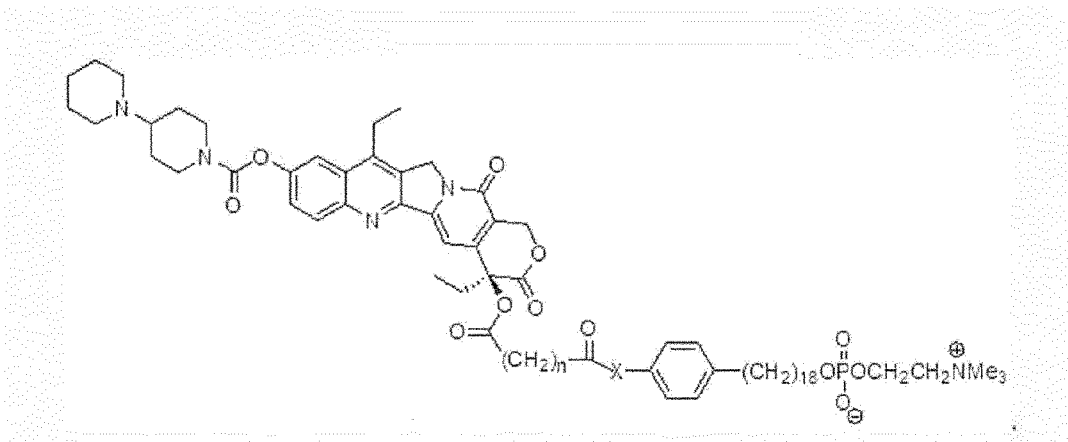


5 En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es paclitaxel enlazado a un compuesto de alquil fosfocolina C18 mediante un enlazador carboxílico, en el que el enlazador carboxílico está unido al compuesto de alquil fosfocolina C18 mediante un enlace amida o carbonato y a paclitaxel mediante un carbonato o un enlace carbamato en el grupo 2'-OH



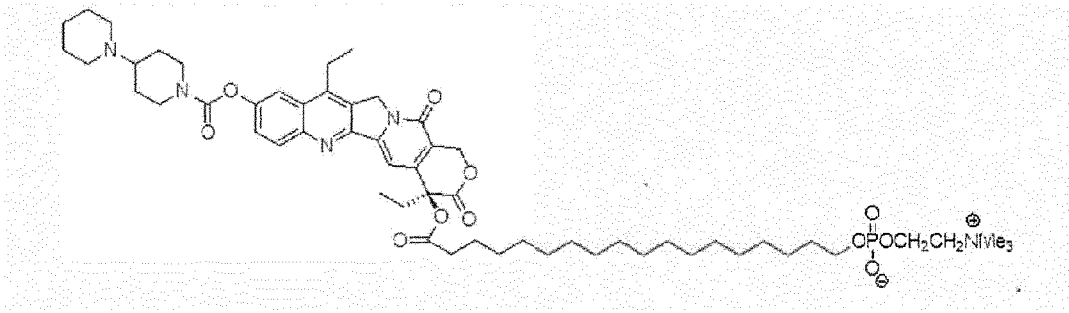
Conjugado irinotecán-CLR1404

10 En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es irinotecán unido al compuesto CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto central de CLR1404 mediante un enlace a carbonato o carbamato y al irinotecán mediante un enlace éster,



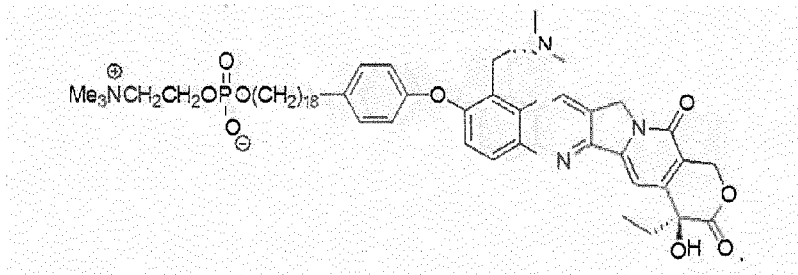
Conjugado de irinotecán-alquil C18 fosfocolina

15 En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es irinotecán enlazado a un compuesto de alquil fosfocolina C18 mediante un enlazador carbonilo, en el que el enlazador carbonilo está unido al compuesto de alquil fosfocolina C18 mediante un enlace carbono-carbono y al irinotecán mediante un enlace éster.



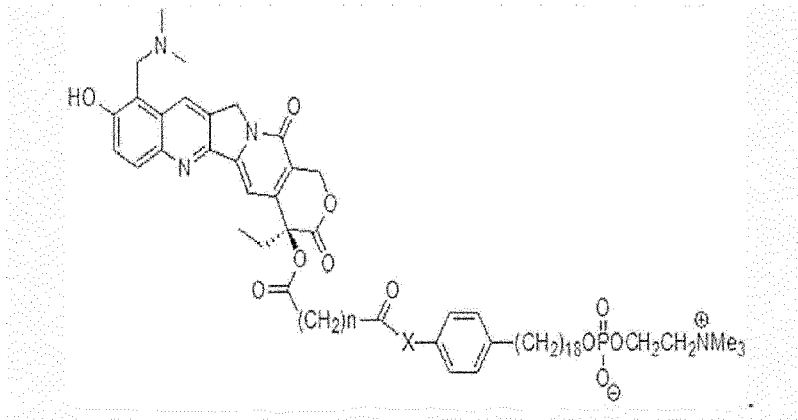
Conjugados topotecán-CLR1404

En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es topotecán unido al compuesto central CLR1404 mediante un éter fenílico no hidrolizable.



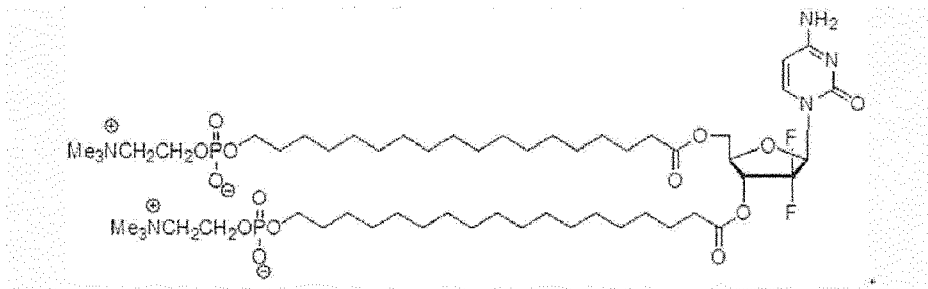
5

En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es topotecán enlazado a un compuesto central CLR1404 mediante un enlazador de ácido dicarboxílico, en el que el enlazador de ácido dicarboxílico está unido al compuesto CLR1404 mediante un enlace carbonato o carbamato y al topotecán mediante un enlace éster.

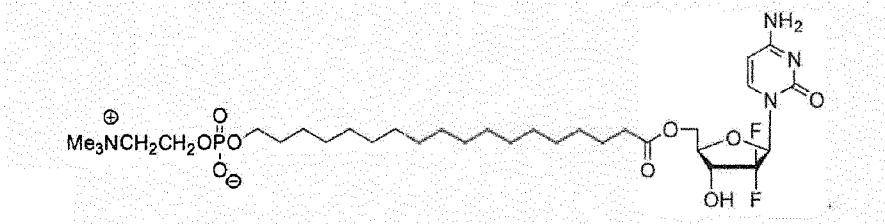


10 Conjugado gemcitabina-alkilo C18 fosfocolina

En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es gemcitabina enlazada a dos compuestos de alquil fosfocolina C18 mediante enlaces carbonilo, en donde los enlazadores carbonilo están unidos a los compuestos de alquil fosfocolina C18 mediante enlaces carbono-carbono y a gemcitabina mediante enlaces éster.

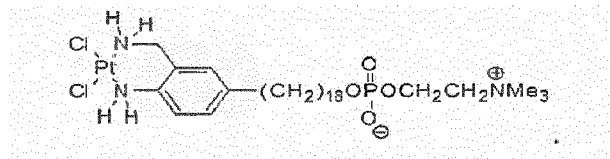


En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es gemcitabina enlazada a un compuesto de alquilo C18 fosfocolina mediante un enlazador carbonilo, en donde el enlazador carbonilo está unido al compuesto de alquilo C18 fosfocolina mediante un enlace carbono-carbono y a gemcitabina mediante un enlace éster.



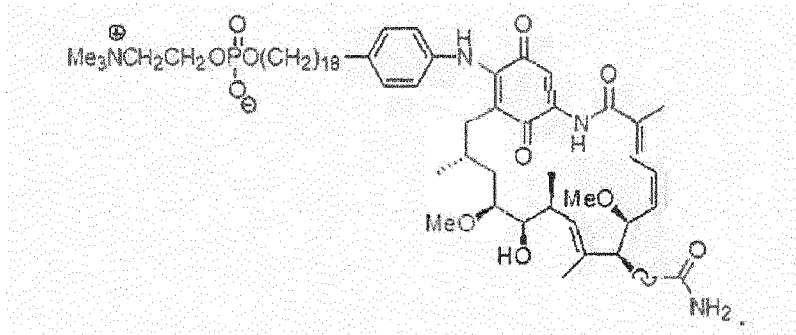
5 Conjugado central Cis platin-CLR1404

En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es cisplatino enlazado directamente al compuesto central CLR1404.

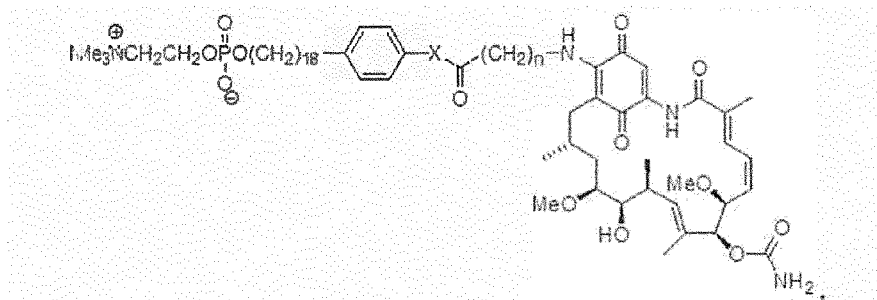


Conjugados geldanamicina-CLR1404

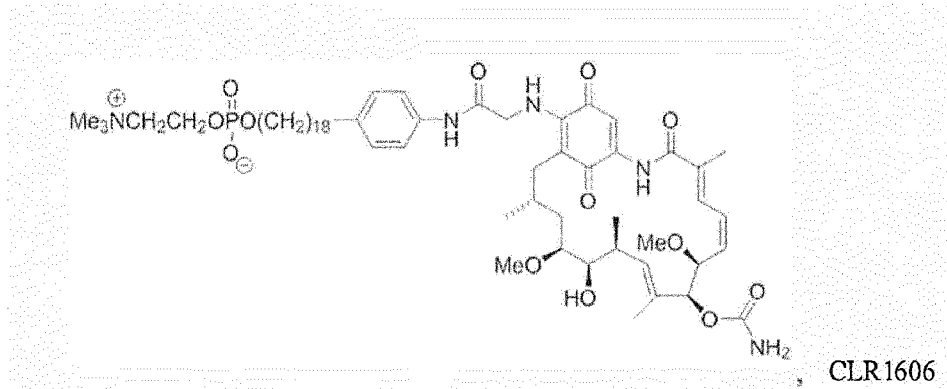
10 En una realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es geldanamicina enlazada directamente al compuesto central CLR1404.



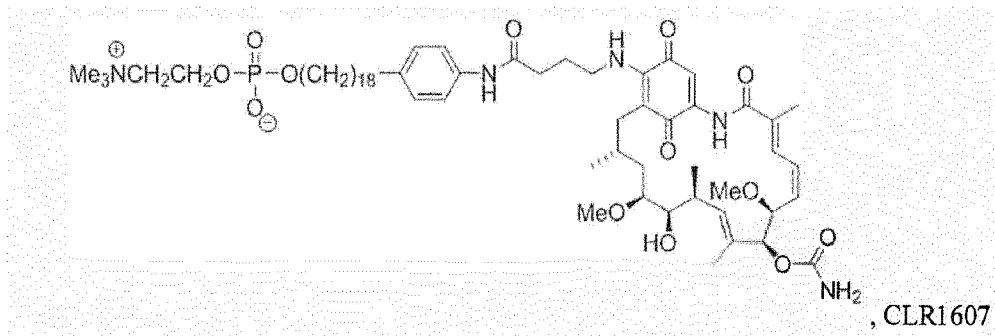
15 En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es geldanamicina enlazada al compuesto central CLR1404 mediante un enlazador de aminoácidos corto, en donde el enlazador de aminoácidos está conectado al compuesto central CLR1404 mediante un enlace carbonato o carbamato y a la geldanamicina mediante un enlace amida,



20 En una realización preferida de la presente invención, el compuesto terapéutico es geldanamicina enlazada al compuesto central CLR1404 mediante un enlazador aminobutiramida, en donde el enlazador aminobutiramida está conectado al compuesto central CLR1404 mediante un enlace carbamato y a la geldanamicina mediante un enlace amida:



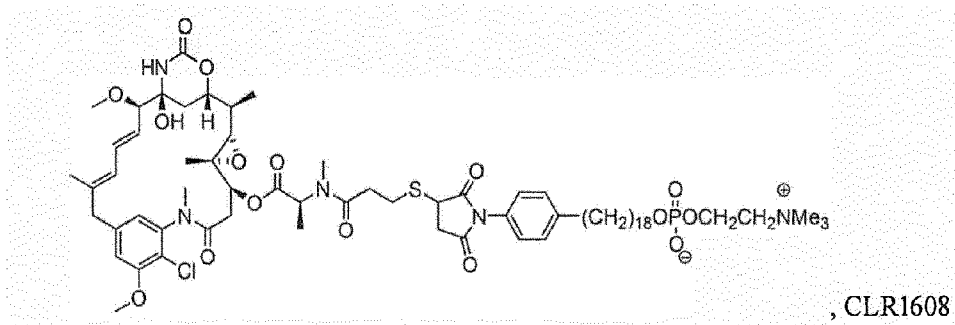
conjugado y



conjugado.

5 Conjugados mertansina-CLR1404

En otra realización de la presente invención, el compuesto terapéutico es mertansina enlazada al compuesto central CLR1404 mediante un enlazador maleimida, en donde el enlazador maleimida está unido al compuesto central CLR1404 mediante un enlace amida y a mertansina mediante un enlace carbono-azufre,

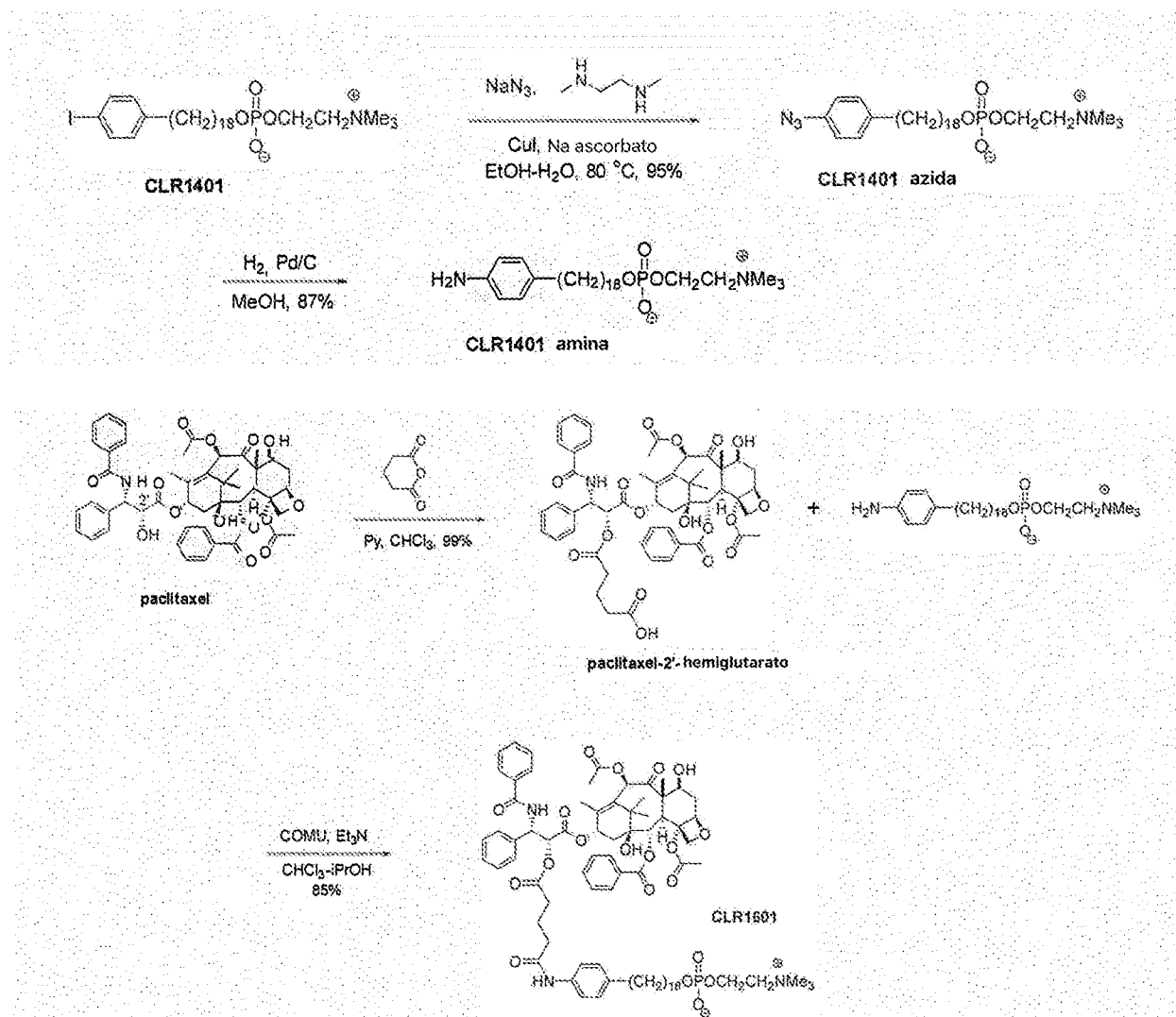


10 conjugado.

Para todas las realizaciones representativas, n es un número entero de 2 a 6 y Xi es O o NH.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de Conjugados



I. Síntesis de CLR1601

A. Síntesis de azida CLR1401

- 5 Se disolvieron 18-(*p*-yodofenil)octadecilfosfocolina (4.01 g, 6.3 mmol), azida sódica (818 mg, 12.6 mmol) y ascorbato sódico (140 mg, 0.71 mmol) en la mezcla de etanol desgasificado (28 ml) y agua (12 ml) en el recipiente de reacción. A la mezcla de reacción se le añadieron yoduro de cobre (1) (120 mg, 0.63 mmol) y N,N'-dimetiletilendiamina (0.1 ml, 0.94 mmol). El recipiente de reacción se cerró herméticamente y la mezcla se agitó a 80 °C durante 45 min. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua (60 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos al aire libre. La mezcla se transfirió al embudo de decantación, se añadieron cloroformo (80 ml) y metanol (52 ml) y se realizó la extracción mediante agitación. Se eliminó la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 x 80 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se lavaron con HCl 0.01 N, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en cloroformo (4 ml) y se añadió lentamente acetona (170 ml) con agitación. La mezcla se agitó durante 30 min y se filtró. El producto se enjuagó sobre el filtro con acetona y se secó a alto vacío para dar 3.31 g (95%) de 18-(*p*-azidofenil)octadecilfosfocolina.

B. Síntesis de la amina CLR1401

- 20 Se colocó 18-(*p*-azidofenil)octadecilfosfocolina (3.116 g) en una botella de presión Parr, se añadieron metanol (30 ml) y catalizador Pd al 10%/C (100 mg). La reacción de hidrogenación se realizó bajo presión de hidrógeno (55 psi) con agitación durante 24 h. Se despresurizó la botella, se añadieron cloroformo y metanol para disolver algo del producto de reacción precipitado y la mezcla se filtró para eliminar el catalizador. El filtrado se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla caliente de cloroformo-metanol (1:1) (10 ml). Se añadió lentamente acetona caliente (150 ml) con agitación, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente con agitación y se filtró. El producto se enjuagó sobre el filtro con acetona y se secó a alto vacío. Rendimiento de 18-(*p*-aminofenil)octadecilfosfocolina: 2.597 g (87%).

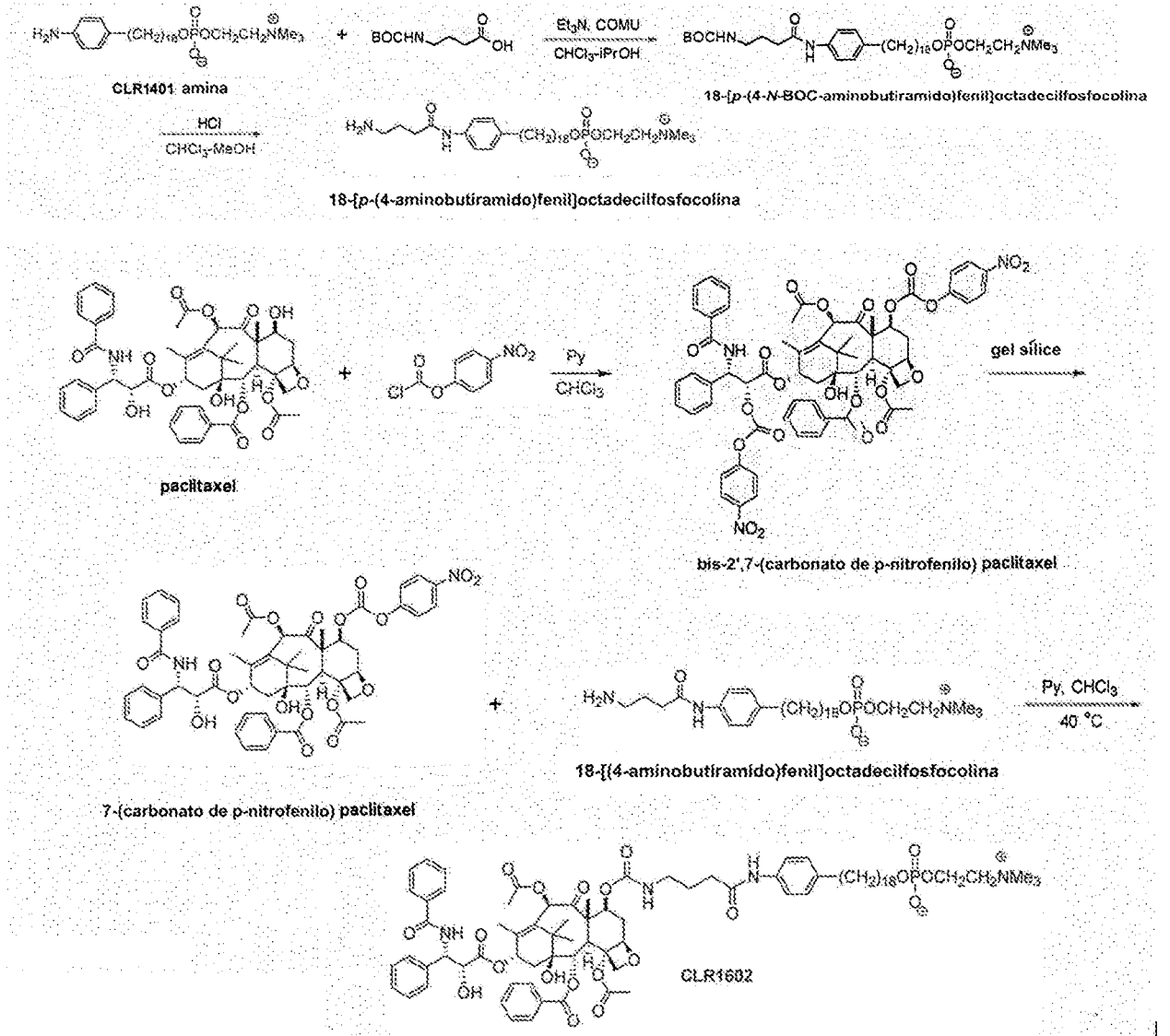
C. Síntesis de paclitaxel-2'-hemiglutarato

Se disolvieron paclitaxel (404 mg, 0.437 mmol) y anhídrido glutárico (67 mg, 0.588 mmol) en cloroformo (8 ml) y se añadió piridina (0.5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y se evaporó hasta sequedad. El residuo se mantuvo a alto vacío durante 1.5 h para eliminar la piridina residual. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en cloroformo-metanol (gradiente de 98:2 a 95:5) para producir 452 mg (99%) de paclitaxel-2'-hemiglutarato.

D. Síntesis de CLR1601

Se suspendieron paclitaxel-2'-hemiglutarato (947 mg, 0.978 mmol) y 18-(p-aminofenil)octadecilfosfocolina (492 mg, 0.934 mmol) en una mezcla de cloroformo (40 ml) e isopropanol (1.2 ml). A esta suspensión se le añadieron trimetilamina (0.27 ml, 1.957 mmol) y COMU (419 mg, 0.978 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, momento en el que se volvió transparente y homogénea. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación y se mezcló con cloroformo (40 ml), metanol (80 ml) y agua fría (72 ml). Se eliminó la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 x 80 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo restante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:4). Después de la evaporación del disolvente, el producto se secó a alto vacío para dar 1.167 g (85%) de CLR1601.

II. Síntesis de CLR1602



20 A. Síntesis de 18-[p-(4-N-BOC-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina

Se suspendieron 18-(*p*-aminofenil)octadecilfosfocolina (76 mg, 0.144 mmol) y ácido 4-N-BOC-aminobutírico (38 mg, 0.188 mmol) en cloroformo (5 ml) e isopropanol (0.15 ml), se añadió luego trietilamina (0.05 ml, 0.38 mmol) seguido de COMU (80 mg, 0.188 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y se inactivó con 2 ml de solución acuosa saturada de NaHCO₃. La mezcla de reacción apagada se transfirió a un embudo de separación y se mezcló con cloroformo (35 ml), metanol (40 ml) y agua fría (36 ml). Se eliminó la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 x 40 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:4). Después de la evaporación del disolvente, el producto se disolvió en una mezcla caliente de cloroformo-metanol (1.5 ml) y se precipitó con acetona. El producto se recogió mediante filtración y secado a alto vacío para dar un polvo blanco (100 mg, 97%).

B. Síntesis de 18-[*p*-(4-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina

Se disolvió 18-[(4-*N*-BOC-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina (98 mg, 0.138 mmol) en una mezcla de cloroformo (4 ml), metanol (2 ml) y HCl concentrado (0.2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se inactivó mediante adición lenta de la solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 ml). La mezcla de reacción apagada se transfirió a un embudo de separación y se mezcló con cloroformo (40 ml), metanol (40 ml) y agua fría (36 ml). Se eliminó la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 x 40 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (100:65) seguido de elución final con cloroformo-metanol-cono. NH₄OH(ac) (100:65:15). Después de la evaporación del disolvente, el producto se secó a alto vacío para proporcionar 50 mg (60%) de 18-[*p*-(4-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina.

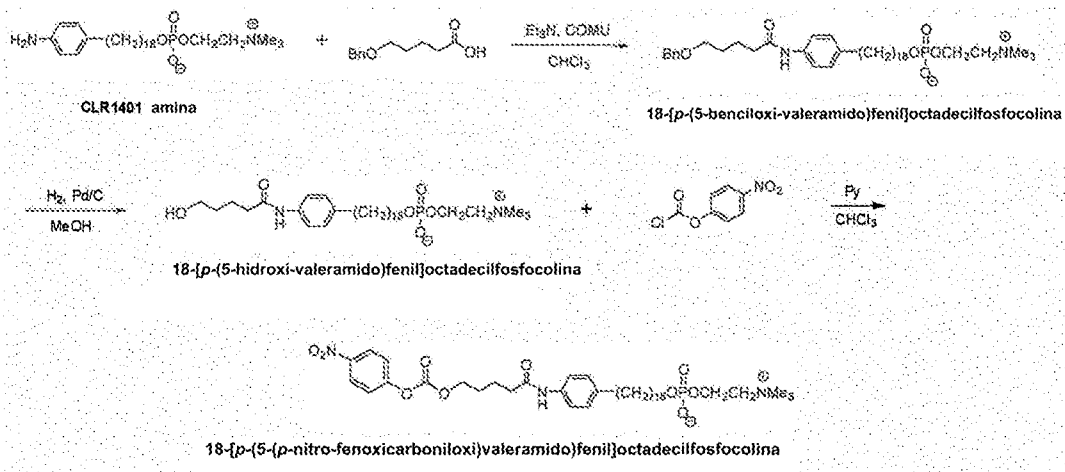
C. Síntesis de paclitaxel de 7-(carbonato de *p*-nitrofenilo)

Se disolvió paclitaxel (100 mg, 0.117 mmol) en cloroformo (4.5 ml), se añadieron 8 gotas de piridina y la solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió en una porción clorofornio de *p*-nitrofenilo sólido (200 mg, 1 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h, luego se inactivó con agua (1 ml) y se agitó durante 15 min. La mezcla se extrajo con cloroformo, el extracto se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió paclitaxel de bis-2',7-(carbonato de *p*-nitrofenilo) bruto en cloroformo y se cargó en la columna de gel de sílice. El producto crudo se dejó en la columna durante 72 h para completar la hidrólisis del carbonato de *p*-nitrofenilo en la posición 2'. La columna se eluyó con diclorometano - acetato de etilo (gradiente de 98:2 a 90:10). Después de la evaporación del disolvente, el producto se precipitó con hexano y se secó a alto vacío para proporcionar 63 mg (53%) de paclitaxel de 7-(carbonato de *p*-nitrofenilo). Véase. Arpicco S., et al., Int J Pharm, 2013, 454, 653-659.

D. Síntesis de CLR1602

Se suspendieron 7-(carbonato de *p*-nitrofenilo) paclitaxel (53 mg, 0.052 mmol) y 18-[*p*-(4-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina (47 mg, 0.077 mmol) en cloroformo (2 ml) y piridina (0.5 ml) y se agitó a 40 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:4). Después de la evaporación del disolvente, el compuesto se secó a alto vacío para dar 67 mg (86%) de CLR1602 sólido.

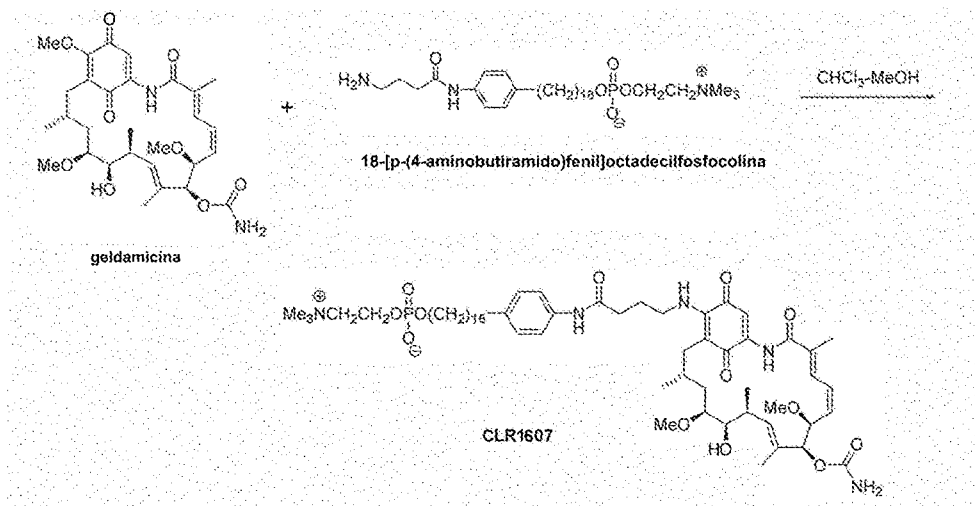
III. Síntesis de CLR1603



40

cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:2) y (65:25:4). La evaporación del disolvente y el secado a alto vacío proporcionaron CLR1603 (50 mg, 62%).

IV. Síntesis de CLR1607

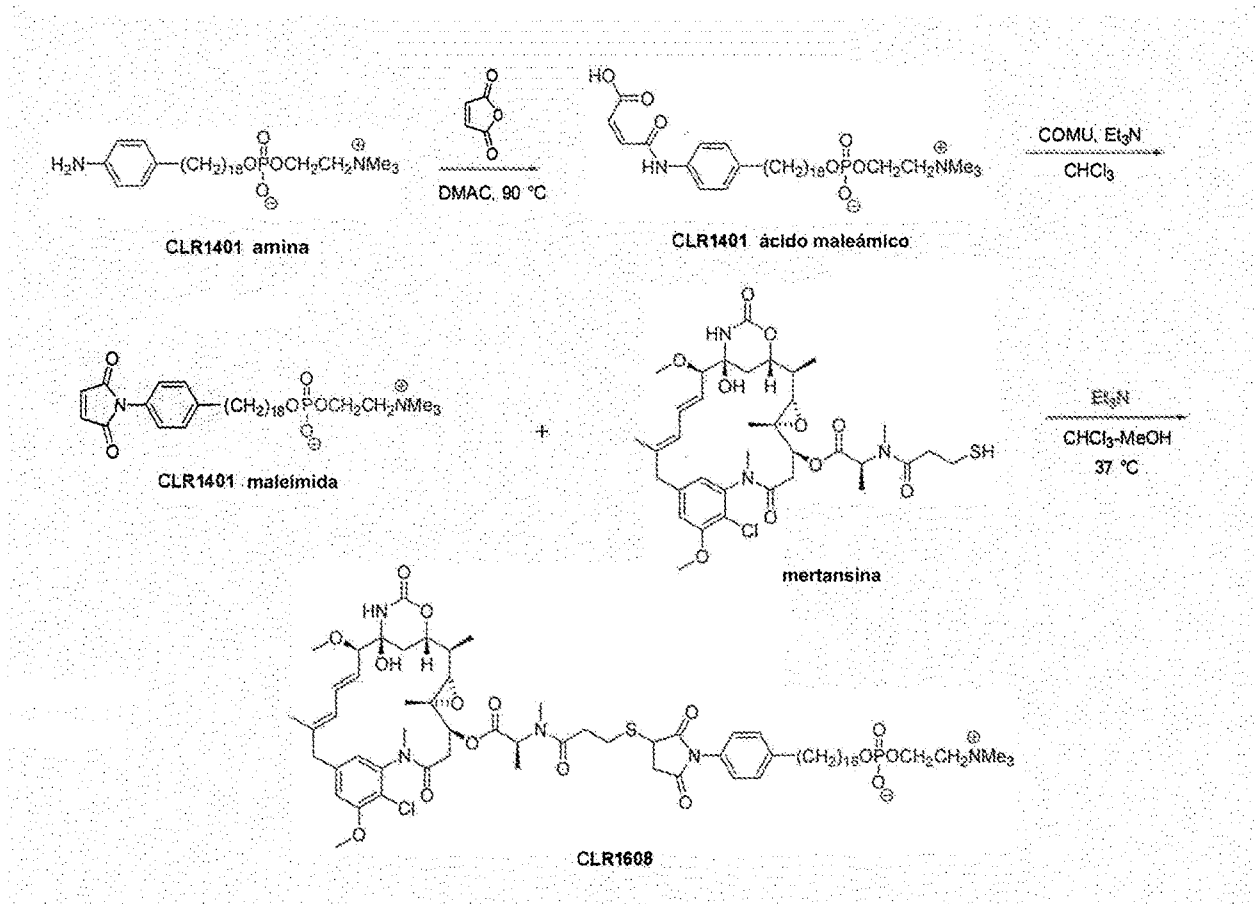


- 5 Se disolvieron geldanamicina (111 mg, 0.198 mmol) y 18-[p-(4-aminobutiramido)fenil]octadecilfosfocolina (110 mg, 0.18 mmol) en cloroformo (3.5 ml) y metanol (1 ml). Se añadió una gota de trietilamina y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La TLC mostró aproximadamente 80% de finalización de la reacción. Se añadió más geldanamicina (10 mg) y se continuó la agitación durante otras 24 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de la elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:2), (65:25:3) y (65:25:4). Después de la evaporación del disolvente y el secado a alto vacío, se añadió acetona y la mezcla se evaporó. CLR1607 se obtuvo como un sólido de color púrpura (174 mg, 85%).

La identidad de cada producto aislado fue confirmada por ^1H -nmr y análisis espectral de masas.

- 15 Los ejemplos 2 a 8 exhiben la capacidad de CLR1404 y moléculas relacionadas de ser secuestradas y retenidas por diversos tipos de cáncer mientras se eliminan simultáneamente del tejido sano.

V. Síntesis de CLR1608



A. Síntesis de ácido maleámico CLR1401

Se disolvió amina CLR1401 (300 mg, 0.57 mmol) en N,N-dimetilacetamida (12 ml) a 90°C y se añadió anhídrido maleico (61 mg, 0.627 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 1 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. Se añadió lentamente acetona (25 ml) con agitación y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El producto precipitado se filtró y se enjuagó sobre el filtro con acetona, después se secó a alto vacío. Producir: 327 mg (92%).

B. Síntesis de maleimida CLR1401

Se suspendió ácido maleámico CLR1401 (100 mg, 0.16 mmol) en cloroformo sin etanol (5 ml), luego se añadieron trietilamina (0.05 ml, 0.352 mmol) y COMU (75 mg, 0.176 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h, luego se transfirió a un embudo de separación y se mezcló con cloroformo (40 ml), metanol (40 ml) y agua fría (36 ml). Se eliminó la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 x 40 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo restante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:4). Después de la evaporación del disolvente, el producto se precipitó con acetona, se recogió y se secó a alto vacío para dar 87 mg (90%) de maleimida CLR1401.

C. Síntesis de CLR1608

Se disolvieron maleimida CLR1401 (40 mg, 0.066 mmol) y mertansina (53 mg, 0.072 mmol) en la mezcla de cloroformo (1.7 ml) y metanol (0.3 ml). Se añadió trietilamina (0.08 ml) y la mezcla se agitó a 37°C durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (gradiente de 9:1 a 5:5) seguido de elución final con cloroformo-metanol-agua (65:25:3). Después de la evaporación del disolvente, el producto se secó a alto vacío para dar 62 mg (70%) de CLR1608.

Ejemplo 2: CLR1501 es secuestrado preferentemente por células cancerosas a través de balsas lipídicas

Materiales y métodos:

Las células PC-3 se trataron previamente con 2 µg/ml de filipina III o vehículo durante 15 minutos, luego se lavaron y se incubaron con 2 µCi de ¹²⁵I-CLR1404 durante 1 h. Se eliminó el medio y las células se lavaron con solución salina

tamponada con fosfato que contenía albúmina sérica bovina al 0.1%, se tripsinizaron y luego se dividieron en dos muestras para determinar el número de células por el contenido de ADN (A_{280} en comparación con una curva estándar específica de línea celular) y recuentos por minuto utilizando un contador gamma (Perkin Elmer).

Resultados:

- 5 El tratamiento previo de las células PC-3 con filipina III, un agente que secuestra el colesterol y altera las balsas lipídicas, dio como resultado casi 40% menos de absorción de ^{125}I -CLR1404 en comparación con células de control no tratadas (Fig. 1). Esto respalda la hipótesis de que CLR1404 utiliza balsas de lípidos como portales de entrada a las células cancerosas. En particular, las concentraciones más altas de filipina III son citotóxicas y, por lo tanto, no se pudo demostrar la ablación completa de la balsa lipídica (y presumiblemente la inhibición completa de la captación del análogo CLR1404).

Ejemplo 3: Captación preferencial de CLR-1501 por células cancerosas sobre células sanas

Materiales y métodos:

- 15 Las líneas celulares de cáncer humano se adquirieron de la Colección de Cultivos Tipo Estadounidense (ATCC). Incluyeron lo siguiente: Caki-2 (renal; carcinoma de células claras), HCT-116 (carcinoma colorrectal); MES-SA/Dx5 (sarcoma uterino) [todos mantenidos en medio McCoy's 5a suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %], Ovcar-3 (adenocarcinoma de ovario) [mantenido en medio RPMI suplementado con SFB al 20 %], U87-MG (glioma) [mantenido en medio esencial mínimo suplementado con 10% FBS], Mia Paca-2 (carcinoma de páncreas) (mantenido en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% FBS), PC-3 (carcinoma de próstata) (mantenido en F- Medio 12K suplementado con FBS al 10%), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de glándula mamaria triple negativo) (mantenido en medio de Leibovitz suplementado con FBS al 10%) y A549 (carcinoma de pulmón de células no pequeñas) (mantenido en medio F-12 medio suplementado con 10% de FBS). Se adquirieron fibroblastos de piel humana normal de ATCC y se cultivaron en medio basal para fibroblastos PCS-201-030 complementado con un kit sin suero (Kit de Crecimiento de Fibroblastos, Sin Suero PCS-201-040). Todos los medios (excepto la línea celular MDA-MB-231) también contenían penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se mantuvieron a 37°C con 5% de CO_2 en aire.

- 20 Todas las células se mantuvieron a 37 °C en un medio apropiado suplementado con 10% de FBS y 5% de CO_2 . Antes de obtener imágenes, las células se retiraron de los matraces con tripsina al 0.25% y se dejaron crecer durante la noche en los microportaobjetos VI (Ibidi). Al día siguiente, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con 5 o 7.5 μM (como se indica) de CLR1501 en un medio sin suero apropiado durante 24 horas. CLR1501 es un análogo de CLR1404 marcado con fluorescencia. CLR1501 se formuló con 0.4% de polisorbato 20, 2% de etanol y solución salina. Después de lavar a fondo con PBS, se tomaron imágenes de las células usando un microscopio confocal multifotónico/de escaneo láser Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow usando un tiempo de exposición de 1-s. Alternativamente, las células se visualizaron utilizando un microscopio confocal Nikon A1R (Keck Laboratory, University of Wisconsin-Madison). La señal de emisión de CLR1501 se detectó utilizando filtros Alexa Fluor 488 (ex/em 480/520 nm).

Resultados:

- 35 CLR1501 se administró a cinco líneas celulares de cáncer diferentes (riñón, ovario, páncreas, melanoma y próstata) y a una línea de fibroblastos de piel humana normal *in vitro*. Veinticuatro horas después, CLR1501 mostró una captación preferencial de cinco a nueve veces mayor en estas líneas celulares cancerosas *in vitro* en comparación con los fibroblastos normales (Fig. 2). El CLR1501 retenido se asoció con membranas plasmáticas y de orgánulos.

Ejemplo de modelo de glioma de 4 ratas

- 45 Materiales y métodos: Todos los animales fueron alojados y manipulados de acuerdo con las pautas de University of Wisconsin Research Animal Resources Center. Se propagaron células de glioma C6 de rata en medio DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con FBS al 10% inactivado por calor (BioWhittaker, Walkersville, MD), penicilina G 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y HEPES 0.01 M (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La implantación del tumor intracraneal se realizó como se describió anteriormente. Cohen JD, et al., Intracranial C6 glioma model in adult Wistar-Furth rats. J Neuro Oncol 1990 8(1):95-6. Brevemente, 1×10^6 células C6 se resuspendieron en 5 ml de metilcelulosa al 1.2 % y se inyectaron en los lóbulos frontales de ratas Wistar hembra anestesiadas (Harlan, Indianápolis, IN). Los animales operados de forma simulada recibieron inyecciones intracraneales de un volumen igual de metilcelulosa sin células tumorales.

- 50 Estudios de formación de imágenes: Diez días después de la implantación, se confirmó mediante MRI la presencia de tumores intracraneales. Brevemente, las ratas anestesiadas (6) recibieron 2 ml de gadodiamida (Gd, Omniscan 287 mg/ml, Nycomed, Princeton, NJ) por vía intraperitoneal y se tomaron imágenes 10 minutos después utilizando un sistema de MR clínica de 1.5 Tesla (GE Signa LX) y una bobina extrema de matriz en fase GE. Se inspeccionaron las secuencias multicorte ponderadas en T1 (TR = 500 ms, TE = 16.5 ms) que cubrían todo el cerebro de cada rata para seleccionar ratas portadoras de tumores con diferentes tamaños de tumores y ratas operadas de forma simulada para inyecciones de NM404.

NM404 [18-(4-yodofenil)-octadecilfosfocolina] (100 mg) se radiyodó con ^{125}I mediante intercambio isotópico con Na^{125}I en una fusión de ácido píválico. Weichert et al. Int J Appl Rad Isotopes. 1986; 37:907-913. NM404 tiene la misma estructura química que CLR1404 excepto que está radiyodado con ^{125}I en lugar de ^{124}I o ^{131}I . Después de la purificación por HPLC, se disolvió NM404 en una solución acuosa de polisorbato 20 al 2 % antes de la inyección en la vena de la cola (5-20 $\mu\text{Ci}/200$ g de rata) en cuatro ratas portadoras de tumores y tres ratas operadas de forma simulada. A los 1 (n = 1), 2 (n = 1) y 4 (n = 2) días después de la inyección de NM404, los animales se sacrificaron (CO_2) y los cerebros se extirparon y se tomaron imágenes en un escáner de radio-TLC Bioscan AR2000 modificado (incrementos de 1 mm en 2 minutos de adquisición/carril y colimador de alta resolución de 1 mm). Además, se pesaron los tejidos normales del cerebro, la sangre, los riñones, el hígado, el bazo, la tiroides y los tumores, y se contó la radioactividad en un contador gamma. Luego se correlacionó la distribución tisular de la radiactividad con la histología cerebral.

Resultados y discusión: Los resultados iniciales de las imágenes con NM404 indicaron una captación llamativa y una retención prolongada en todos los gliomas con un diámetro de 3-5 mm. La radioactividad en el tejido cerebral normal fue mínima en los animales de control operados de forma simulada (Fig. 4A y 4B), mientras que NM404 se concentró intensamente en los gliomas (Fig. 4A'-D'). Las proporciones de tumor a cerebro (% de dosis inyectada/g) en ratas portadoras de glioma C6 fueron 10.5, 12.2 y 6.7 a las 24, 48 y 96 h, respectivamente. Como se ha observado en cultivos celulares anteriores y en estudios de modelos animales *in vivo*, NM404 aparentemente se metaboliza y elimina de las células normales, pero queda metabólicamente atrapado en las membranas de las células tumorales. Experimentos de autorradiografía anteriores en otros modelos tumorales han sugerido que sólo las células tumorales viables, y no el tejido normal o los tejidos necróticos, son capaces de acumular NM404. Curiosamente, también se detectaron tumores pequeños que medían unos pocos mm de diámetro después de la administración de NM404. Estos hallazgos preliminares sugieren que CLR1404 también puede ser útil para la visualización de pequeños focos tumorales invasivos.

Conclusión:

Como ha sido el caso en todos los modelos de tumores examinados anteriormente, NM404 mostró una retención selectiva y prolongada en los gliomas C6 de rata evaluados en este estudio.

Ejemplo 5-Captación de ^{124}I -CLR1404 en diversos tumores malignos

Materiales y métodos:

Todos los estudios con animales descritos se realizaron de acuerdo con los protocolos para animales aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee. Se utilizaron ratones desnudos atímicos hembra (Hsd:ATHymic Nude-Foxn1nu o Crl:NU-Foxn1nu, Charles River Laboratories) de aproximadamente 4 a 5 semanas de edad, de 16 a 18 g (n = 6), para estudios de xenoinjertos de tumores humanos. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se les inyectaron por vía subcutánea células tumorales viables en 100 μl de PBS de Dulbecco (o, para células de glioma, 50 ml de PBS) en el flanco derecho. Los tamaños de inóculo fueron 1×10^6 (para modelos renal, ovárico, glioma, páncreas, próstata y NSCLC), 2×10^6 (para modelos colorrectales y uterinos), o 3×10^6 (mama).

Resultados:

Se probó ^{124}I -CLR1404 radiyodado en xenoinjertos subcutáneos y ortotópicos de 60 diferentes líneas celulares malignas y tipos de tumores espontáneos, transgénicos, humanos y de roedores. Después de la administración intravenosa, ^{124}I -CLR1404 se localiza en casi todos los tumores malignos primarios y metastásicos, independientemente de su ubicación anatómica. Ejemplos representativos son tumores tanto humanos (Fig. 5A-5I) como de roedores (Fig. 5J-M).

Tabla 1. Captación de ^{124}I -CLR1404 en una amplia gama de tipos de cáncer

	Modelo tumoral	Especies	Categoría	Captación*
1	Próstata PC-3	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
2	Pulmón A-549 (NSCLC)	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
3	Pulmón NCI H-69 (célula de avena)	Ratón SCID	Carcinoma de células pequeñas	Sí
4	Suprarrenal H-295	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
5	Suprarrenal RL-251	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
6	Colón-51	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
7	Colón LSI 80	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí

ES 2 978 534 T3

8	Colón DLD1	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
9	Colón HT-29	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
10	Colón LS-180	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
11	Glioblastoma U87	Ratón desnudo y NOD-SCID	Glioma	Sí
12	Melanoma A-375	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
13	Mieloma múltiple MM.1S	Ratón desnudo	Mieloma	Sí
14	Neuroblastoma SK-N-AS	Ratón desnudo	Neuroblastoma	Sí
15	Neuroblastoma NB1691	Ratón desnudo	Neuroblastoma	Sí
16	Neuroblastoma CHLA-20	Ratón desnudo	Neuroblastoma	Sí
17	Neuroblastoma Lan5	Ratón desnudo	Neuroblastoma	Sí
18	HTB-77 ovárico	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
19	Ovcar-3 ovárico	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
20	BXPC3 pancreático	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
21	Mia Paca-2 pancreática	Ratón desnudo	Carcinoma	Sí
22	Capan-1 pancreático	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
23	Caki-2 célula renal	Ratón desnudo (ortotópico)	Carcinoma de células claras	Sí
24	ACHN célula renal	Ratón desnudo (ortotópico)	Adenocarcinoma	Sí
25	Sarcoma (Meth-A)	Ratón desnudo	Fibrosarcoma	Sí
26	Cabeza y cuello SCC1	Ratón desnudo	Carcinoma de células escamosas	Sí
27	Cabeza y cuello SCC6	Ratón desnudo	Carcinoma de células escamosas	Sí
28	LNCap de próstata	Ratón	Adenocarcinoma	Sí
29	LuCap de próstata	Ratón	Adenocarcinoma	Sí
30	Mama MCF-7	Rata	Adenocarcinoma	Sí
31	Mama triple negativa MDA-MB231	Ratón desnudo	Adenocarcinoma	Sí
32	MES SA/Dx5 uterino	Ratón desnudo	Sarcoma	Sí
33	Glioblastoma 22 GSC	Ratón NOD-SCID (ortotópico)	Glioma	Sí
34	Glioblastoma 105 GSC	Ratón NOD-SCID (ortotópico)	Glioma	Sí
35	Mama 4T1	Ratón endógeno (ortotópico)	Adenocarcinoma	Sí
36	Vejiga SY40	Ratón (ortotópico)	Adenocarcinoma	Sí
37	MatLyLu de próstata	Rata	Adenocarcinoma	Sí
38	Walker256	Rata	Carcinosarcoma	Sí
39	Próstata TR.AMP	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí

40	Colón CT26	Ratón SCID	Adenocarcinoma	Sí
41	Cólon Pirc	Rata Pirc autóctona	Adenocarcinoma	Sí
42	Intestinal de ratón mínimo	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
43	Melanoma	Ratón	Adenocarcinoma	Sí
44	CCE mamario	<i>ApcMin/+</i> ratón	Carcinoma de células escamosas	Sí
45	AC mamaria	<i>ApcMin/+</i> ratón	Adenocarcinoma	Sí
46	Carcinoma hepatocelular	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
47	Glioma L9	Xenoinjerto de rata	Glioma	Sí
48	GliomaC6	Xenoinjerto de rata	Glioma	Sí
49	GliomaCNSI	Xenoinjerto de rata	Glioma	Sí
50	GliomaRG2	Xenoinjerto de rata	Glioma	Sí
51	Retinoblastoma	Ratón endógeno	Blastoma	Sí
52	c-myc pancreático	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
53	Kras pancreático	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
54	VPH cervical	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
55	Esofágico	Ratón endógeno	Adenocarcinoma	Sí
56	Pólipo intestinal	Ratón endógeno	Adenoma (benigno)	No
57	Hiperplasia alveolar mamaria	Ratón endógeno	Hiperplasia (benigna)	No
58	Hepatoma Hep-3B	Ratón desnudo	Carcinoma	No
59	Hepatoma Hep-G2	Ratón desnudo	Carcinoma	No
60	Adenoma de colon de rata Pirc	Rata pirc	Adenoma	No

*La captación del tumor se consideró positiva si la proporción tumor-músculo era superior a 3. La relación tumor:músculo menor o igual a 2 se consideró negativa.

Ejemplo 6: ensayo clínico que evalúa pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC") utilizando CLR1404

5 Aunque CLR1404 ha mostrado una retención tumoral selectiva y prolongada en modelos de xenoinjerto 55/60 y de roedores espontáneos, un IND patrocinado por un médico inició una evaluación clínica del agente en pacientes con NSCLC humano en Etapa 4 para determinar si exhibiría o no propiedades similares de captación y retención de tumores en humanos. Hasta la fecha, se tomaron imágenes de dos pacientes con NSCLC avanzado después de una inyección de <1 mCi de ¹³¹I-CLR1404. Se recogieron muestras de sangre y orina en momentos predeterminados y se realizaron imágenes gamma en varios momentos después de la administración. En ambos pacientes, se demostró una captación y retención tumoral significativa de CLR1404 en el tumor pulmonar primario, como se ve en la Fig. 6. En relación con los valores elevados de absorción hepática observados anteriormente con su predecesor de primera generación, NM324, la actividad hepática y abdominal son mucho más bajas con CLR1404, lo que sugiere la viabilidad de evaluar este agente en otros cánceres abdominales, incluidos el de páncreas, colon y próstata.

15 Materiales y métodos: Después de la inyección intravenosa de CLR1404 marcado con yodo-131 (1 mCi/20 µg), los pacientes con NSCLC avanzado se escanearon a las 3, 6, 24, 48, 96 horas, a los 7 y 11 días en un escáner SPECT

de doble cabezal GE Maxxus. Se recogieron muestras de sangre y orina para análisis farmacocinéticos, así como bioanálisis clínico hematológico, renal y hepático.

5 Resultados: Los resultados iniciales de imágenes cualitativas indican que CLR1404 marcado con yodo-131 se localiza claramente en masas pulmonares bilaterales tan pronto como 24 h después de la inyección y se retiene selectivamente en estos tumores durante más de 11 días. Además, la radiactividad de fondo en el hígado y la región abdominal inferior, incluida la vejiga urinaria, los riñones y los intestinos, fue significativamente menor que la observada anteriormente con su predecesor, NM324. No se observaron reacciones adversas en ninguno de los pacientes.

10 Conclusiones: Estos hallazgos preliminares sugieren que CLR1404 exhibe propiedades de captación y retención de tumores en el NSCLC humano similares a las observadas anteriormente en modelos de roedores. Aunque en este momento se basa solo en dos pacientes, parece que CLR1404 efectivamente se localiza y sufre una retención tumoral selectiva y prolongada en el cáncer de pulmón de células no pequeñas humano.

Paciente 1: Varón de 55 años con NSCLC bilateral de 3 cm en lóbulo izquierdo y lóbulo derecho infiltrativo y metástasis cerebral y una pequeña masa suprarrenal derecha. Ha participado en numerosos regímenes de tratamiento estándar y experimentales. Las imágenes se muestran en las Fig. 6A-C.

15 Paciente 2: Varón de 70 años diagnosticado recientemente con carcinoma de pulmón de células no pequeñas de lóbulo superior de 6 cm, masa hepática de 5 cm, metástasis en hueso ilíaco y metástasis cerebral muy pequeña. Recientemente había completado quimioterapia en dosis bajas de carboplatino/taxol y radioterapia paliativa en las metástasis ilíacas y cerebrales la semana anterior a iniciar el ensayo CLR1404. Las imágenes se muestran en las Fig. 6D-G.

20 Ejemplo 7-Detección de 3 metástasis de tumores cerebrales previamente desconocidas en pacientes con NSCLC usando ¹²⁴I-CLR1404

Materiales y métodos:

25 Se adquirieron exploraciones cerebrales PET humanas en un escáner PET/CT de 64 cortes (Discovery VCT, General Electric) en múltiples momentos después de la inyección de aproximadamente 5 mCi de ¹²⁴I-CLR1404 usando una secuencia de adquisición dinámica de 90 minutos (2D, nueve cuadros de 10 minutos cada uno, modo de lista VIP activado) y reconstruido [Advantage Workstation versión AW4.4, General Electric, 30 cm DFOV (campo de visión de visualización), 128 × 128, OSEM VUE Point, 10 subconjuntos con dos iteraciones, eje z estándar, corrección de atenuación y tiempo muerto, corrección de dispersión y caída].

Resultados:

30 Se obtuvieron resultados preliminares en un paciente con NSCLC sin síntomas neurológicos utilizando ¹²⁴I-CLR1404 PET/TC. Las imágenes revelaron tres lesiones cerebrales previamente desconocidas altamente sospechosas de metástasis que se confirmaron posteriormente con MRI mejorada con gadolinio (Fig. 7).

Ejemplo 8-Detección de recurrencia tumoral de una metástasis falcina frontal derecha utilizando ¹²⁴I-CLR1404

35 Metástasis cerebral recurrente en mujer de 60 años con melanoma maligno. La resonancia magnética ("MR") (Fig. 8A) y las imágenes PET con ¹²⁴I-CLR1404 (Fig. 8B) y las imágenes 8 meses después de la radiocirugía estereotáxica para la recurrencia del tumor de una metástasis falcina frontal derecha (Fig. 8C) muestran un foco de actividad anormal con CLR1404 (flecha). El correspondiente aumento del enfoque en la MR inicial se interpretó como necrosis por radiación versus posible recurrencia. Las imágenes de MR posteriores mostraron un aumento adicional en el tamaño de la lesión realzada inespecífica, junto con un aumento del edema perilesional que indica una recurrencia del tumor maligno. Estos resultados indican que ¹²⁴I-CLR1404 fue secuestrado por células cancerosas que eran resistentes a la radiocirugía y finalmente establecieron un tumor recurrente.

40 Los compuestos de la presente invención incluyen fármacos anticancerígenos unidos a la molécula central CLR1404. Estos compuestos son capaces de atacar células cancerosas y células madre cancerosas, incluyendo células cancerosas del cerebro, de modo que la célula cancerosa secuestra y retiene el fármaco contra el cáncer. Estos compuestos proporcionan el primer tratamiento dirigido contra el cáncer capaz de adaptarse para administrar específicamente una variedad de fármacos contra el cáncer a las células cancerosas para tratar el cáncer y prevenir la metástasis y la recurrencia.

Ejemplo de conjugados de 9-paclitaxel e IC50 para diversas líneas celulares cancerosas

Método

50 Líneas celulares cancerosas que incluyen MDA-MB-468 (mama), NCI-H1299 (pulmón), NCI-H460 (pulmón), Capan-2 (páncreas), MiaPaCa-1 (páncreas), I-iT29 (colorrectal), HCT116 (Colorrectal) y PC-3 (Próstata) se trataron con concentraciones seriadas de paclitaxel y conjugados CLR1404-paclitaxel (es decir, CLR1601, CLR1602 y CLR1603). Luego se midió la viabilidad celular de las líneas celulares y se informó como IC50 para cada tratamiento.

Resultados

5 CLR1601 y CLR1603 fueron capaces de reducir la viabilidad celular para cada uno de MDA-MB-468 (Mama), NCI-HI299 (Pulmón), NCI-H460 (Pulmón) Capan-2 (Páncreas), MiaPaCa-1 (Páncreas), HT29 (Líneas celulares de cáncer colorrectal), HCT116 (colorrectal) y PC-3 (próstata). Véase las Figuras 9-16, respectivamente. La IC50 para cada conjugado de paclitaxel-1404 (es decir, CLR1601 y CLR1603) y paclitaxel se informa en la Tabla 2. No se muestra la IC50 para CLR1602; sin embargo, CLR1602 no fue capaz de reducir significativamente la viabilidad de la línea celular cancerosa porque CLR1602 no es hidrolizable. *In vivo*, el paclitaxel libre es absorbido por las células tumorales cancerosas a un ritmo mucho menor debido a la naturaleza no específica de la absorción de paclitaxel. De este modo, *in vivo*, la cantidad de conjugado PLE-paclitaxel necesaria para la muerte de las células cancerosas debe ser igual o menor que la del paclitaxel y puede dar como resultado una toxicidad muy reducida para las células no cancerosas.

Tabla 2. IC50 para CLR1601, CLR1603 y Paclitaxel

	CLR1601	CLR1603	Paclitaxel
MDA-MB-468 (Mama)	3.77 nM	3.42 nM	1.9nM
NCI-HI1299 (pulmón)	60.3 nM	108 nM	1.82 nM
NCI-H460 (pulmón)	29.5 nM	171.1 nM	1.66 nM
Capan-2 (Páncreas)	56.7 nM	83.6 nM	7.91 nM
MiaPaCa-1 (Páncreas)	37.3 nM	38.9 nM	1.32 nM
HT29 (Colorrectal)	92.2 nM	70.6 nM	1.07 nM
HCT116 (Colorrectal)	7.6nM	11 nM	0.87 nM
PC-3 (próstata)	34.4 nM	29.5 nM	0.9nM

Ejemplo 10: ensayos de citometría de flujo

Métodos

15 Se utilizó tinción con anexina V y PI (fosfatidilinositida) mediante citometría de flujo para determinar porcentajes de células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas. En resumen, las células se trataron con agentes citotóxicos y se tiñeron con un kit de etiquetado de Anexina V/PI (Life Technologies). Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Como se muestra en las Tablas 3-9, las células se clasificaron como: Vivo (Anexina V negativo, PI negativo), Apoptótico temprano (Anexina V positivo, PI negativo), Apoptótico tardío (Anexina V positivo, PI positivo) y Necrótico (Anexina V negativo, PI positivo). En la Figura 17 se muestra un diagrama de dispersión representativo para células MDA-MB-468 tratadas con 5 μ M de CLR1601 durante 72 horas. La anexina V (adjunta a AlexaFluor 488) se muestra en el eje x, mientras que PI se muestra en el eje y. El cuadrante inferior izquierdo indica células vivas, el cuadrante superior izquierdo indica células necróticas, el cuadrante superior derecho indica células apoptóticas tardías y el cuadrante inferior derecho indica células apoptóticas tempranas. Los desechos se eliminaron de este análisis.

Resultados

30 Se trataron células MDA-MB-468, una línea celular de cáncer de mama triple negativa, con conjugados CLR (CLR1601 y CLR1603) durante 72 horas y con paclitaxel ("PTX") durante 24 horas. Ver Tabla 3. Las células MDA-MB-468 también se trataron con conjugados CLR (CLR1606 y CLR1607) durante 72 horas y con geldanamicina ("GEL") durante 48 horas. Ver Tabla 4. Para los conjugados de PTX, la viabilidad celular se redujo del 61.1% (sin tratamiento farmacológico) al 17.0%, 17.8%, 22.2%, 19.7%, 53.8% y 48.9% después del tratamiento con CLR1601 1 μ M, CLR1601 5 μ M, CLR1603 1 μ M, CLR1603 5 μ M, PTX 100 nM y PTX 1 μ M, respectivamente. Ver Tabla 3. Para los conjugados de GEL, la viabilidad celular se redujo del 61.1% al 58.8%, 42.7%, 52.7%, 56.9% y 26.2% después del tratamiento con CLR1606 1 μ M, CLR1606 10 μ M, CLR1607 1 μ M, CLR1607 10 μ M y GEL 1 μ M respectivamente. Ver Tabla 4.

35

Tabla 3. MDA-MB-468 tratado con conjugados de paclitaxel durante 72 horas

MDA-MB-468 (% del total de células)	72 horas sin fármacos	CLR1601 (1uM)	CLR1601 (5uM)	CLR1603 (1uM)	CLR1603 (5uM)	PTX (100 nM)	PTX (1uM)
Vivo	61.1	17	17.8	22.2	19.7	53.8	48.9
Necrótico	2.83	15.8	21.6	22	22.5	8.89	10.8
Apoptótico tardío	20.5	57.5	57.9	49.1	55.2	31.4	34.8
Apoptótico temprano	15.5	9.83	2.71	6.74	2.65	5.9	5.5

Tabla 4. Células MDA-MB-468 tratadas con conjugados de geldanamicina durante 72 horas

MDA-MB-468 (% del total de células)	72 horas sin fármacos	CLR1606 (1uM)	CLR1606 (10uM)	CLR1607 (1uM)	CLR1607 (10uM)	GEL (1uM)
Vivo	61.1	58.8	42.7	52.7	56.9	26.2
Necrótico	2.83	2.31	19.4	1.62	1.63	16.3
Apoptótico tardío	20.5	25.7	33.8	25.1	26.4	37.9
Apoptótico temprano	15.5	13.2	4.13	20.6	15.1	19.6

5 Se trataron células COLO 829, una línea celular de melanoma, con conjugados de GEL (CLR1606 y CLR1607) durante 72 horas y GEL durante 48 horas. Ver Tabla 5. La viabilidad celular se redujo del 80.8% (sin tratamiento farmacológico) al 70.4%, 21.1%, 67.9%, 54.3%, 32,4% y 18.6% después del tratamiento con CLR1606 1 μ M, CLR1606 10 μ M, CLR1607 1 μ M, CLR1607 10 μ M, GEL 100 nM y GEL 1 μ M, respectivamente. Ver Tabla 5.

Tabla 5. Células COLO 829 tratadas con conjugados de geldanamicina durante 72 horas

COLO 829 (% del total de células)	72 horas sin fármacos	CLR1606 (1uM)	CLR1606 (10uM)	CLR1607 (1uM)	CLR1607 (10uM)	GEL (100 nM)	GEL (1uM)
Vivo	80.8	70.4	21.1	67.9	54.3	32.4	18.6
Necrótico	1.74	1.59	28.6	2.36	16.1	4.9	6.42
Apoptótico tardío	4.18	6.7	40.1	9.05	20.9	40.8	53.7
Apoptótico temprano	13.3	21.3	10.2	20.7	8.69	21.9	21.4

10 Se trataron células PANC-1, una línea celular de cáncer de páncreas, con conjugados de GEL (CLR1606 y CLR1607) durante 72 horas y GEL durante 48 horas. Ver Tabla 6. La viabilidad celular se redujo del 44.2% (sin tratamiento farmacológico) al 42.0%, 21.5%, 44.0%, 33.0%, 23.3% y 18.9% después del tratamiento con CLR1606 1 μ M, CLR1606 10 μ M, CLR1607 1 μ M, CLR1607 10 μ M, GEL 100 nM y GEL 1 μ M, respectivamente. Ver Tabla 6.

Tabla 6. Células PANC-1 tratadas con conjugados de geldanamicina durante 72 horas

PANC-1 (% del total de células)	72 horas sin fármacos	CLR1606 (1uM)	CLR1606 (10uM)	CLR1607 (1uM)	CLR1607 (10uM)	GEL (100 nM)	GEL (1uM)
Vivo	44.2	42	21.5	44	33	23.3	18.9
Necrótico	47.9	46.8	65.3	48.1	54.7	59.4	66.4
Apoptótico tardío	5.65	8.63	12.6	4.83	9.81	12.6	12.8
Apoptótico temprano	2.23	2.59	0.63	3.1	2.43	4.68	1.93

5 Se trataron células 22RV1, una línea celular de cáncer de próstata, con conjugados de GEL (CLR1606 y CLR1607) durante 72 horas y GEL durante 48 horas. Ver Tabla 7. La viabilidad celular fue del 20.3%, 21.3%, 16.0%, 21.9%, 15.7%, 19.4% y 28.1% después del tratamiento sin fármaco, CLR1606 1 µM, CLR1606 10 µM, CLR1607 1 µM, CLR1607 10 µM, GEL 100 nM y GEL 1 µM, respectivamente. Ver Tabla 7. La muerte de las células basales se elevó con esta línea celular; las células no respondieron bien al método de recolección de células.

Tabla 7. Células 22RV1 tratadas con geldanamicina durante 72 horas

22RV1 (% del total de células)	72 horas sin fármacos	CLR1606 (1um)	CLR1606 (10uM)	CLR1607 (1uM)	CLR1607 (10uM)	GEL (100 nM)	GEL (1uM)
Vivo	20.3	21.3	16	21.9	15.7	19.4	28.1
Necrótico	49.5	51.7	57.7	55.2	59.1	47.1	46.6
Apoptótico tardío	26.2	23.4	22.9	20.7	23.1	28.4	19.1
Apoptótico temprano	4.1	3.63	3.44	2.27	2.19	5.09	6.22

10 Los conjugados CLR parecen requerir un período de tratamiento más largo con las células para inducir la muerte celular. El tratamiento de células MDA-MB-468 con CLR1601 1 µM y CLR1603 1 µM durante 48 horas dio como resultado una reducción de la viabilidad celular del 86.2 % (sin tratamiento farmacológico) al 79.4 % y 81.4 %, respectivamente. Ver Tabla 8. El tratamiento de células COLO 829 con CLR1606 1 µM y CLR1607 1 µM durante 48 horas dio como resultado una reducción de la viabilidad celular del 91.7 % (sin tratamiento farmacológico) al 90.1 % y 82.7 %, respectivamente. Ver Tabla 9.

15 Tabla 8. MDA-MB-468 tratado con conjugados de paclitaxel durante 48 horas

MDA-MB-468 (% del total de células)	48 horas sin fármacos	CLR1601 (1uM)	CLR1603 (1uM)	PTX (100 nM)	PTX (1uM)
Vivo	86.2	79.4	81.4	77.9	73.3
Necrótico	2.87	13.1	12.4	14.1	15.6
Apoptótico tardío	8.33	6	4.78	5.54	9.18
Apoptótico temprano	2.56	1.49	1.4	2.47	1.97

Tabla 9. Células COLO 829 tratadas con conjugados de geldanamicina durante 48 horas

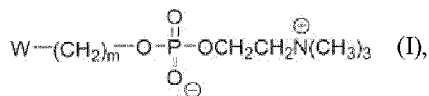
COLO 829 (% del total de células)	48 horas sin fármacos	CLR1606 (1uM)	CLR1607 (1uM)	GEL (100 nM)	GEL (1uM)
Vivo	91.7	90.1	82.7	36.1	24.6
Necrótico	5.96	6.91	8.94	22.7	22.7
Apoptótico tardío	1.67	2.2	5.54	29	38.3
Apoptótico temprano	0.72	0.79	2.77	12.2	14.4

En general, se demostró que los conjugados PLE-paclitaxel y PLE-geldanamicina son capaces de reducir la viabilidad de las células tumorales, incluyendo la inducción de la muerte celular para una variedad de tipos de tumores.

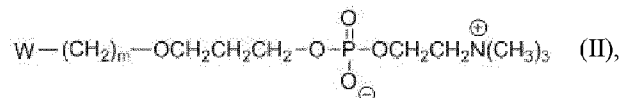
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto terapéutico que comprende la fórmula A-B-D en la que:

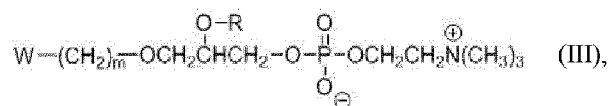
A es al menos un compuesto de fórmula (I),



5 al menos un compuesto de fórmula (II),



al menos un compuesto de fórmula (III)



o una combinación de los mismos,

10 en donde W se selecciona del grupo que consiste en un arilo, un alquilo C₁-C₆, un alqueno, un cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido y un heterocicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido, en el que R es H o un alquilo y en el que m es un número entero de 12 a 24;

B es un compuesto enlazador; y

15 D es un fármaco anticancerígeno, seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, irinotecán, topotecán, gemcitabina, cisplatino, geldanamicina y mertansina,

en donde la relación de A a D es de 1:2 a 2: 1.

2. El compuesto terapéutico de la reivindicación 1, en el que el compuesto enlazador es un enlace o un compuesto de fórmula (IV), Y-(CH₂)_n-Z (IV), en donde:

Y está unido a A;

20 Z está unido a D;

Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace, O, NH, C=O, NHSO₂O, y

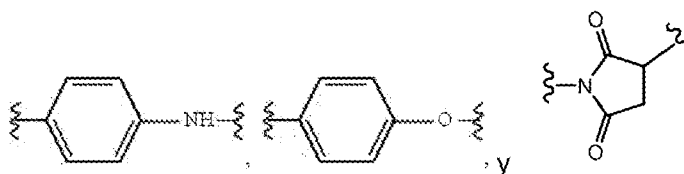
OC(=O)O;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, NH, C=O, C(=O)O, C(=O)NH, SO₂, OC(=O)OCH₂, y -S-S-; y

n es un número entero de 0 a 6.

25 3. El compuesto terapéutico de la reivindicación 1, en el que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W se selecciona del grupo que consiste en un alquilo C₁,



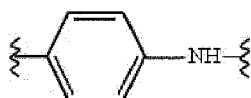
y

en donde m es 18; y

B es un compuesto enlazador seleccionado de un enlace y un compuesto de fórmula (IV), $Y-(CH_2)_n-Z$ (IV), en donde n es un número entero de 0 a 6, Y está unido a A, Z está unido a D, Y se selecciona del grupo que consiste en un enlace y C=O y Z se selecciona del grupo que consiste en de NH, C=O, C(=O)NH y C(=O)O.

5 4. El compuesto terapéutico de la reivindicación 3, en el que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



y m es 18;

B es un compuesto de fórmula (IV), en la que Y es C=O y Z es C=O, C(=O)NH o

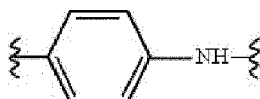
10 C(=O)O y n es 3 o 4; y

D es paclitaxel,

en donde la relación de A a D es 1: 1.

5. El compuesto terapéutico de la reivindicación 3, en el que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



15

y m es 18;

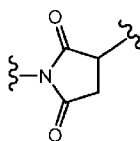
B es un enlace o un compuesto de fórmula (IV), en la que Y es C=O, Z es NH y n es 1 o 3; y

D es geldanamicina,

en donde la relación de A a D es 1: 1.

20 6. El compuesto terapéutico de la reivindicación 3, en el que:

A es un compuesto de fórmula (I), en la que W es



y m es 18;

B es un enlace; y

25 D es mertansina

en donde la relación de A a D es 1: 1.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéutico de la reivindicación 1 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

8. Un compuesto terapéutico de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento del cáncer.

30 9. Un compuesto terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer comprende células madre cancerosas.

10. Un compuesto terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es recurrente.

Fig. 1

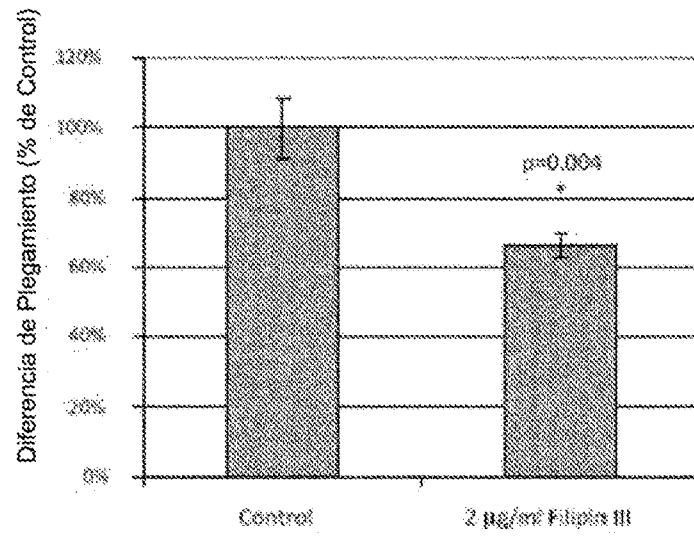


Fig. 2

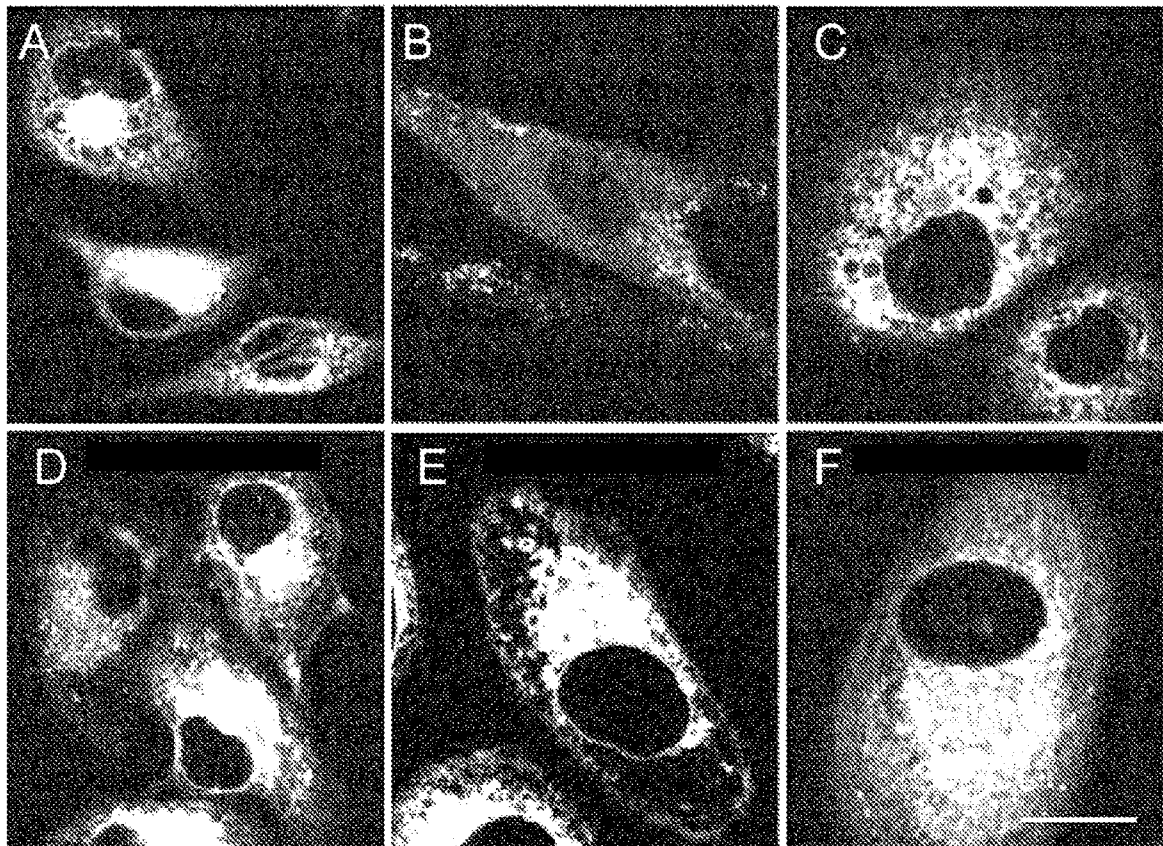


Fig. 3

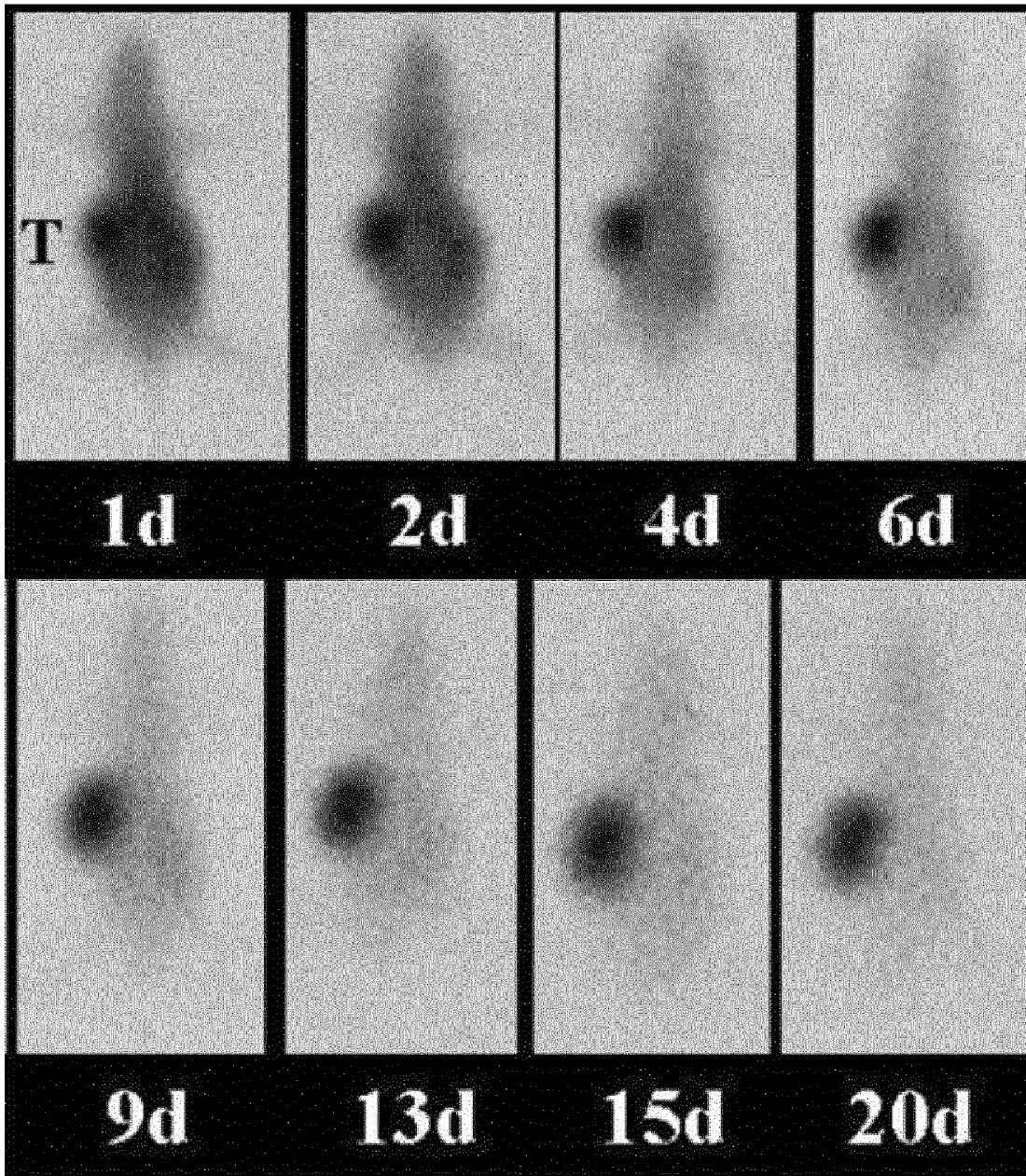


Fig. 4

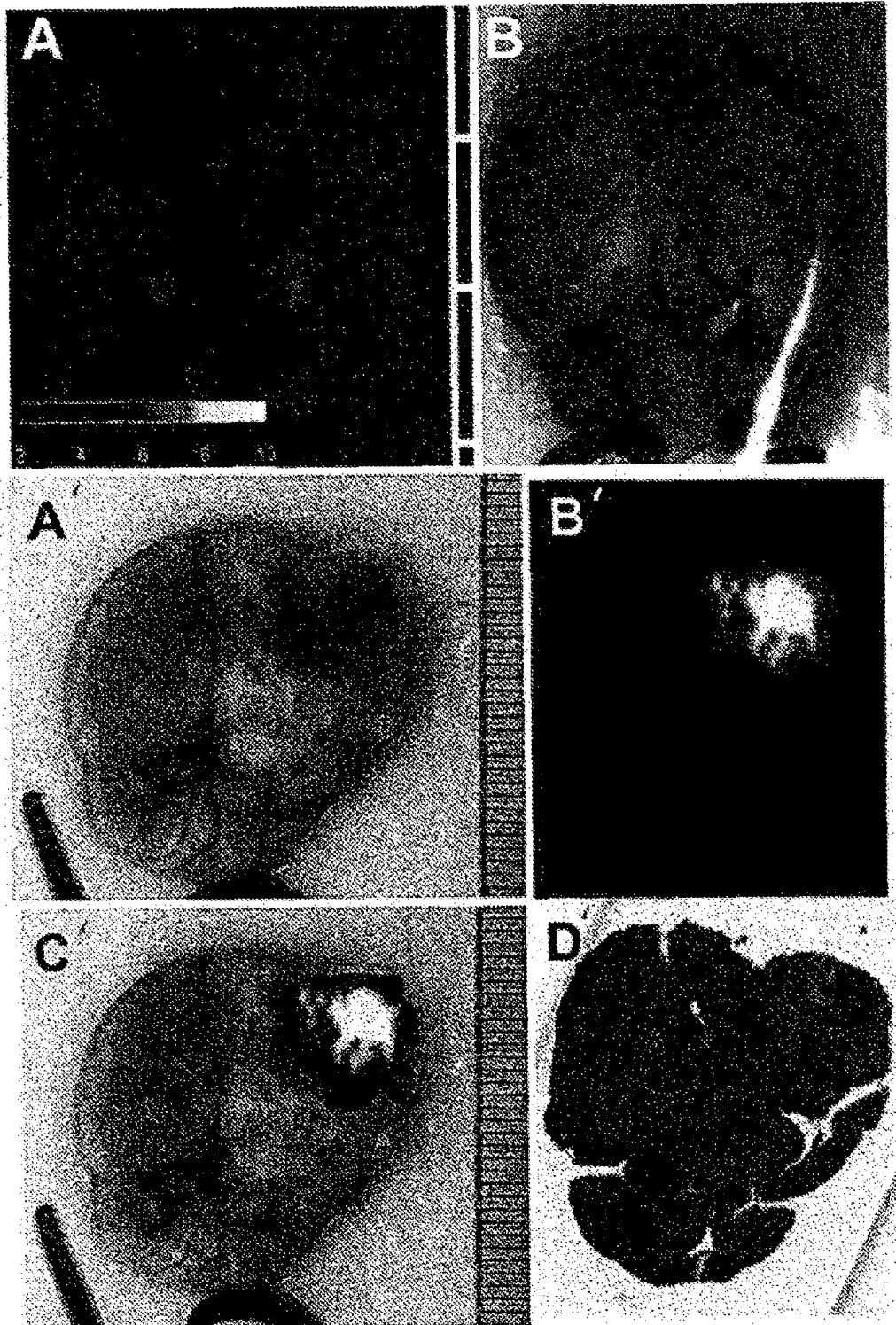


Fig. 5

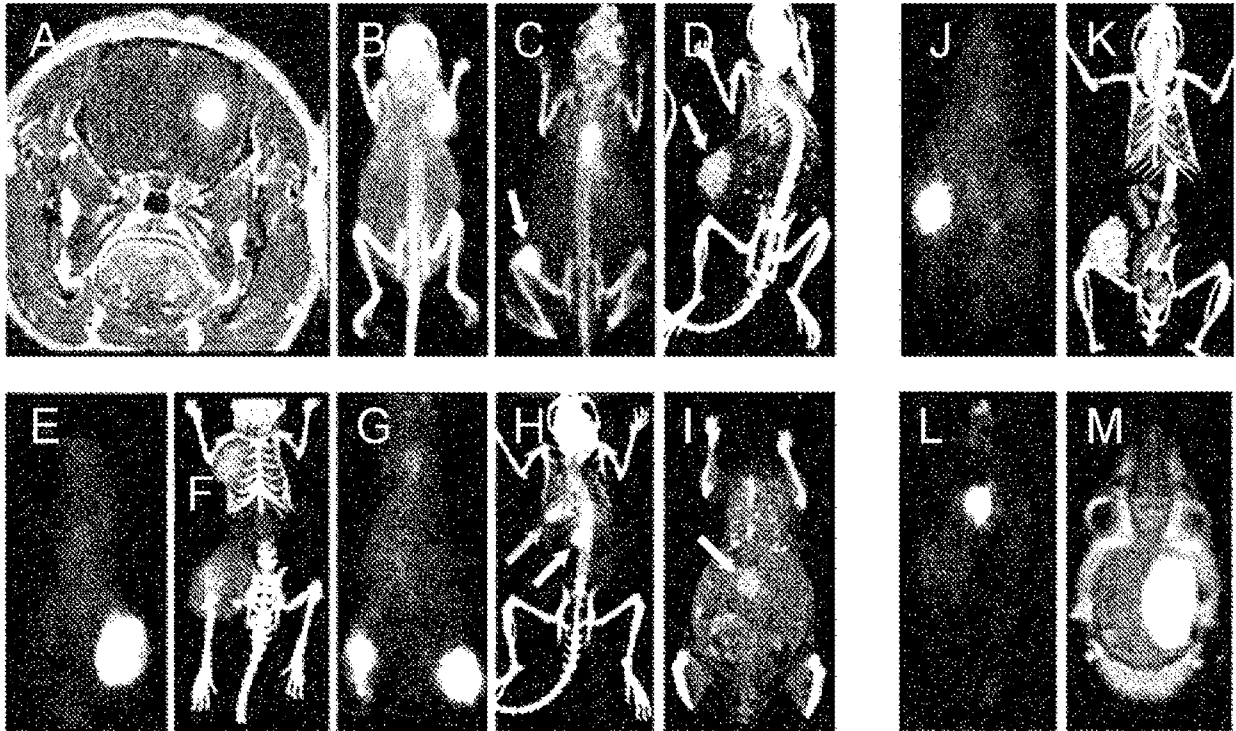


Fig. 6

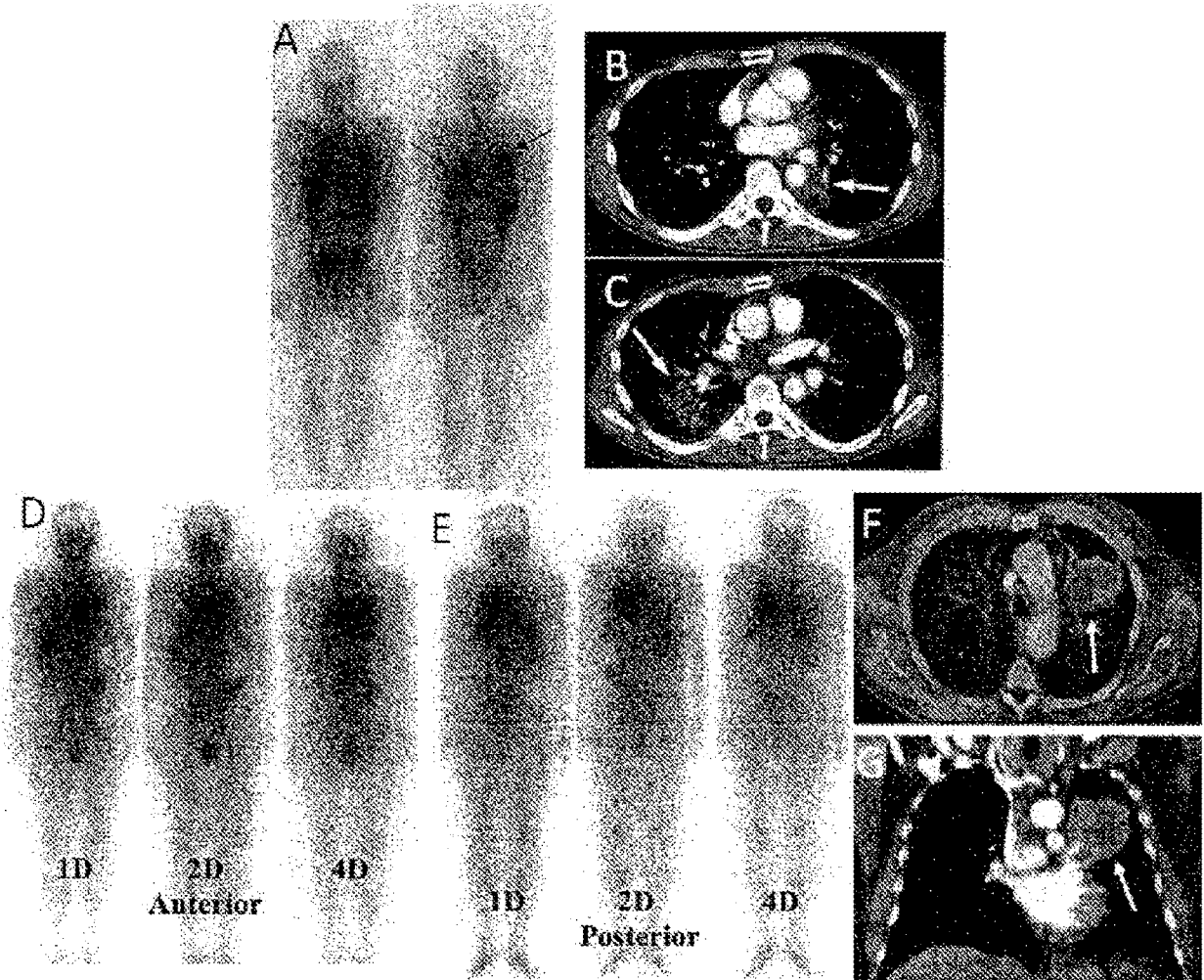


Fig. 7

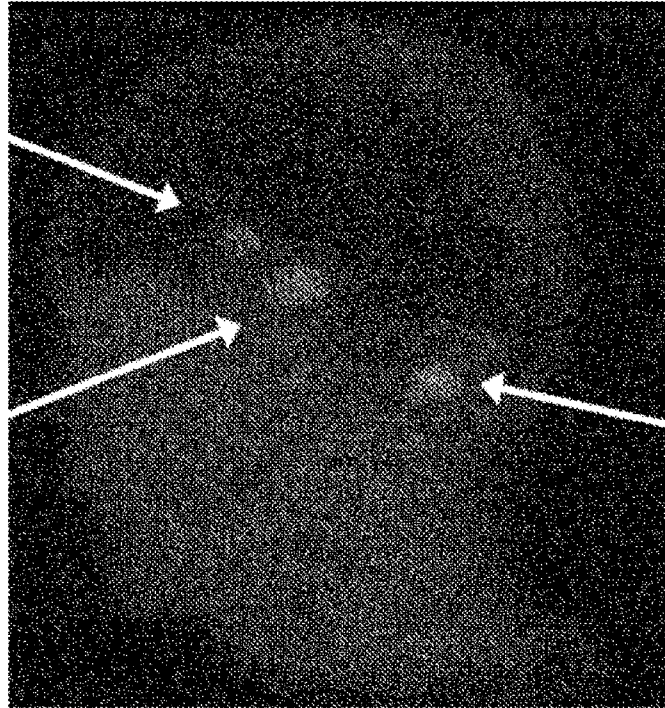


Fig. 8

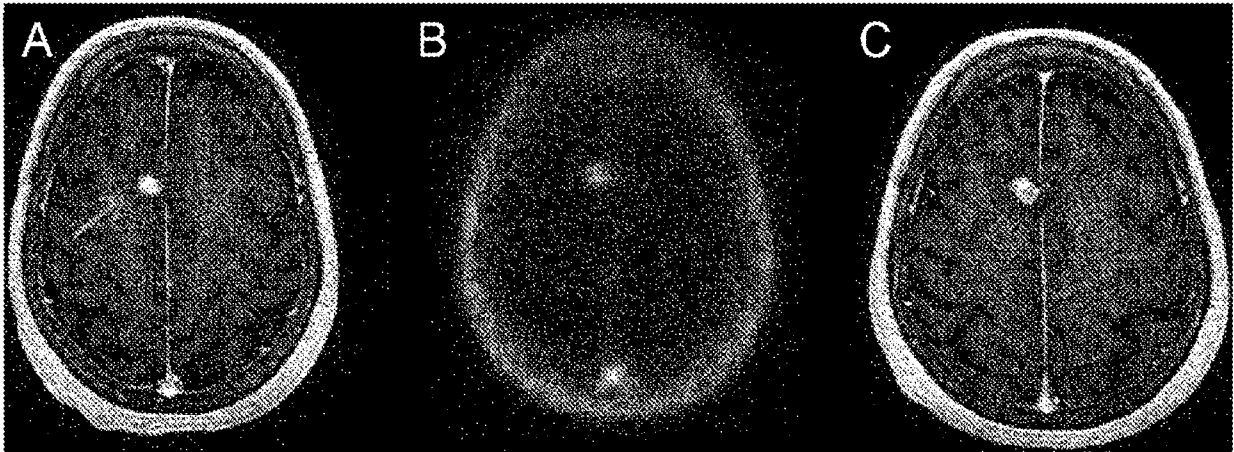


Fig. 9

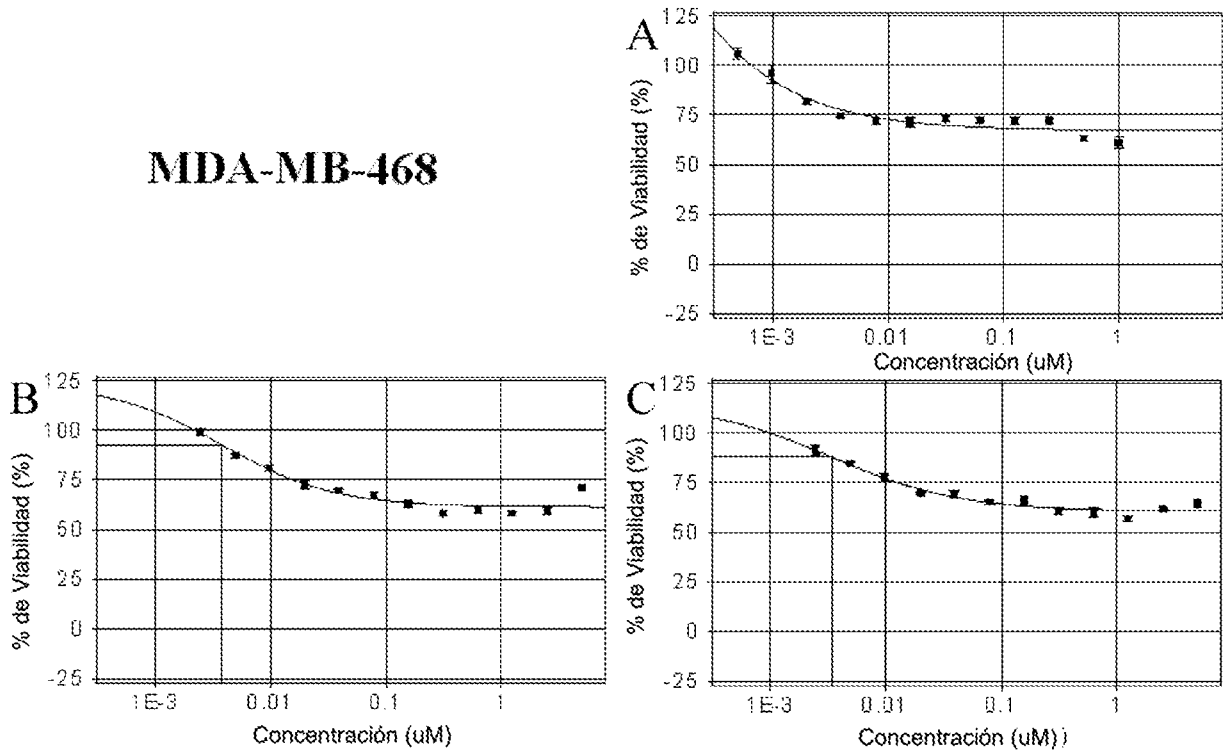


Fig. 10

NCI-H1299

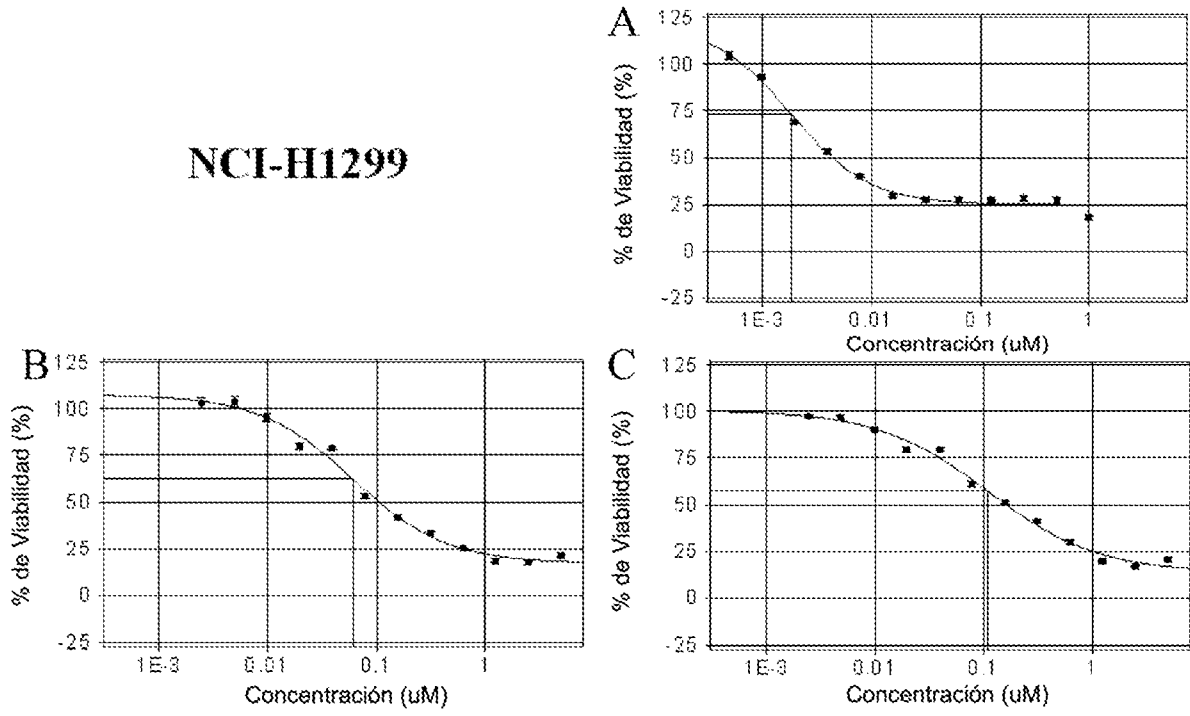


Fig. 11

NCI-H460

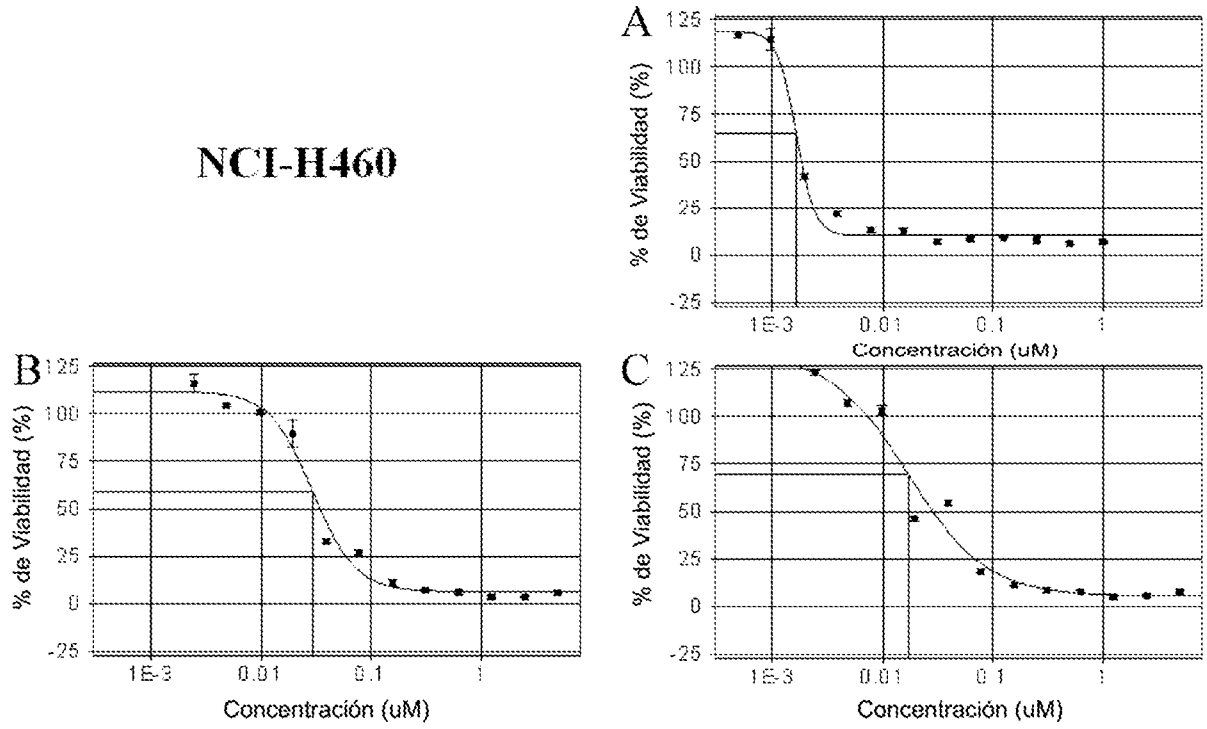


Fig. 12

Capan-2

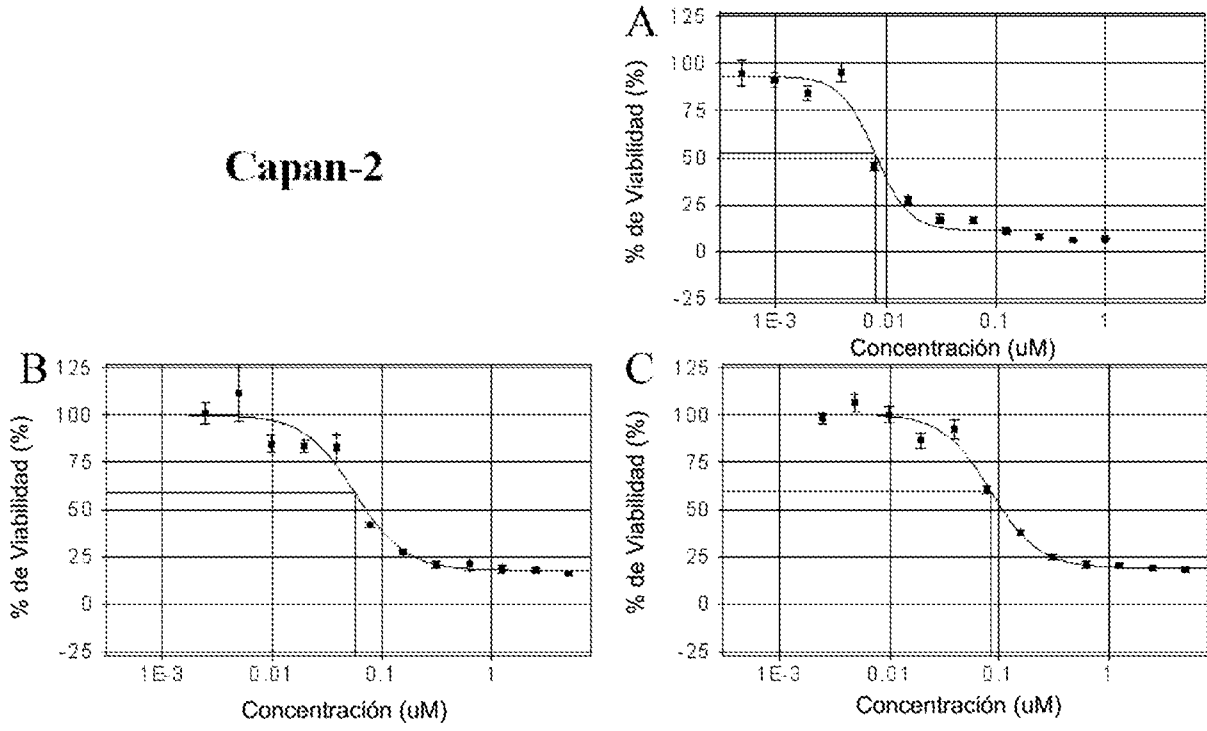


Fig. 13

MiaPaCa-1

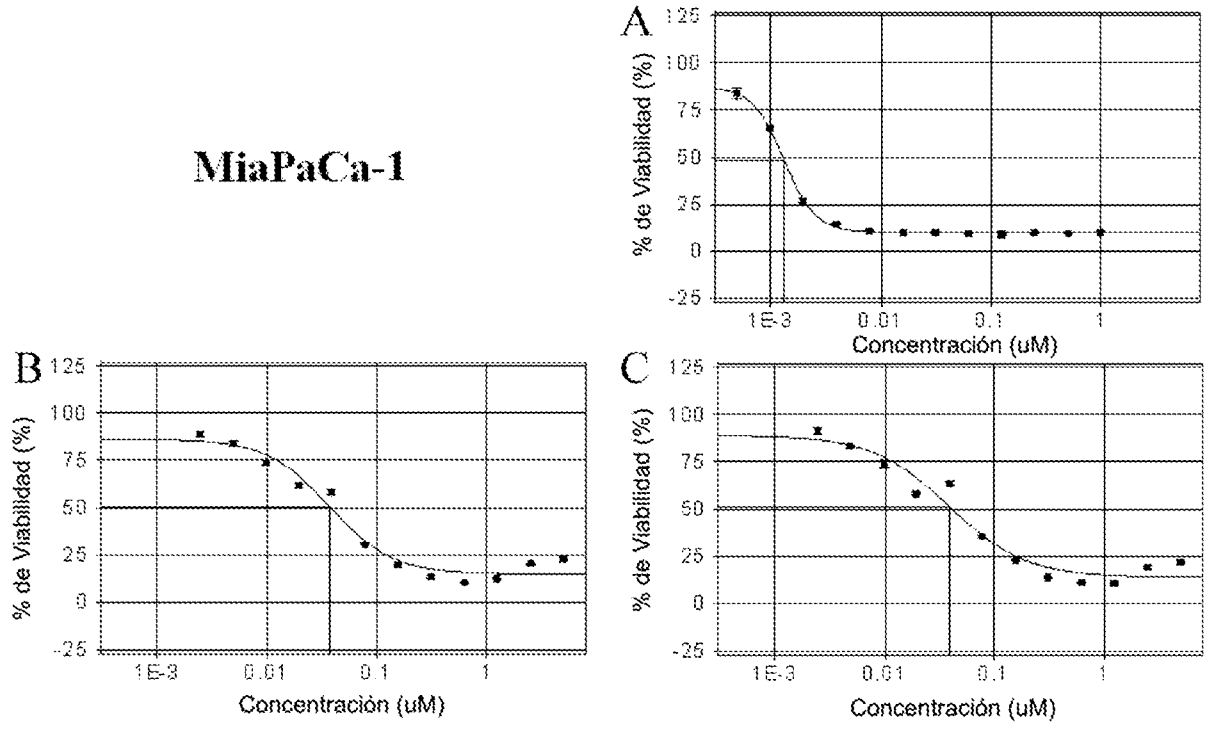


Fig. 14

HT29

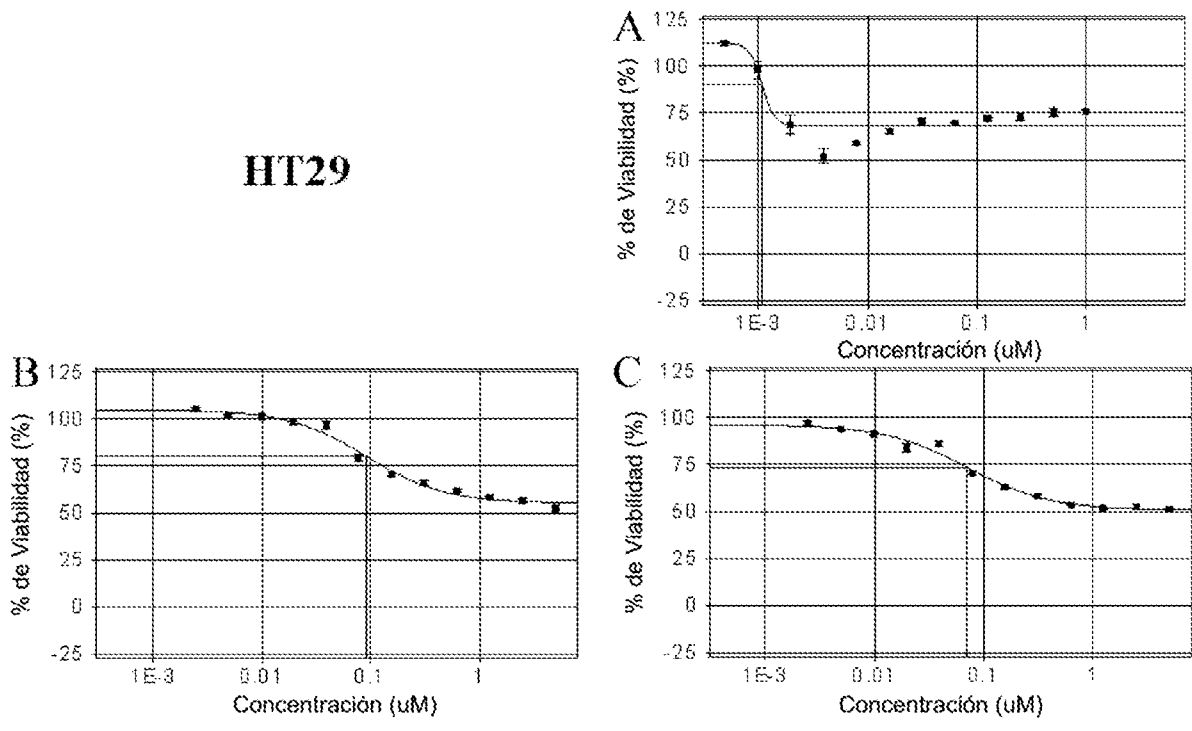


Fig. 15

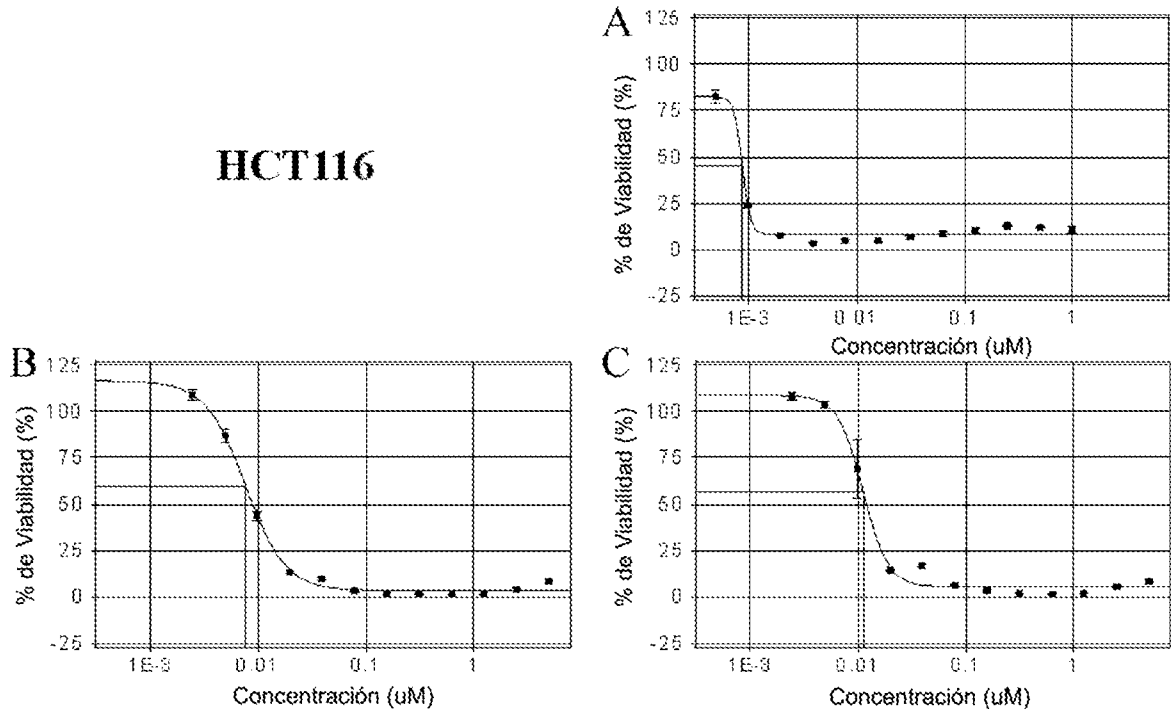


Fig. 16

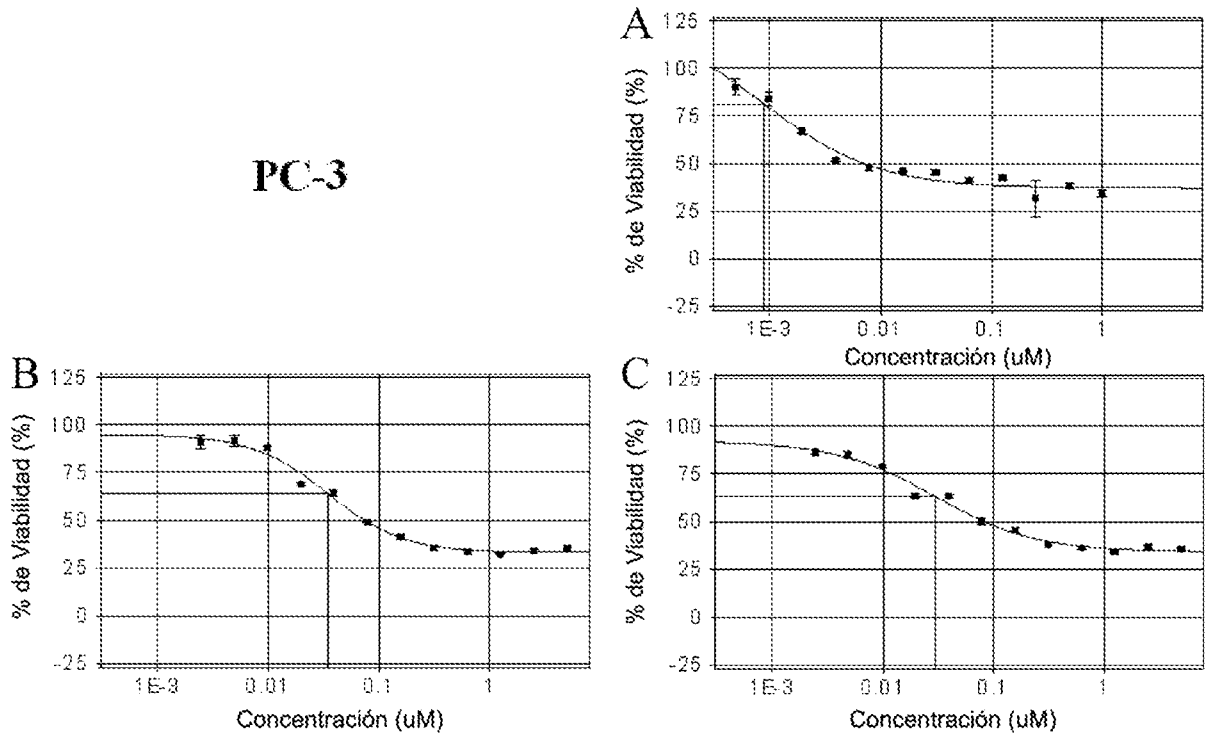


Fig. 17

