



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 832**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95928905 .9**
86 Fecha de presentación : **21.08.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **0769967**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.1997**

54 Título: **Conjugados que comprenden un agente antitumoral y su utilización.**

30 Prioridad: **19.08.1994 BE 9400752**
19.08.1994 BE 9400751

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **LA REGION WALLONNE**
Square du Bastion, 1A
B-1050 Bruxelles, BE
Université Catholique de Louvain

72 Inventor/es: **Trouet, André y**
Baurain, Roger

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados que comprenden un agente antitumoral y su utilización.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos, la composición farmacéutica que los comprende y la utilización de estos para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de tumores cancerosos.

10 Estado de la técnica y antecedentes tecnológicos en los que se basa la invención

Numerosos agentes tumorales, como las antraciclinas y los alcaloides de la vinca, han sido desarrollados estos últimos años y son particularmente eficaces para el tratamiento de los cánceres. Sin embargo, estas moléculas están a menudo caracterizadas *in vivo* por una toxicidad aguda, en particular una toxicidad medular y mucosa así como una toxicidad crónica cardíaca en las antraciclinas y neurológica en los alcaloides de la vinca.

Asimismo, se ha intentado desarrollar agentes antitumorales más específicos, de manera que sean más eficaces contra las células tumorales y, como consecuencia, que disminuyan los efectos secundarios de estos productos (toxicidad, destrucción de células no tumorales, ...).

La patente US-4.296.105 describe derivados de doxorrubicina ligados a un aminoácido, eventualmente sustituido, que poseen *in vitro* una actividad antimoral más elevada y una toxicidad más débil que la doxorrubicina.

No obstante, como estos derivados tienen un sitio de acción intracelular, estas moléculas son aún susceptibles de penetrar en las células tumorales y en las células normales.

Asimismo, estos últimos años se han propuesto nuevos agentes terapéuticos en forma de prodrogas.

Las prodrogas son moléculas susceptibles de transformarse en drogas (compuestos terapéuticos activos) por ciertas modificaciones químicas o enzimáticas de su estructura.

No obstante, estas prodrogas están igualmente caracterizadas por una débil estabilidad en la sangre y el suero, que incluyen enzimas que inactivan estas moléculas.

Los documentos Chemical Abstract 97:150635, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 23, págs. 1171-1174 (1980); Drugs Exp. Cl., Vol. 9, págs. 303-311 (1983); Journal of Medical Chemistry, Vol. 23, págs. 1166-1170 (1980) y la solicitud de patente BE-882.541 describen unas prodrogas que comprenden un vector unido por un brazo peptídico a la droga. Preferentemente, el brazo está constituido por cuatro aminoácidos y está unido por su función carboxílica libre a la función amina libre de derivados de antraciclinas como la daunorrubicina.

Además, el brazo de estas prodrogas está unido por su función amina libre a un vector constituido por una macromolécula (proteína como la BSA, inmunoglobulinas, ...) que permite la endocitosis selectiva de la prodroga por células diana.

Es igualmente conocido que el metotrexato puede ser utilizado para el tratamiento de reacciones inflamatorias como los reumatismos, pero su toxicidad elevada limita sus aplicaciones.

Objetivos de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevos compuestos que comprenden un agente terapéutico antitumoral, en particular prodrogas que comprenden un agente terapéutico antitumoral, que presentan propiedades terapéuticas mejoradas con respecto a los productos del estado de la técnica, en particular propiedades terapéuticas mejoradas en el tratamiento de tumores cancerosos.

Un objetivo particular de la presente invención es obtener prodrogas que presentan una especificidad de acción elevada, una toxicidad reducida y una estabilidad mejorada en el suero y la sangre.

Elementos característicos de la presente invención

La presente invención se refiere a compuestos (W-Z-M) como los definidos en la reivindicación 1. Estos compuestos comprenden un elemento elegido entre el grupo constituido por los agentes terapéuticos antitumorales, que poseen un sitio activo intracelular (S.A.), unido a un ligando (W-Z) que comprende un brazo (Z) unido a un grupo terminal (W) en el que el enlace entre el brazo (Z) del ligando (W-Z) y el elemento (M) impide la penetración celular del compuesto (W-Z-M); en el que este enlace es divisible selectivamente por factores secretados por células diana, de manera que permite la penetración del agente terapéutico (M) en dichas células diana, y en el que el grupo terminal (W) asegura la estabilidad del compuesto (W-Z-M) en el suero y en la sangre circulante, caracterizado porque el enlace entre el grupo terminal (W) y el brazo (Z) así como el enlace entre el brazo (Z) y el elemento (M) son enlaces covalentes que no afectan a las propiedades de los compuestos (W-Z-M), porque el brazo (Z) del ligando (W-Z) es

un péptido constituido por al menos dos aminoácidos eventualmente sustituidos, porque el grupo (W) es β -alanina de Fórmula $H_2N-CH_2-CH_2-CO_2H$, y porque el enlace entre el elemento (M) y el brazo (Z) del ligando (W-Z) es una unión peptídica.

- 5 Se entiende por factores secretados por células diana, en particular por células tumorales, enzimas tales como proteasas o peptidasas, secretadas de manera específica en el medio extracelular por dichas células.

Estas enzimas son por tanto susceptibles de dividir selectivamente el enlace existente entre el elemento (M) y el brazo (Z) del ligando (W-Z) de manera que permite la penetración del agente terapéutico, preferentemente en dichas células, y asegura de esta manera su destrucción y/o bloquea su proliferación.

Se entiende por grupo terminal (W) que asegura la estabilidad del compuesto según la invención en el suero y en la sangre circulante, la β -alanina, que reduce o inhibe la división del compuesto según la invención en el suero y la sangre circulante, en particular que reduce o inhibe la hidrólisis del compuesto según la invención por proteinasas y peptidasas presentes en el suero y/o la sangre circulante, en particular las peptidasas y proteinasas asociadas a los glóbulos rojos.

En particular, un grupo terminal (W) asegura la estabilidad del compuesto según la invención cuando menos del 20%, preferentemente menos del 2%, del compuesto es dividido por dichas enzimas durante su conservación en sangre humana a 37°C durante más de 2 horas.

Según la invención, el grupo (W) es la β -alanina de fórmula $NH_2-CH_2-CH_2-COOH$, unida por su función carboxílica al brazo (Z).

Según la invención, el enlace entre el elemento (M) y el brazo (Z) del ligando (W-Z) consiste en una unión peptídica y el brazo (Z) es un péptido constituido por al menos dos aminoácidos eventualmente sustituidos.

El brazo (Z) del ligando (W-Z) está constituido preferentemente por la sucesión de los aminoácidos siguientes: L-Leucil-L-Alanil-L-Leucil, L-Leucil-L-Alanil o L-Alanil-L-Leucil-L-Fenilalanil o L-Alanil-L-Leucil, unidos por su función carboxílica al elemento (M).

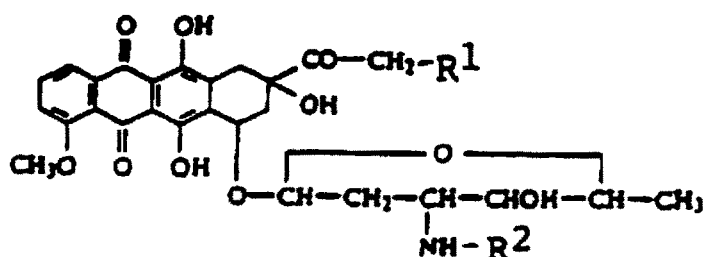
Según la invención, el agente terapéutico (M) es un agente terapéutico utilizado en quimioterapia del cáncer, preferentemente elegido entre los agentes terapéuticos descritos por Bruce A. Chabner y Jerry M. Collins (Cancer Chemotherapy, Lippincott Ed., ISBN 0-397-50900-6 (1990)), y susceptible de fijarse al ligando (W-Z) por una unión peptídica al grupo (Z) del ligando (W-Z).

En particular, el agente terapéutico es elegido entre el grupo constituido por las antraciclinas, los derivados del ácido fólico, los alcaloides de la vinca, la mitoxantrona, la caliqueamicina, los arabinósidos de la citosina (ARA-C), los arabinósidos de la adenosina (ARA-A), el fosfato de fludarabina, el melfalán, la bleomicina, la mitomicina, la L-canavanina, los taxoides, la camptotecina y sus derivados, en particular el TOPOTECAN® (hidrocloruro de 9-dimetilaminometilo-10-hidroxi camptotecina), eventualmente unidos a un aminoácido sustituido o no. La sustitución en el aminoácido puede ser cualquier sustitución que no afecte a las propiedades del compuesto (W-Z-M) según la invención.

Se entiende por derivados de estas moléculas dichas moléculas modificadas por un grupo químico que permite su fijación al brazo (Z) del ligando (W-Z) por un enlace covalente que no afecte a la actividad terapéutica de la molécula original.

Preferentemente, en el compuesto según la invención, el agente terapéutico (M) es elegido entre el grupo de las antraciclinas, en particular la doxorubicina (DOX) y la daunorrubicina (DNR), eventualmente unidas a un aminoácido sustituido o no.

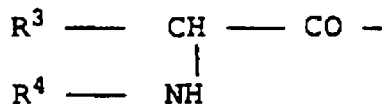
Ventajosamente, el agente terapéutico corresponde a la fórmula general:



en la que:

- R¹ es un átomo de hidrógeno o un grupo OH,

- R² es un átomo de hidrógeno o un radical de fórmula

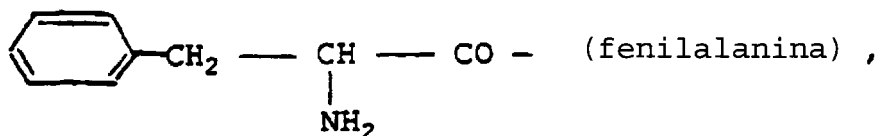
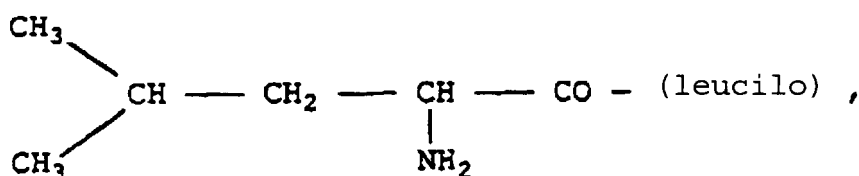


en la que:

- R³ es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo, eventualmente sustituido,

- R⁴ representa un átomo de hidrógeno o forma con R³ un radical alquileo que incluye 3 ó 4 átomos de carbono.

Preferentemente, R² es un radical de fórmula:



o uno de sus isómeros.

Según una forma de ejecución preferida de la invención, el compuesto es β Alanil-L-Leucil-L-Alanil-L-Leucil-daunorrubicina (identificada como β Ala-Leu-Ala-Leu-DNR en lo sucesivo), β Alanil-L-Leucil-L-Alanil-L-Leucil-doxorrubicina (identificada como β Ala-Leu-Ala-Leu-DOX en lo sucesivo), β Alanil-L-Alanil-L-Leucil-L-Fenilalanil-daunorrubicina (identificada como β Ala-Ala-Leu-Phe-DNR en lo sucesivo) o β Alanil-L-Alanil-L-Leucil-L-Fenilalanil-doxorrubicina (identificada como β Ala-Ala-Leu-Phe-DOX en lo sucesivo).

La presente invención se refiere igualmente a la composición farmacéutica que comprende el compuesto según la invención y eventualmente un adyuvante o vehículo farmacéutico aceptable.

Estas composiciones pueden, por ejemplo, ser administradas por vía parenteral o intravenosa. Las composiciones según la invención para la administración por vía parenteral pueden ser sobre todo soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Como disolvente o vehículo farmacéutico aceptable, se puede emplear el propilenglicol, el polietilenglicol, ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo oleato de etilo, o ciclodextrinas. Estas composiciones pueden comprender igualmente agentes humectantes, emulsionantes y/o dispersantes.

La esterilización puede realizarse de varias maneras, por ejemplo con ayuda de un filtro bacteriológico incorporando a la composición agentes esterilizantes o por radiación. Pueden igualmente ser preparadas en forma de composiciones sólidas estériles, que pueden ser disueltas en el momento del empleo en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

La presente invención puede igualmente comprender adyuvantes bien conocidos por el experto en la materia (vitamina C, antioxidantes...) pudiendo ser utilizados en sinergia con el compuesto según la invención para mejorar y prolongar el tratamiento de tumores cancerosos.

Las dosis de administración mínimas de los compuestos según la invención en un paciente son las dosis habituales de los agentes terapéuticos antitumorales mencionados anteriormente, como sobre todo los descritos por Bruce A. Chabner y Jerry M. Collins (Cancer Chemotherapy, Lippincott Ed., ISBN 0-397-50900-6 (1990)) o dosis de administración más elevadas.

Las dosis administradas varían por tanto en función del agente terapéutico utilizado para la preparación del compuesto según la invención.

La presente invención se refiere a la utilización de la composición farmacéutica según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores cancerosos, que consiste en la administración, en particular por vía parenteral o intravenosa, a un paciente de la composición farmacéutica según la invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa el mecanismo de acción del compuesto según la invención en su sitio de acción (S.A.) en una célula diana (C.C.).

La figura 2 representa el mecanismo de acción del compuesto según la invención en una célula normal (C.N.).

La figura 3 representa la hidrólisis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina en un medio condicionado de células de carcinoma mamario humano MCF7/6 (cromatograma en el momento inicial (a) y después de dos horas de incubación (b)).

La figura 4 representa la hidrólisis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina en un medio condicionado de células de carcinoma mamario humano MCF7/ADR (cromatograma en el momento inicial (a) y después de una hora de incubación (b)).

La figura 5 representa la hidrólisis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina en un medio condicionado de células de carcinoma de colon HT29 (cromatograma en el momento inicial (a) y después de dos horas de incubación (b)).

La figura 6 representa la acumulación de la daunorrubicina (DNR) en la concentración de 10 μ g/ml por células MCF7/6 confluyentes.

La figura 7 representa la acumulación de la N-L-Leucil-daunorrubicina (Leu-DNR) en la concentración de 10 μ g eq. DNR/ml por células MCF7/6 confluyentes.

La figura 8 representa la acumulación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina en la concentración de 10 μ g eq. DNR/ml por células MCF7/6 confluyentes.

La figura 9 representa la acumulación de la daunorrubicina (DNR) en la concentración de 10 μ g/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

La figura 10 representa la acumulación de la N-L-Leucil-daunorrubicina (Leu-DNR) en la concentración de 10 μ g eq. DNR/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

La figura 11 representa la acumulación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina en la concentración de 10 μ g eq. DNR/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

La figura 12 representa la citotoxicidad de la daunorrubicina (DNR), la L-Leu-daunorrubicina y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina frente a células MCF7/6 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de antraciclina.

La figura 13 representa la citotoxicidad de la daunorrubicina (DNR), la L-Leu-daunorrubicina y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina frente a células fibroblásticas MRC5 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de antraciclina.

La figura 14 representa la mortalidad de ratones NMRI hembras tras la administración i.p. 5 días consecutivos de la daunorrubicina (DNR) a dosis totales comprendidas entre 2,0 y 3,5 mg/kg.

La figura 15 representa la evolución del peso medio de ratones NMRI hembras que han recibido por vía i.p. 5 días consecutivos dosis totales de daunorrubicina comprendidas entre 2,0 y 3,5 mg/kg. Los pesos se expresan en porcentaje del peso inicial medio para cada grupo.

La figura 16 representa la mortalidad de ratones NMRI hembras tras la administración i.p. 5 días consecutivos de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina a dosis totales comprendidas entre 10 y 60 mg/kg.

La figura 17 representa la evolución del peso medio de ratones NMRI hembras que han recibido por vía i.p. 5 días consecutivos dosis totales de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina comprendidas entre 10 y 60 mg/kg. Los pesos se expresan en porcentaje del peso inicial medio para cada grupo.

La figura 18 representa la mortalidad de ratones NMRI hembras tras la administración i.v. única de la daunorrubicina (DNR) a dosis comprendidas entre 10 y 35 mg/kg.

ES 2 297 832 T3

La figura 19 representa la evolución del peso medio de ratones NMRI hembras que han recibido por vía i.v. de daunorrubicina (DNR) comprendidas entre 10 y 35 mg/kg. Los pesos se expresan en porcentaje del peso inicial medio para cada grupo.

5 La figura 20 representa la evolución del peso medio de ratones NMRI hembras que han recibido por vía i.v. dosis de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina (DNR) comprendidas entre 30 y 60 mg/kg. Los pesos se expresan en porcentaje del peso inicial medio para cada grupo.

10 La figura 21 representa la evolución del peso medio de ratones NMRI hembras que han recibido por vía i.v. bien una dosis de 30 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-daunorrubicina, o bien dos dosis de 30 mg/kg cada una dos días consecutivos. Los pesos se expresan en porcentaje del peso inicial medio para cada grupo.

15 La figura 22 representa la cinética de la hidrólisis enzimática de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina en L-Ala-L-Leu-doxorrubicina y L-Leu-doxorrubicina en un medio condicionado por células MCF7/6.

La figura 23 representa la acumulación de la doxorrubicina (DOX) en la concentración de 10 μ g/ml por células MCF7/6 confluyentes.

20 La figura 24 representa la acumulación de la L-Leu-doxorrubicina en la concentración de 10 μ g/ml por células MCF7/6 confluyentes.

La figura 25 representa la acumulación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina en la concentración de 10 μ g/ml por células MCF7/6 confluyentes.

25 La figura 26 representa la acumulación de la doxorrubicina (DOX) en la concentración de 10 μ g/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

La figura 27 representa la acumulación de la L-Leu-doxorrubicina (DOX) en la concentración de 10 μ g/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

30 La figura 28 representa la acumulación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina en la concentración de 10 μ g/ml por células fibroblásticas MRC5 confluyentes.

35 La figura 29 representa la citotoxicidad de la doxorrubicina (DOX), de la L-Leu-doxorrubicina y de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina frente a células MCF7/6 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de dichos derivados de antraciclina.

40 La figura 30 representa la citotoxicidad de la doxorrubicina (DOX), de la L-Leu-doxorrubicina y de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina frente a células fibroblásticas MRC5 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de dichos derivados de antraciclina.

45 La figura 31 representa la variación de la masa tumoral media de un tumor mamario humano MCF7/6 implantado en ratones atímicos el día T-21 en función de la administración de doxorrubicina (DOX) y de β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina (super DOX).

La figura 32 representa la variación del peso medio de ratones (gramos) tratados por la administración de doxorrubicina (DOX) y de β -Ala-Leu-Ala-Leu-doxorrubicina (super DOX).

Descripción de una forma de ejecución preferida de la invención

50 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que es posible obtener un agente terapéutico (M) antitumoral, inactivo por el enlace con un ligando (W-Z) que impide la penetración intracelular del agente terapéutico (M) en células normales (C.N.) y células diana (C.C.).

55 Según la invención, dichas células diana son células tumorales.

60 De manera inesperada, las células diana (C.C.) liberan en el medio extracelular unas enzimas tales como proteasas o peptidasas que son susceptibles de hidrolizar selectivamente un enlace covalente entre el brazo (Z) del ligando (W-Z) y el agente terapéutico (M), de manera que permiten la penetración del agente terapéutico (M) en dichas células diana (C.C.). En la célula diana, el agente terapéutico (M) actúa o bien directamente en su sitio de acción intracelular específico (S.A.) o tras una modificación bajo la acción de proteasas intracelulares, se modifica en otro agente terapéutico (M*) y mata la célula diana (C.C.) o bloquea su proliferación (figura 1).

65 Como las células normales no liberan o liberan pocas de dichas enzimas *in vivo*, el compuesto según la invención se mantiene inactivo y no penetra en las células normales (figura 2).

El compuesto descrito en la presente solicitud de patente responde a este mecanismo de acción, ya que cumple los criterios necesarios para ser administrado de forma eficaz:

1. El agente terapéutico antitumoral (M):

- posee un sitio de acción intracelular,
- una alta actividad específica,
- un grupo químico que permite un enlace covalente con un ligando (W-Z);
- si el grupo químico requerido no es esencial para la actividad del agente terapéutico (M), este no debe ser restituído intacto tras la hidrólisis enzimática de dicho enlace covalente.

2. El enlace con el ligando (W-Z) impide la penetración intracelular del agente terapéutico (M) tanto en las células normales como en las células diana.

3. El compuesto según la invención permanece estable en el suero y en la sangre, y es insensible a la acción de las proteinasas y peptidasas circulantes y asociadas a los glóbulos rojos.

4. El enlace covalente existente entre el agente terapéutico antitumoral (M) y el ligando (W-Z) es degradado parcial o totalmente por las enzimas secretadas por las células diana.

5. La naturaleza del ligando (W-Z) y su enlace al agente terapéutico (M) se determinan en función de las enzimas secretadas por las células diana. El

6. compuesto es menos tóxico *in vivo* que el agente terapéutico de partida. Esta disminución de toxicidad se refiere sobre todo a los efectos agudos como la toxicidad medular y mucosa, así como la posible toxicidad cardíaca o neurológica.

Derivados de antraciclinas

El agente terapéutico (M) según la invención puede ser un derivado de antraciclina, en particular la doxorubicina, la daunorrubicina, el 4-epi-doxorrubicina, el 4-demetoxi-doxorrubicina (idarrubicina), el 4'-tetrahidropiranyl-doxorrubicina (pirarrubicina), la carminomicina, la esorubicina y la 4'-yodo-doxorrubicina.

El ligando (W-Z) es a continuación unido por su función carboxílica al extremo α -amino del agente terapéutico.

Derivados del ácido fólico

El agente terapéutico antitumoral puede ser igualmente un derivado del ácido fólico, en particular el metotrexato (MTX) o sus derivados, como la lisina (ϵ - γ)-MTX o la lisina (ϵ - α)-MTX como los descritos por Fitzpatrick y col. (Anticancer Drug Design 10, págs. 1-9 y págs. 11-24 (1995)) o la aminopterina, en particular la lisina (ϵ - γ)-AMPT y la lisina (ϵ - α)-AMPT.

El ligando (W-Z) es a continuación unido por su función carboxílica al extremo α -amino del agente terapéutico.

Derivados del alcaloide de la vinca

Los derivados de alcaloides de la vinca según la presente invención son sobre todo derivados de vinblastina, de vincristina, de vindesina y de navelbina.

A. Enlace en posición 3

1. El ácido desacetilvincristina, que es formado por la adición de lisina al grupo amino-e para obtener una lisina (ϵ)-dAcVCR. A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la lisina (ϵ)-dAcV-CR.

2. El ácido desacetilvincristina puede ser igualmente obtenido añadiendo una diamina alifática a la vincristina (NH_2 -alquil- NH_2), de manera que se obtiene un NH_2 -alquil-dAcVCR, siendo el ligando (W-Z) unido a continuación por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la lisina (ϵ)-dAcVCR.

Los derivados de vinblastina (VBL) y de navelbina (5'-noranhidrovinblastina) pueden ser unidos al ligando (W-Z) de la misma manera que la descrita anteriormente para la vincristina.

B. Enlace en posición 4

1. La V₄-hemiaspartato-vincristina es formada a partir de vincristina por enlace del ácido aspártico a través de su grupo γ -carboxílico al grupo hidroxilo en posición 4 de la vincristina (V₄). A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la V₄-hemiaspartato-vincristina.
2. La V₄-lisil-vincristina es formada a partir de vincristina uniendo la lisina por su grupo α -carboxílico al grupo hidroxilo en posición 4 de la vincristina (V₄). A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la V₄-lisil-vincristina.
3. La V₄-lisil-vincristina es formada a partir de vincristina uniendo la lisina por su grupo α -carboxílico al grupo hidroxilo en posición 4 de la vincristina (V₄). A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo ϵ -amino de la V₄-lisil-vincristina. Según una alternativa, el ligando (W-Z) puede ser unido a la vez a los grupos α - y ϵ -amino de la V₄-lisil-vincristina.
4. La V₄- β -Alanil-vincristina es formada a partir de vincristina uniendo la β -Alanil por su grupo carboxílico al grupo hidroxilo en posición 4 de la vincristina (V₄). A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino de la β -Alanil de la V₄- β -Alanil-vincristina. Los derivados de vinblastina, de vindesina y de navelbina pueden estar unidos al ligando (W-Z) de la misma manera que la descrita anteriormente para la vincristina.

Derivados de caliqueamicina

La N-Acetil-dimetilhidrazida derivada de caliqueamicina es obtenida por reacción de una hidrazida de tiol sobre la caliqueamicina.

El ligando (W-Z) es a continuación unido por su extremo carboxílico a la N-Acetil-dimetilhidrazida derivada de caliqueamicina.

Derivados de mitoxantrona

Un β -Alanil derivado de mitoxantrona es preparado por enlace de la función carboxílica de β -Alanil a las cadenas laterales hidroxilo de la mitoxantrona.

Una mono o una bisustitución es posible a continuación. El ligando (W-Z) es unido a continuación por su extremo carboxílico al grupo amino de la β -Alanil-mitoxantrona.

Derivados de arabinósidos de la citosina (ARA-C)

El ligando (W-Z) está unido por su extremo carboxílico al grupo amino de los arabinósidos de la citosina.

Derivados de arabinósidos de la adenosina (Ara-A)

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino de los arabinósidos de la adenosina.

Derivados de fosfato de fludarabina

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino de fosfato de fludarabina.

Derivados de melfalán

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino del melfalán.

Derivados de bleomicina

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino de la bleomicina, la peplomicina o de la liblomicina.

Derivados de mitomicina

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino en posición 7 de la mitomicina.

Derivados de la L-canavanina

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la L-canavanina.

Derivados de taxoides

Un derivado β -Alanil de taxol es preparado por enlace de la función carboxílica del β -Alanil a las cadenas laterales hidroxilo en posición 7 del taxol.

El grupo hidroxilo del taxol es reactivo pero no esencial para la actividad antitumoral del taxol (Nicalaou K.C. y col., Chemistry and Biology of Taxol, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1994), 33, págs. 15-44).

A continuación, el ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo amino del β -Alanil-taxol.

El ligando (W-Z) puede ser unido de manera comparable al derivado β -Alanil-taxótero.

Derivados de camptotecina

El ligando (W-Z) es unido por su extremo carboxílico al grupo α -amino de la 9-amino-camptotecina o de la 7-amino-metil-camptotecina.

La presente invención será descrita de manera más detallada en los ejemplos siguientes dados a modo de ilustración no limitativa de la presente invención.

*Ejemplo 1**Síntesis de la N-L-Leucil-daunorrubicina (Leu-DNR)*

La L-Leucil-daunorrubicina es sintetizada por reacción de la daunorrubicina en forma de base (DNR) con la L-Leucina protegida en su función amina por un grupo FMOC (fluorenil-metoxi-carbonilo) y cuya función carboxílica es activada por IBCF (isobutilcloroformiato), tras la desprotección de la función amina.

La DNR en forma de base es preparada a partir de 200 mg de clorhidrato de daunorrubicina (R. Bellon) disueltos en 500 μ l de DMF (dimetilformamida) a los que se añade 1,2 equivalentes de N-Metil-morfolina.

1,2 equivalentes de Fmoc-N-Leucina (NOVA BIOCHEM) son disueltos en 500 μ l de DMF (dimetilformamida) y 1,2 equivalentes de N-Metil-Morfolina y 1,2 equivalentes de IBCF son añadidos a -20°C. Tras 15 minutos, esta solución es añadida a la de la DNR base y la mezcla se deja durante 16 horas, bajo agitación, protegida de la luz.

La Fmoc-N-L-Leucil-daunorrubicina es precipitada en 150 ml de una mezcla 1:1 de éter y de éter de petróleo (40-60°C), después es filtrada en un vidrio sinterizado nº4. El producto es purificado por cromatografía en columna de sílice (sílice Si-60 70-23C mallas de E. MERCK) eluida por cloroformo. La DNR residual es eluida por 10% de metanol. Las fracciones que contienen la FMOC-N-L-Leucil-DNR son evaporadas por rotavapor, el producto se recupera en 500 μ l de DMF. La desprotección se realiza añadiendo 5 equivalentes de dietilamina (LAB SCAN) a -20°C.

Después de 1 hora, la N-L-Leucil-DNR es precipitada por una mezcla 1:1 de éter y de éter de petróleo (40-60°C), después es filtrada en vidrio sinterizado nº4. El producto se recupera en una mezcla cloroformo/metanol (4:1 en volumen) y la dietilamina es neutralizada por un equivalente de HCl.

El producto es a continuación purificado por cromatografía en columna de sílice (sílice Si-60 70-230 mallas de E. MERCK), eluido por cloroformo, después por cloroformo que contiene 15% de metanol. Las fracciones que contienen la N-L-Leucil-DNR son evaporadas por rotavapor, el producto se vierte en agua destilada y el clorhidrato formado por ajuste del pH a 7 por HCl 1N. El producto es filtrado a continuación en gel de sílice modificado (sep-pak C18 de WATERS), el clorhidrato de N-L-Leucil-daunorrubicina es eluido por metanol y después evaporado por rotavapor. El rendimiento habitual es de 70 a 80%.

ES 2 297 832 T3

Características de los productos

Compuesto	Fórmula	Punto de fusión (°C)	Rf TLC	Tr HPLC
DNR	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₀ , HCL	189	0,05	0,67
L-Leu-DNR	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₁₁ , HCL	201	0,31	0,48

Rf TLC: sistema cloroformo: metanol: agua (120:20:1, en volumen)

Tr HPLC: tiempo de retención con respecto a la doxorubicina, sistema HPLC: columna Si-60, eluido por una mezcla cloroformo: metanol: ácido acético: sol. acuosa de MgCl₂ 0,3 mM (1440:420:80:60, en volumen).

Síntesis de la β -L-Alanil-L-Leucil-L-Alanina

La β -L-Alanil-L-Leucil-L-Alanina es preparada por síntesis en fase sólida según la técnica de Merrifield (The Chemistry of Polyptides, (P.G. Katsoyannis Ed.), Plenum Press, Nueva Cork, págs. 336-361 (1973)).

Derivados de fluorocromos

El ligando (W-Z) está unido por su extremo carboxílico al grupo amino de la rodamina 123.

Síntesis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es sintetizada por injerto de la Fmoc- β -L-Alanil-L-Leucil-L-Alanina, preparada por síntesis en fase sólida, sobre la N-L-Leucil-daunorrubicina.

A la Fmoc- β -L-Alanil-L-Leucil-L-Alanina (1,5 equivalentes) disuelta en la DMF se añaden 1,5 equivalentes (eq.) de N-metil-morfolina y 1,5 eq. de isobutil cloroformiato. Después de 10 minutos a -20°C, se añaden 1,5 eq. de HOBt. A continuación, después de 5 minutos, se añade 1 eq. de N-L-Leucil-daunorrubicina base disuelto en la DMF. Después de la reacción, la Fmoc- β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR se precipita en éter, después se desprotege por dietilamina. La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es purificada por cromatografía en columna de sílice y el clorhidrato formado por adición de HCl 1N.

Síntesis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX se sintetiza por injerto de β -L-Alanil-L-Leucil-L-Alanina, preparada por síntesis en fase sólida, en la N-L-Leucil-doxorrubicina, como se describe para la síntesis de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

En esta síntesis, el agente de acoplamiento (isobutil cloroformiato) puede ser omitido de manera que se aumenta aún más el rendimiento de producción del compuesto según la invención en el caso de formación de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX.

Ejemplo 2

Degradación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR en un medio condicionado de células de carcinoma mamario MCF7/6

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR ha sido incubada a 37°C durante 2 horas en un medio condicionado de células MCF7/6, concentrado 20 ó 4 veces, y el compuesto así como los productos de digestión han sido extraídos a pH 9 y analizados por HPLC (figura 3).

Producto de partida o metabolito	Tiempo 0	Después de 1 hora	Después de 2 horas
-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	100%	10%	2,6%
L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR o DNR	0%	3,0%	7,3%
L-Ala-L-Leu-DNR	0%	<1%	<1%
L-Leu-DNR	0%	83%	90%

De ello resulta que la L-Leu-DNR es el metabolito principal de la endopeptidasa y que su formación a partir de la prodroga es casi completa después de 1 hora de incubación a 37°C. En las condiciones experimentales utilizadas, la L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR y la DNR no están lo bastante separadas para que se pueda afirmar con certeza que la L-Leu-DNR formada se hidroliza a continuación más lentamente en DNR.

Ejemplo 3

Degradación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX en un medio condicionado de células de carcinoma mamario MCF7/6

Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX es incubada a 37°C durante 2 horas en un medio condicionado de células MCF7/6 concentrado 20 veces, sólo se encuentra ya como metabolito la L-Leu-DOX y la DOX.

Producto de partida o metabolito	Tiempo 0	Después de 2 horas
-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX	100%	23%
L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX	0%	<1%
L-Ala-L-Leu-DOX	0%	<1%
L-Leu-DOX	0%	68%
DOX	0%	9%

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX es hidrolizada menos rápidamente que la prodroga de la DNR por la o las peptidasas secretadas por las células MCF7/6. Por el contrario, la transformación de la L-Leu-DOX en DOX parece un poco más importante que la transformación de la L-Leu-DNR en DNR.

Ejemplo 4

Degradación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR y de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX en la sangre humana

Al igual que la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX es estable cuando es incubada a 37°C en sangre humana. En efecto, menos del 2% de la prodroga es hidrolizada en L-Leu-DOX después de 2 horas, mientras que los otros derivados sintetizados se hidrolizan rápidamente en presencia de sangre humana (véase tabla 1 siguiente).

TABLA 1

Hidrólisis de derivados de la daunorrubicina (DNR) y de la doxorrubicina (DOX) compuesto

COMPUESTO	Sangre humana	Medio condicionado MCF-7/6	
L-Leu-DNR	+	-	Hidrólisis en DNR
D-Leu-DNR	-	-	"
Dietilo- - Ala-DNR	-	-	"
L-NorLeu-DNR	-	-	
L-Ala-L-Leu- DNR	+	+	Hidrólisis en L-Leu-DNR
L-Ala-L-Ala- DNR	+	-	Hidrólisis en DNR
L-Ala-L-Leu- DNR	+	+	"
L-Ala-L- NorLeu-DNR	-	-	"
-Ala-L-Leu- DNR	-	-	"
L-Phe-L-Leu- DNR	+	(±)	"
L-Ala-L-Ala- L-Leu-DNR	+	-	Hidrólisis en L-Leu-DNR
L-NLeu-L-Ala- L-Leu-DNR	+	+	"
L-Leu-L-Ala- L-Leu-DNR	+	+	"
L-Ala-L-Leu- L-Ala-L-Leu- DNR	+	+	"
L-Ala-L-Leu- Gli-L-Leu-DNR	+	(±)	Hidrólisis en DNR
Gli-L-Leu-	+	+	"

ES 2 297 832 T3

	Gli-L-Leu-DNR			
5	Succ-L-Ala-L-Leu-DNR	-	-	Hidrólisis en L-Leu-DNR
	Succ-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	-	-	"
10	Succ-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	(+)	-	"
15	pGlu-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX	+	-	Hidrólisis en L-Leu-DOX
20	D-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	-	-	Hidrólisis en L-Leu-DNR
25	D-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	+	(+)	"
30	D-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	+	+	"
35	D-Leu-D-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	(+)	(+)	"
40	-L-Ala-L-Leu-DNR	-	-	"
45	L-NLeu- -L-Ala-L-Leu-DNR	+	+	"
	-Ala-L-Ala-L-Leu-DNR	-	-	"
50	-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR	-	+	Hidrólisis en L-Leu-DNR
55	-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX	-	+	Hidrólisis en L-Leu-DOX
60	-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-COU*	-	+	Hidrólisis en L-Leu-COU
65				

Ejemplo 5

Degradación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR en el medio condicionado de células de carcinoma MCF7/ADR

5 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR se incubaba a 37°C durante 1 hora en un medio condicionado de células MCF7 resistentes a las antraciclinas (línea MCF7/ADR), sólo se encuentra como metabolito la L-Leu-DNR (figura 4).

Las células MCF7/6, sensibles y resistentes a las antraciclinas, secretan las dos la o las proteasas capaces de hidrolizar el compuesto según la invención.

Ejemplo 6

Degradación de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR en el medio condicionado de células de hepatocarcinoma HepG2

15 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR se incubaba a 37°C durante 2 horas en un medio condicionado de células de hepatocarcinoma HepG2, los metabolitos principales que se encuentran son la L-Leu-DNR (27% de la fluorescencia total) y la L-Ala-L-Leu-DNR (8%). El porcentaje de hidrólisis no puede compararse entre las células de carcinoma mamario MCF7 y de hepatocarcinoma HepG2, ya que el número de células a partir de las cuales los medios condi-
 20 cionados han sido recuperados, así como la concentración de los medios condicionados, son diferentes. El análisis cualitativo indica sin embargo que la o las peptidasa(s) no es (no son) específica(s) de las células MCF7.

Ejemplo 7

Degradación de la β -Ala-Leu-A-Ala-Leu-DNR en el medio condicionado de células de carcinoma de colon HT29

25 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR se incubaba a 37°C durante 2 horas en un medio condicionado, concentrado 40 veces, de células de carcinoma de colon HT29, los metabolitos principales que se encuentran son la L-Leu-DNR (82% de la fluorescencia total) y la L-Leu-L-Ala-L-Leu-DNR y/o la DNR (3%), tal y como se ilustra en la figura 5.

Ejemplo 8

Acumulación en células tumorales MCF7/6 de la DNR, de la L-Leu-DNR y de la β -Ala-L-Lau-L-Ala-L-Lau-DNR

Las células del carcinoma mamario humano MCF7/6 han sido incubadas en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a una concentración de 10 μ g eq. DNR/ml. Tras un tiempo, la acumulación de las prodrogas y de sus metabolitos fluorescentes han sido determinadas por HPLC tras la extracción en productos de pH básico, según un procedimiento
 40 puesto a punto en el laboratorio. Las acumulaciones, expresadas en μ g/mg de proteínas celulares, han sido comparadas a las de la DNR y de la DOX así como a las de las L-Leu-DNR y L-Leu-DOX. Los metabolitos han sido identificados por determinación de los tiempos de retención de productos de referencia sintetizados en el laboratorio.

La DNR se acumula rápidamente en las células MCF7/6 esencialmente en forma inmodificable, siendo alcanzado
 45 el máximo de acumulación (± 15 μ g/mg de proteínas celulares tras 6 horas de incubación). La acumulación de la DNR disminuye a continuación hasta 24 horas. El metabolito principal intracelular es el daunorubicinol, resultante de la reducción de la función cetona de la DNR, en posición C13, por reductasas intracelulares (figura 6).

La L-Leu-DNR se acumula igualmente muy rápidamente por las células MCF7/6, pero a tasas menores y la acumu-
 50 lación alcanza un nivel constante después de 24 horas de incubación, situándose a ± 14 μ g/mg de proteínas celulares. La DNR se forma intracelularmente de forma progresiva en el transcurso del tiempo para alcanzar 14% de la fluorescencia total intracelular después de 24 horas de incubación (figura 7).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, incubada durante 24 horas en presencia de células MCF7/6, se acumula con forma
 55 inmodificable, mucho menos que la DNR y la L-Leu-DNR, siendo la tasa de acumulación sólo de ± 1 μ g/mg de las proteínas celulares (figura 8). Estas son esencialmente la L-Leu-DNR, formada extracelularmente, y la DNR, que se encuentra en las células tras 24 horas de incubación. La DNR presente intracelularmente representa, después de 24 horas de incubación, aproximadamente el 40% de la fluorescencia total.

TABLA 2

Concentraciones intracelulares en producto de partida L-Leu-DNR y DNR después de 6 horas de incubación de células MCF7/6 con DNR, L-Leu-DNR o β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR

Incubación con	Producto de partida	Leu-DNR formada	DNR formada
(g/mg proteínas celulares)			
DNR	14,9	-	-
Leu-DNR	13,4	-	1,5
-Ala-Leu- Ala-Leu-DNR	0,3	4,5	0,9

Los resultados de la tabla 1 indican que el paso de los derivados peptídicos de la DNR a través de las membranas celulares disminuye cuando la longitud de la cadena peptídica aumenta, y que la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es un precursor de la Leu-DNR, activado extracelularmente. La Leu-DNR liberada se acumula intracelularmente y se convierte en un precursor intracelular de la DNR.

Ejemplo 9

Acumulación en células normales MRC5 de la DNR, de la L-Leu-DNR y de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR

Las células de fibroblastos MRC5 han sido incubadas en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR a una concentración de 10 μ g eq. DNR/ml. En diversos momentos, la acumulación de las prodrogas y de sus metabolitos fluorescentes ha sido determinada por HPLC tras la extracción de los productos con pH básico, según un procedimiento puesto a punto en el laboratorio. Las acumulaciones, expresadas en μ g/mg de proteínas celulares, han sido comparadas con las de la DNR y L-Leu-DNR. Los metabolitos han sido identificados por determinación de los tiempos de retención de productos de referencia sintetizados en el laboratorio.

La DNR se acumula principalmente en las células MRC5 en forma inmodificable, y la acumulación alcanza un nivel constante de ± 76 μ g/mg de proteínas celulares después de 6 horas, siendo el metabolito principal el daunorubicinol (figura 9).

La L-Leu-DNR se acumula igualmente muy rápidamente por las células MRC5, pero a tasas menores, y la acumulación alcanza un nivel constante tras 24 horas de incubación, situándose a ± 40 μ g/mg de proteínas celulares. Los metabolitos principales son la DNR así como la L-Leu-DNR-OL (figura 10).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, incubada durante 24 horas en presencia de células MRC5, se acumula mucho menos que la DNR y que la L-Leu-DNR, siendo la tasa de acumulación sólo de $\pm 3,3$ μ g/mg de proteínas celulares (figura 11). Es esencialmente la L-Leu-DNR, formada extracelularmente, la que se encuentra en las células. Su acumulación aumenta linealmente hasta 24 horas de incubación.

Estos resultados corroboran los obtenidos en las células MCF7/6, es decir, el compuesto β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR no está prácticamente en las células (≈ 300 veces menos que la DNR tras 6 horas) y que es la L-Leu-DNR formada extracelularmente la que se acumula esencialmente en las células MRC5 (tabla 3).

TABLA 3

Concentraciones intracelulares en producto de partida L-Leu-DNR y DNR tras 6 horas de incubación de las células MRC5 con DNR, L-Leu-DNR o β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR

Incubación con	Producto de partida	Leu-DNR formada	DNR formada
	(g/mg proteínas celulares)		
DNR	77,4	-	-
Leu-DNR	36,0	-	1,3
-Ala-Leu-Ala-Leu-DNR	0,03	3,1	0,08

En la línea tumoral, MCF7/6, las tasas intracelulares obtenidas de DNR tras 24 horas de incubación en presencia del compuesto β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR son 12 veces más elevadas que en los fibroblastos MRC5.

Cuando las células son incubadas en presencia de Leu-DNR y DNR, la relación de las tasas intracelulares de DNR sólo es respectivamente de 0,37 y 0,19.

Ejemplo 10

Citotoxicidad de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR frente a células tumorales MCF7/6 y normales MRC5

La citotoxicidad de la prodroga DNR, de la Leu-DNR y de la DNR ha sido comparada en células MCF7/6 y MRC5 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de diversos compuestos.

Las citotoxicidades de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, de la L-Leu-DNR y de la DNR han sido determinadas en células MCF7/6 en crecimiento en placas de 96 pocillos, incubadas en presencia de concentraciones crecientes de diversos compuestos. Después de 72 horas, las células son incubadas durante 48 horas en ausencia de antraciclina y la citotoxicidad es determinada por la medición de las proteínas celulares por la técnica de Bradford. Se utiliza una gama de 9 concentraciones, yendo de 700 μ g/ml hasta 0,0035 μ g/ml, y cada medición representa una media y una desviación estándar de 6 valores. Los puntos experimentales son ajustados con una curva sigmoide que permite calcular el punto de inflexión correspondiente a la dosis a la que sobrevive la mitad de las células (CI_{50}).

La figura 12 ilustra que la CI_{50} de la DNR es de $0,090 \pm 0,004$ μ g/ml. Para las células incubadas durante 72 horas en presencia de la L-Leu-DNR, la CI_{50} es de $1,30 \pm 0,56$ μ g/ml. En el caso de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, la CI_{50} es de $22,00 \pm 7,31$ μ g/ml.

La Leu-DNR y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR son, por tanto, respectivamente 14 veces y 244 veces menos citotóxicas que la DNR para las células del carcinoma mamario humano MCF7/6 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de antraciclina.

Las citotoxicidades de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, de la L-Leu-DNR y de la DNR han sido determinadas en células MRC5 en crecimiento en placas de 96 pocillos, incubadas en presencia de concentraciones crecientes de diversos compuestos. Después de 72 horas, las células son incubadas durante 48 horas en ausencia de antraciclina y la citotoxicidad es determinada por la medición de las proteínas celulares por la técnica de Bradford. Se utiliza una gama de 9 concentraciones, yendo de 700 μ g/ml hasta 0,0035 μ g/ml, y cada medición representa una media y una desviación estándar de 6 valores. Los puntos experimentales son ajustados con una curva sigmoide que permite calcular el punto de inflexión correspondiente a la dosis a la que sobrevive la mitad de las células (CI_{50}).

La figura 13 ilustra que la CI_{50} de la DNR es de $0,010 \pm 0,006$ μ g/ml. Para las células incubadas durante 72 horas en presencia de la L-Leu-DNR, la CI_{50} es de $1,78 \pm 0,23$ μ g/ml. En el caso de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR, la CI_{50} es de $23,14 \pm 4,81$ μ g/ml.

La Leu-DNR y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR son, por tanto, respectivamente 172 veces y 2230 veces menos citotóxicas que la DNR para las células fibroblásticas MRC5 mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de antraciclina.

Tanto para las células tumorales como para las células fibroblásticas, el precursor de la DNR es mucho menos tóxico que el compuesto madre. Queda por determinar si esta disminución de toxicidad observada *in vitro* se observa igualmente *in vivo*.

Ejemplo 11

Toxicidad aguda in vivo

5 La toxicidad aguda de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR ha sido comparada con la de la daunorrubicina en los ratones. En el estudio *in vivo* de la toxicidad aguda de un medicamento, la determinación de la dosis letal 50 (dosis letal para el 50% de los animales o DL_{50}) ocupa un lugar importante. A pesar del hecho de que no representa una constante biológica, da indicaciones sobre la toxicidad aguda del producto inyectado. La DL_{50} es un ensayo simple en el que cantidades crecientes del producto que se debe ensayar son administradas por vía intravenosa (i.v.) en una inyección
 10 única y por vía intraperitoneal (i.p.) en 5 inyecciones, una inyección por día durante 5 días consecutivos. La mortalidad de los animales se sigue en función del tiempo. Al finalizar el periodo de observación, normalmente 30 días, el valor de la DL_{50} se obtiene por regresión lineal del porcentaje de mortalidad (en escala probit) en función del logaritmo de la dosis administrada (O.K. Chan y A.W. Hayes, Principles and methods for acute toxicity and eye irritancy, en Principles and methods of toxicology, segunda edición. Ed. por A. W. Hayes. Raven Press. Nueva Cork, EE.UU.
 15 (1989), págs. 169-220; D. Deprez-De Campeneere y A. Trouet. DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-DNA, Eur. J. Cancer, 16 (1980), págs. 981-986; H. E. Skipper, L. H. Schmidt, A. Goldin and J. M. Venditti. A Manual on quantitative drug evaluation in experimental tumor systems, Cancer Chemother. Rep. 17 (1962), págs. 1-178).

20 En caso de que la DL_{50} no se alcance, la evolución de los pesos diarios de los ratones da igualmente una indicación sobre la toxicidad aguda de los productos administrados.

1. *Material y procedimientos*

25 La toxicidad aguda de estas dos drogas ha sido estudiada por las vías i.v. e i.p. en una sola cepa de ratones. Los ratones NMRI hembras (no consanguíneos IOPS-Han, aproximadamente de 5 semanas y con un peso medio de 14,6 gramos, procedentes de IFFA-CREDO, Bélgica) se dejan en cuarentena durante una semana. En la víspera del día de las inyecciones, se distribuyen en grupos de 5 (β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR) y de 7 (DNR) por dosis que se debe inyectar; su peso ha sido recuperado (aproximadamente 22 gramos de media).

30 Las inyecciones han sido efectuadas sistemáticamente por la mañana (inyección única en la vena caudal para las i.v. e inyecciones 5 días consecutivos en el peritoneo para las i.p.), utilizando jeringas de 1,0 ml y agujas 30G (i.v.) y 27G (i.p.) estériles. Todas las manipulaciones de animales han sido efectuadas con guantes y el mantenimiento de los animales ha sido efectuado sistemáticamente cada semana.

35 La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR ha sido inyectada por vía i.v. a dosis de 30, 60 y 120 mg/kg y por vía i.p. a las dosis totales de 10, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 mg/kg. En dos grupos suplementarios, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR ha sido reinyectada por vía i.v. a dosis totales de 30 y 60 mg/kg en respectivamente una y dos inyecciones consecutivas a 30 mg/kg.

40 La DNR ha sido inyectada por vía i.v. a dosis de 10, 15, 20, 25, 30 y 35 mg/kg y por vía i.p. a dosis de 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 mg/kg.

45 Las soluciones de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR y de la DNR han sido realizadas en NaCl fisiológico de tal manera que el volumen inyectado corresponde a 0,1 ml para 10 gramos de ratones. Las concentraciones de las soluciones han sido verificadas por espectrofotometría.

50 A partir del día de las inyecciones (J0), los ratones han recibido seguimiento clínico, con un relevo diario de los ratones muertos. El peso de los ratones ha sido medido casi todos los días. El periodo de observación ha sido prolongado más allá del mes, a fin de constatar mejor los signos de toxicidad tardía. Al final del estudio, los ratones supervivientes han sido sacrificados, según las normas de experimentación animal (D.B. McGregor, Ethics in experiments on animals, en Experiments in toxicology, primera edición. Ed. por D. Anderson y D.M. Conning. The Royal Society of Chemistry and The Universities Press. Belfast, Irlanda (1988), págs. 512-522).

55 2. *Resultantes**Toxicidad por vía intraperitoneal*

60 Tal y como lo ilustra la figura 14, en lo que respecta a la DNR, se observa una toxicidad importante en función de la concentración, toxicidad que se manifiesta por la mortalidad de los ratones, a partir del día 7 a la dosis de 3,5 mg/kg (1 ratón muerto de cada 7), a partir del día 9 a la dosis de 3,0 mg/kg (2 ratones muertos de cada 7) y a partir del día 11 a las dosis de 2,5 y 2,0 mg/kg (respectivamente 2 y 1 ratón muertos de cada 7).

65 Ningún ratón sobrevivió al día 12 (dosis de 3,5 mg/kg), al día 19 (dosis de 3,0 mg/kg) y al día 29 (dosis de 2,0 mg/kg). El único ratón superviviente al día 43 es uno al que se inyectó a la dosis de 2,5 mg/kg. Estos resultados confirman los descritos anteriormente (D. Deprez-De Campeneere y A. Trouet. DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-DNA, Eur. J. Cancer, 16 (1980), págs. 981-986).

La figura 15 indica que cualquiera que sea la dosis administrada, los ratones acusan una pérdida de peso que alcanza el 30% del peso inicial. Esta pérdida de peso es generalmente irreversible, salvo para un ratón tratado con 2,5 mg/kg, que ha recuperado su peso inicial el día 30.

5 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es administrada por vía i.p. durante 5 días consecutivos a dosis totales comprendidas entre 10 y 45 mg/kg, no se observa ninguna mortalidad. A la dosis de 60 mg/kg, 2 ratones mueren el día 22 y un tercero el día 35 (figura 16).

10 A las dosis totales comprendidas entre 10 y 45 mg/kg, no se observa ninguna pérdida de peso, sino más bien una ganancia ponderal de $\pm 40\%$ en 40 días (figura 17). El análisis de las curvas de peso no demuestra ninguna diferencia significativa. Por el contrario, a la dosis de 45 mg/kg, el peso medio de los ratones es estable durante los 7 primeros días, después el aumento de peso sólo alcanza el 20% en el transcurso de los 30 días siguientes. A la dosis total de 60 mg/kg, el peso medio de los ratones disminuye un ± 15 en 15 días. Los dos ratones supervivientes sólo recuperan su peso inicial el día 36 (figura 17).

15 Estos datos indican que la dosis de 60 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es cercana a la de DL50 y que, por tanto, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es al menos 30 veces menos tóxica que la DNR, en términos de toxicidad aguda tras la administración i.p., 5 días consecutivos.

20 *Toxicidad por vía intravenosa*

Tal y como se ilustra en la figura 18, en lo que respecta a la DNR dada por vía i.v. en administración única a ratones NMRI hembras, no se observa ninguna mortalidad a dosis débiles (10, 15 y 20 mg/kg). A 25 mg/kg, 6 ratones mueren respectivamente los días 12, 17, 20, 28, 34 y 42. A concentraciones más elevadas de DNR, la mortalidad comienza el día 7 (1 ratón de 7 a la dosis de 30 mg/kg) y el día 6 (2 ratones de 7 a la dosis de 35 mg/kg). Estos resultados son conformes a los descritos anteriormente (D. Deprez-De Campeneere y A. Trouet. DNA-Anthracycline Complexes. I. Toxicity in mice and chemotherapeutic activity against L1210 Leukaemia of Daunorubicin-DNA and Adriamycin-DNA, Eur. J. Cancer, 16 (1980), págs. 981-986).

30 Los resultados de la figura 19 indican que la pérdida ponderal media es máxima el día 7 y es más importante cuanto más elevada es la dosis administrada, no recuperando los ratones supervivientes a las dosis de 30 y 35 mg/kg su peso inicial hasta 30 días después de la inyección i.v. de la DNR.

35 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es administrada para vía i.v. a la dosis de 30 mg/kg, no se observa ninguna mortalidad y el peso medio de los ratones aumenta un $\pm 40\%$ en 40 días (figura 20). El peso medio de los ratones al final del experimento es similar al observado a la misma dosis de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR administrada por vía i.p. Por el contrario, a la dosis de 60 g/kg, 2 ratones mueren a lo largo de los 5 minutos tras la inyección. Esta mortalidad puede ser debida a una hipervolemia después de la inyección demasiado rápida del producto. Los 3 ratones supervivientes, después de un ligero adelgazamiento hasta el día 2, recuperan su peso inicial, después aumentan de peso ($\pm 30\%$ en 40 días). A la dosis de 120 mg/kg, los 5 ratones mueren a lo largo de los 7 minutos siguientes a la inyección, con signos clínicos de toxicidad.

45 Cuando la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR es administrada por vía i.v. a la dosis total de 60 mg/kg, fraccionada en dos inyecciones i.v. de 30 mg/kg cada una, dos días consecutivos, no se observa ninguna mortalidad. No hay diferencia en la evolución del peso medio de los ratones que han recibido 1 vez 30 mg/kg y los que hayan recibido 2 veces 30 mg/kg de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR (figura 21).

3. Conclusiones

50 Los resultados obtenidos permiten concluir que tanto por vía intravenosa como por vía intraperitoneal, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR tiene una toxicidad aguda mucho menos elevada que la de la DNR, en términos de letalidad. Estos resultados confirman la reducción de toxicidad del derivado β -Ala-Leu-Ala-Leu-DNR.

55 Unos experimentos idénticos a los descritos anteriormente han sido realizados con derivados de doxorubicina.

Ejemplo 12

60 *Acumulación en células tumorales MCF7/6 y células no tumorales MRC5 de la DOX, de la L-Leu-DOX y de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX*

65 Las células del carcinoma mamario humano MCF7/6 y de la línea de fibroblastos humanos MRC5 han sido incubadas en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX a una concentración de 10 μ g eq. DOC/ml. Tras algunos momentos, la acumulación de las prodrugas y de sus metabolitos fluorescentes ha sido determinada por HPLC tras la extracción de los productos de pH básico, según un procedimiento puesto a punto en el laboratorio. Las acumulaciones, expresadas en μ g/mg de proteínas celulares, han sido comparadas a las de la DOX y de L-Leu-DOX. Los metabolitos han sido identificados por determinación de los tiempos de retención de productos de referencia sintetizados en el laboratorio.

ES 2 297 832 T3

La DOX se acumula principalmente en las células MCF7/6 esencialmente en forma inmodificada y, tras 6 horas, se alcanza una tasa intracelular de 6,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas celulares (figura 23).

	Acumulación después de 6 h			CI ₅₀
	(g/mg proteínas celulares)			(g/ml)
	A-L-A-L-DOX	Leu-DOX	DOX	(72 h)
MCF7/6 DOX	-	-	6,90	0,0025
Leu-DOX	-	1,10	0,25	0,02
A-L-A-L-DOX	0,10	0,65	0,22	3,0
MRC5 DOX	-	-	11,20	0,018
Leu-DOX	-	1,40	0,30	0,3
A-L-A-L-DOX	0,10	0,10	0,01	120

La Leu-DOX y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX se acumulan respectivamente 6 veces y 69 veces menos que la DOX tras 6 horas. Intracelularmente, las tasas de DOX son 31 veces menos elevadas tras la incubación de las células en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figuras 24 y 25).

En las células de fibroblastos MRC5, incubadas durante 6 horas en presencia de antraciclinas a la concentración de 10 μg eq. DOX/ml, la DOX se acumula esencialmente en forma inmodificada y la acumulación alcanza una tasa de 11,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas celulares tras 6 horas (figura 26).

La L-Leu-DOX se acumula a tasas menores, alcanzándose la acumulación 1,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas celulares. El metabolito principal es la DOX (0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas celulares) (figura 27).

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX se acumula 112 veces menos que la DOX tras 6 horas. Intracelularmente, las tasas de DOX son 1100 veces menos elevadas tras la incubación de las células en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figura 28).

Estos resultados muestran que, como tal, la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX no vuelve prácticamente a las células y que debe anteriormente ser hidrolizada en el medio exterior en forma de Leu-DOX antes de volver a las células o intracelularmente la Leu-DOX puede a continuación generar la DOX (figura 22).

Estos resultados muestran igualmente que las tasas intracelulares del agente terapéutico activo son dos veces más elevadas que en las células tumorales en el caso de la DOX. Por el contrario, en el caso de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, las tasas intracelulares de DOX son 22 veces más elevadas en las células tumorales MCF7 comparativamente a las células no tumorales MRC5.

Ejemplo 13

Citotoxicidad *in vitro* frente a células tumorales MCF7/6 y células no tumorales MRC5

Las citotoxicidades de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX, de la L-Leu-DOX y de la DOX han sido determinadas en células MCF7/6 y MRC5 en crecimiento en placas de 96 pocillos, incubadas en presencia de concentraciones crecientes de los diversos compuestos. Después de 72 horas, las células son incubadas durante 48 horas en ausencia de antraciclina y la citotoxicidad es determinada por la medición de las proteínas celulares por la técnica de Bradford. Se utiliza una gama de 9 concentraciones, yendo de 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 0,0035 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y cada medición representa una media y una desviación estándar de 6 valores. Los puntos experimentales son ajustados a una curva sigmoide que permite calcular el punto de inflexión correspondiente a la dosis a la cual sobrevive la mitad de las células (CI50).

La tabla del ejemplo 12 recupera los CI50 que son respectivamente de 0,0025, 0,020 y 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente para la DOX, la L-Leu-DOX y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX para las células del carcinoma mamario humano MCF7/6. Para las células de la línea de fibroblastos humanos MRC5, los valores son, respectivamente, de 0,018, 0,30 y 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Estos resultados indican que la Leu-DOX y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX son respectivamente 8 veces y 1000 veces menos citotóxicas que la DOX para las células del carcinoma mamario humano MCF7/6 fibroblásticos mantenidos en crecimiento durante 72 horas en presencia de las antraciclinas. En lo que respecta a las células MRC5, la Leu-DOX y la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX son respectivamente 17 veces y 6700 veces menos citotóxicas que la DOX para las células mantenidas en crecimiento durante 72 horas en presencia de antraciclinas.

ES 2 297 832 T3

La β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX es 40 veces más tóxica para las células tumorales MCF7 que para las células no tumorales MRC5. Esto debe relacionarse con las tasas intracelulares más importantes de DOX que han sido observadas en las células MCF7 incubadas en presencia de β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX (figuras 29 y 30).

El compuesto se caracteriza generalmente por una mayor actividad en los modelos de tumores sólidos (por ejemplo, por inyección de células tumorales por vía subcutánea) que en los modelos de tipo “leucémico” obtenidos tras la inyección intravenosa de las células tumorales.

Las células tumorales inyectadas por vía subcutánea forman un tumor sólido en el lugar de la inyección y la concentración local de las hidrolasas secretadas por estas células seguirá siendo considerable. Cuando las células tumorales son inyectadas por vía intravenosa, las hidrolasas que secretan serán inmediatamente diluidas en el flujo sanguíneo.

Ejemplo 14

Toxicidad aguda in vivo

Además, la administración de la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX a ratones atímicos se ha implantado un tumor mamario humano MCF7/6 reduce la evolución del tumor canceroso (figura 31) sin afectar de manera importante el peso medio de los ratones tratados (figura 32).

Estos experimentos han sido realizados según los protocolos descritos en el ejemplo 11.

Los inventores han caracterizado igualmente la (las) proteasa(s) secretada(s) en el medio extracelular de células de carcinoma mamario humano que puede(n) hidrolizar la β -Ala-Leu-Ala-Leu-DOX. Se confirma que esta(s) proteasa(s) no se corresponde(n) con ninguna proteasa descrita hasta el momento.

En efecto, la enzima denominada provisionalmente “COUM” es una metaloproteasa que puede ser inhibida por los quelatores de metales como la EDTA y necesita para su actividad el ion cobalto. Su pH óptimo se sitúa entre 7,5 y 8,0, lo cual excluye que sea una cathepsina.

Por cromatografía de alto rendimiento y por electroforesis en presencia de sulfato de laurilo, se observan varias bandas de pesos moleculares más elevados de 70 kD.

REIVINDICACIONES

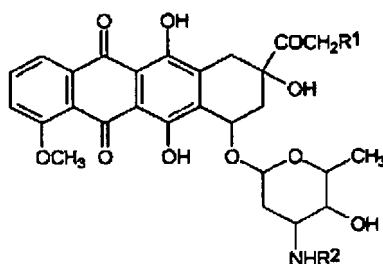
1. Compuesto (W-Z-M) que comprende un agente terapéutico antitumoral (M) que posee un sitio activo intracelular (S.A.), unido a un ligando (W-Z), que comprende un brazo (Z) unido a un grupo terminal (W), **caracterizado** porque el enlace entre el grupo terminal (W) y el brazo (Z), así como el enlace entre el brazo (Z) y el elemento (M) son enlaces covalentes que no afectan a las propiedades del compuesto (W-Z-M), porque el brazo (Z) del ligando (W-Z) es un péptido constituido por al menos dos aminoácidos eventualmente sustituidos, porque el grupo (W) es la β -Alanina de fórmula: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, y porque el enlace entre el elemento (M) y el brazo (Z) del ligando (W-Z) es una unión peptídica.

2. Compuesto según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el brazo (Z) del ligando (W-Z) se elige entre el grupo constituido por las secuencias peptídicas siguientes: L-Leucil-L-Alanil-L-Leucil-, L-Leucil-L-Alanil-, L-Alanil-L-Leucil-L-Fenilalanil-, L-Alanil-L-Leucil-.

3. Compuesto según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agente terapéutico antitumoral (M) es escogido entre el grupo constituido por las antraciclinas, los derivados de ácido fólico, los alcaloides de la vinca, la caliqueamicina, la mitoxantrona, los arabinósidos de la citosina (ARA-C) o arabinósidos de la adenosina (ARA-A), el fosfato de fludarabina, el melfalán, la bleomicina, la mitomicina, la L-canavanina, los taxoides, la camptotecina y sus derivados, en particular el TOPOTECAN® (hidrocloruro de 9-dimetilaminometilo-10-hidroxicamptotecina), eventualmente unidos a un aminoácido sustituido o no.

4. Compuesto según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el agente terapéutico (M) es la doxorubicina o la daunorrubicina, eventualmente unidas a un aminoácido sustituido o no.

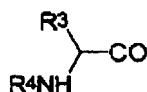
5. Compuesto según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el agente terapéutico (M) corresponde a la fórmula general:



en la que:

R^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo OH,

R^2 es un átomo de hidrógeno o un radical de fórmula

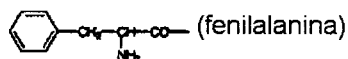
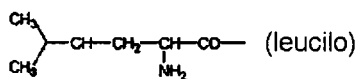


en la que:

R^3 es un átomo de hidrógeno o un radical alquilo, eventualmente sustituido.

R^4 representa un átomo de hidrógeno o forma con R^3 un radical alquilenos que incluye 3 ó 4 átomos de carbono.

6. Compuesto según la reivindicación 5, **caracterizado** porque R^2 es un radical de fórmula



o uno de sus isómeros.

ES 2 297 832 T3

7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto (W-Z-M) que comprende un agente terapéutico anti-tumoral (M) que posee un sitio activo intracelular (S.A.) unido a un ligando (W-Z), que comprende un brazo (Z) unido a un grupo terminal (W), **caracterizado** porque el enlace entre el grupo terminal (W) y el brazo (Z) así como el enlace entre el brazo (Z) y el elemento (M) son enlaces covalentes que no afectan a las propiedades del compuesto (W-Z-M),
5 porque el brazo (Z) del ligando (W-Z) es un péptido constituido por al menos dos aminoácidos eventualmente sustituidos, porque el grupo (W) es la β -Alanina de fórmula: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, y porque el enlace entre el elemento (M) y el brazo (Z) del ligando (W-Z) es una unión peptídica, y eventualmente un adyuvante o vehículo farmacéutico aceptable.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su utilización como medicamento.

9. Utilización de la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores cancerosos.

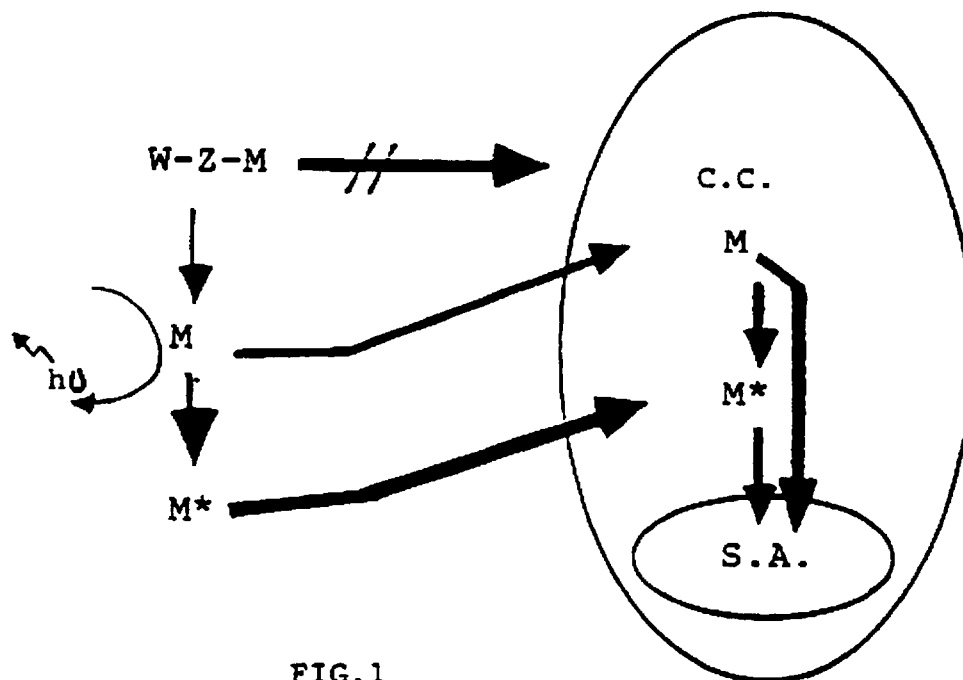


FIG. 1

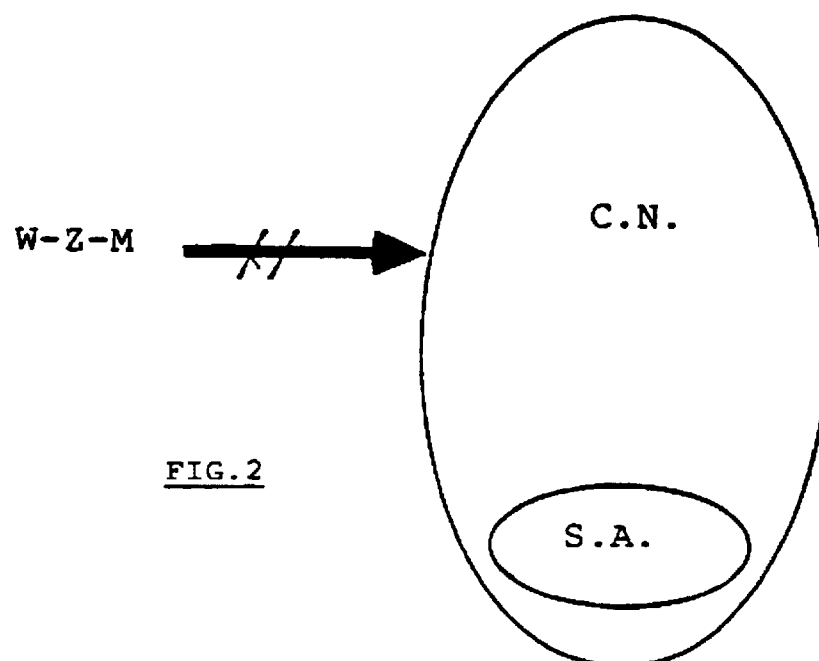


FIG. 2

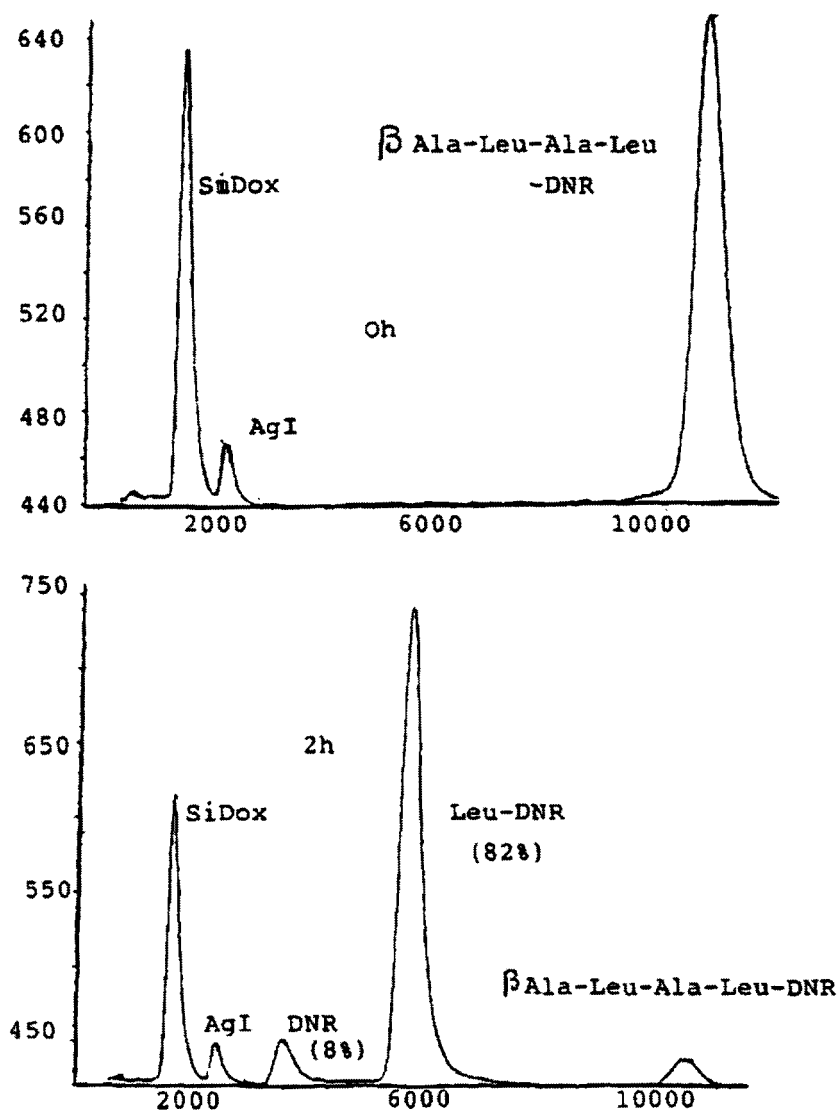


FIG. 3

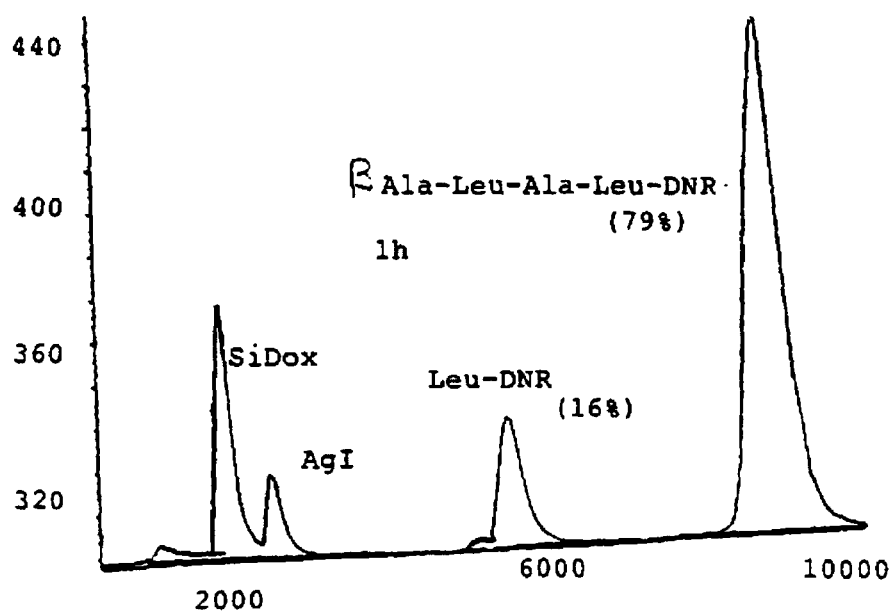
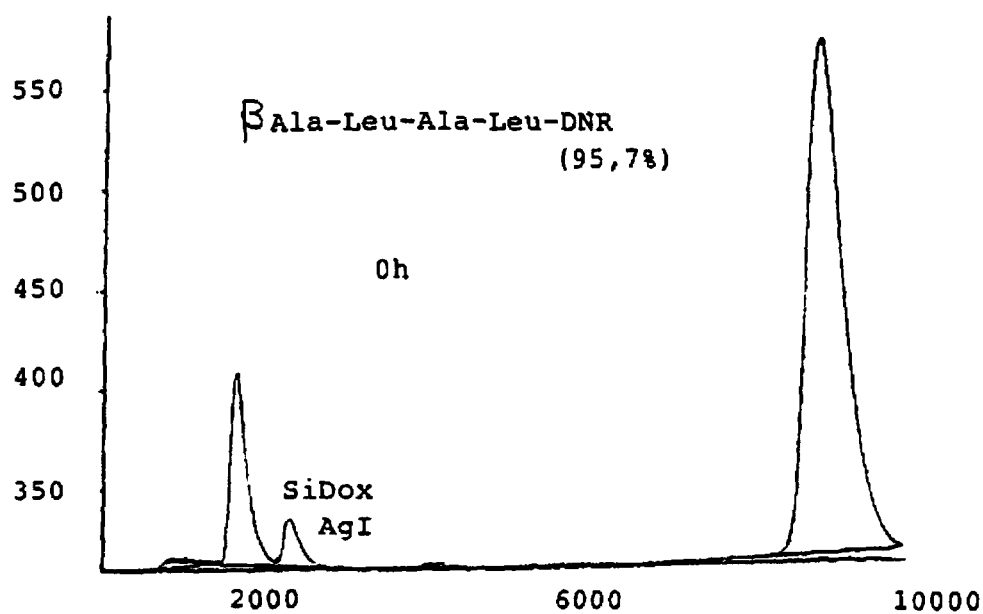


FIG. 4

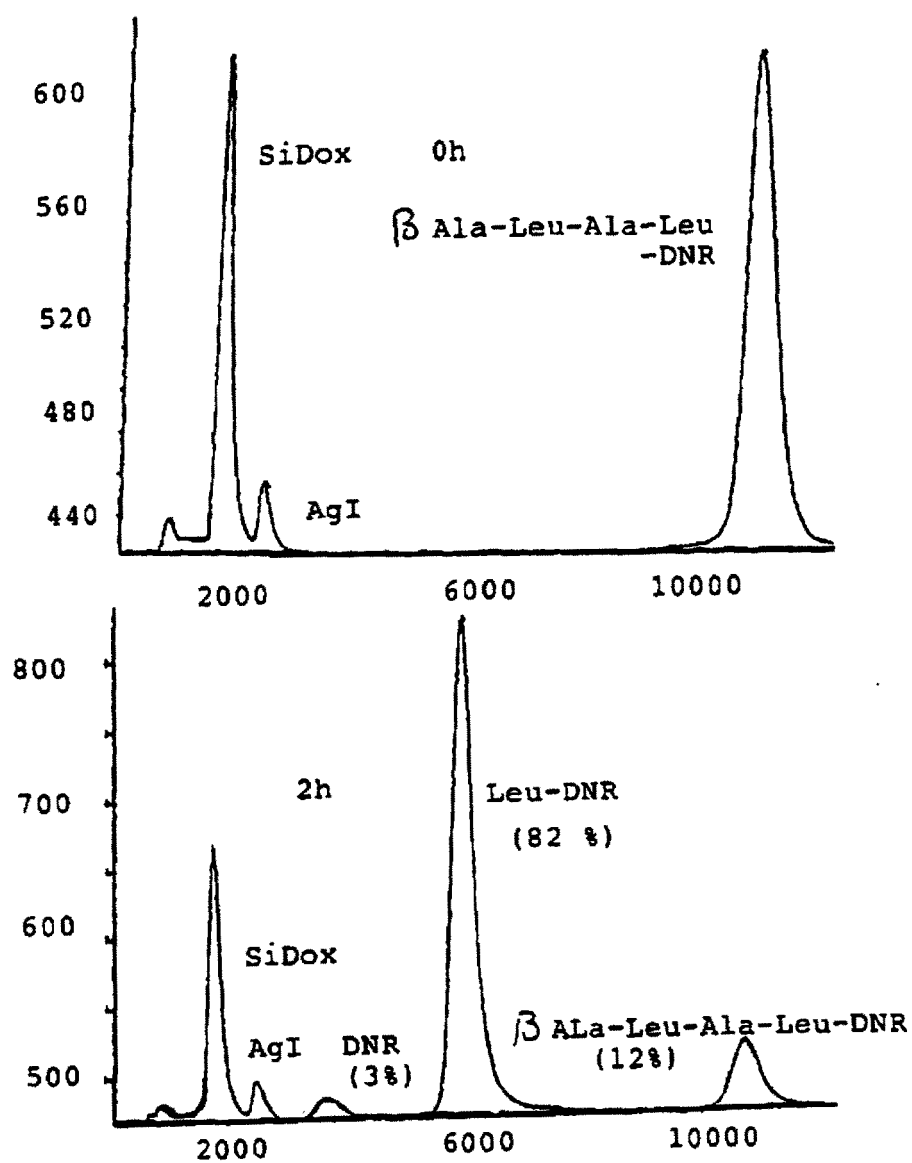
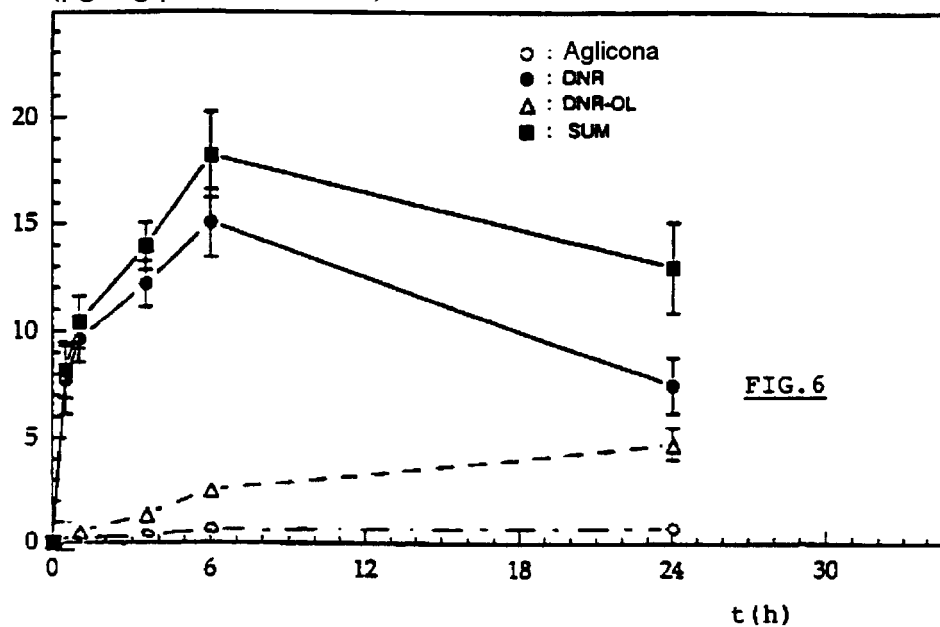
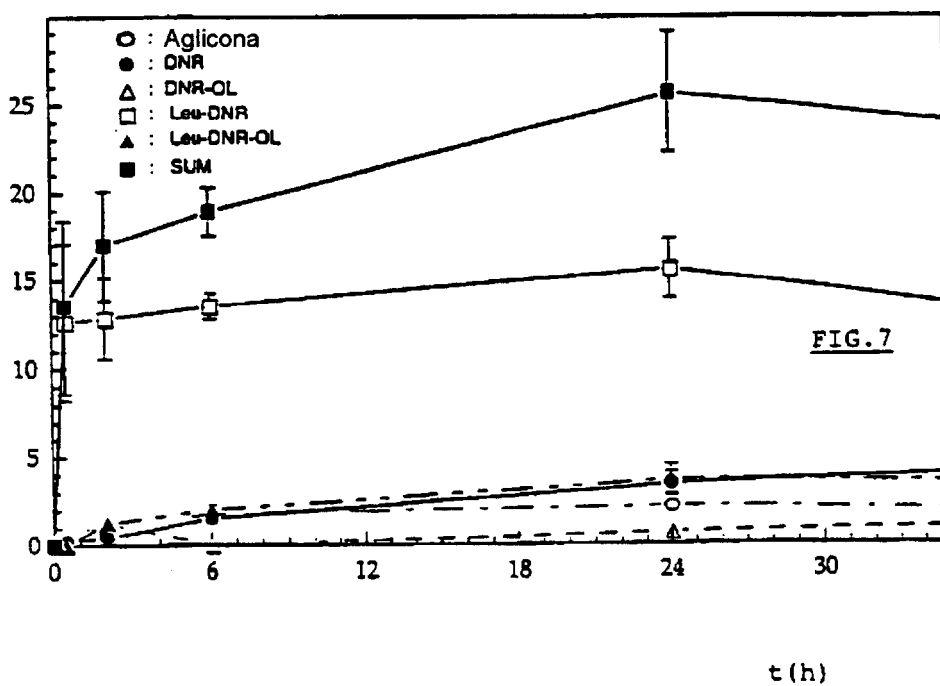


FIG. 5

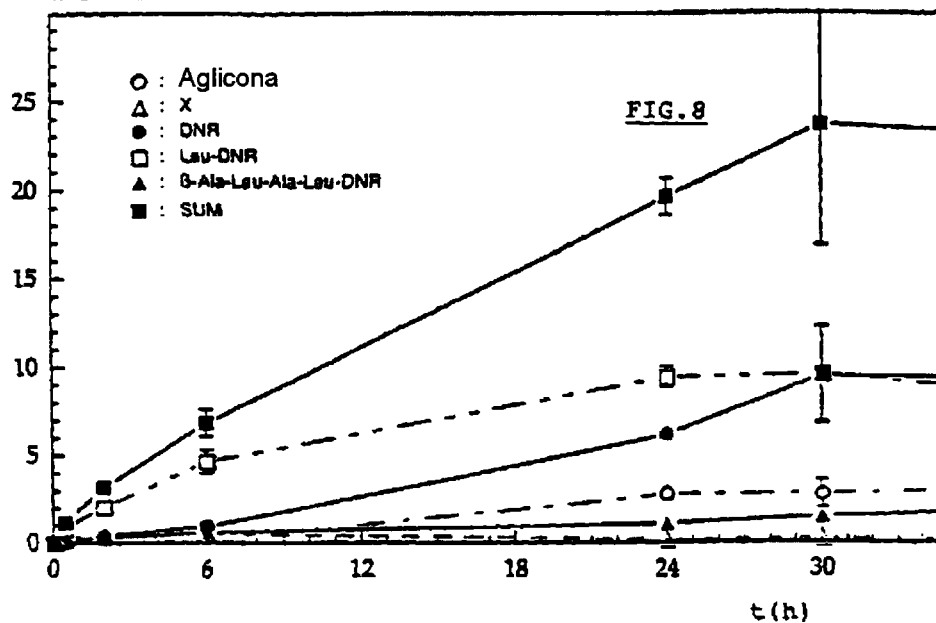
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



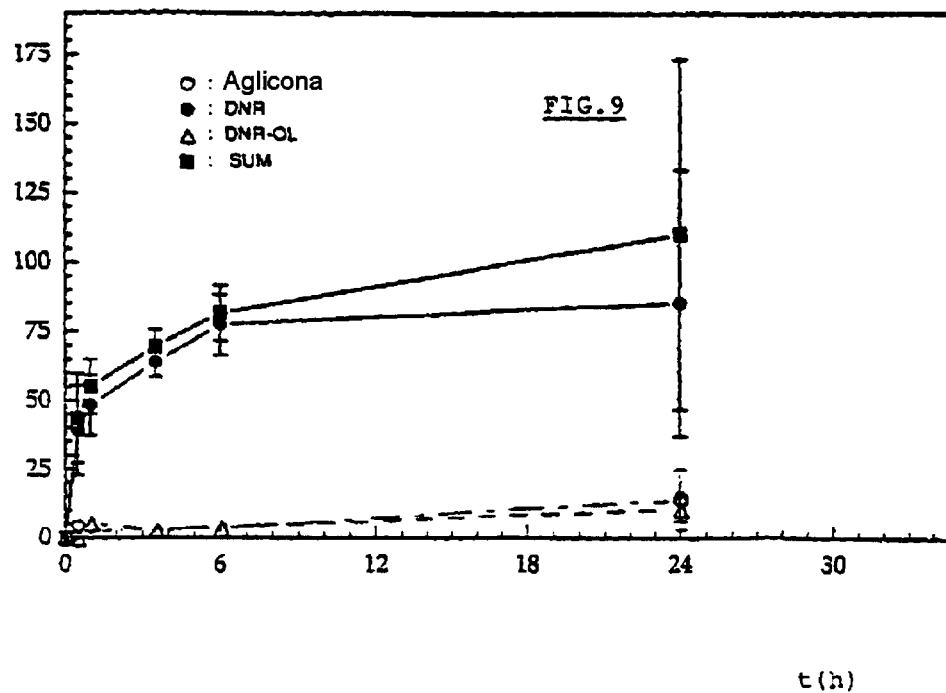
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



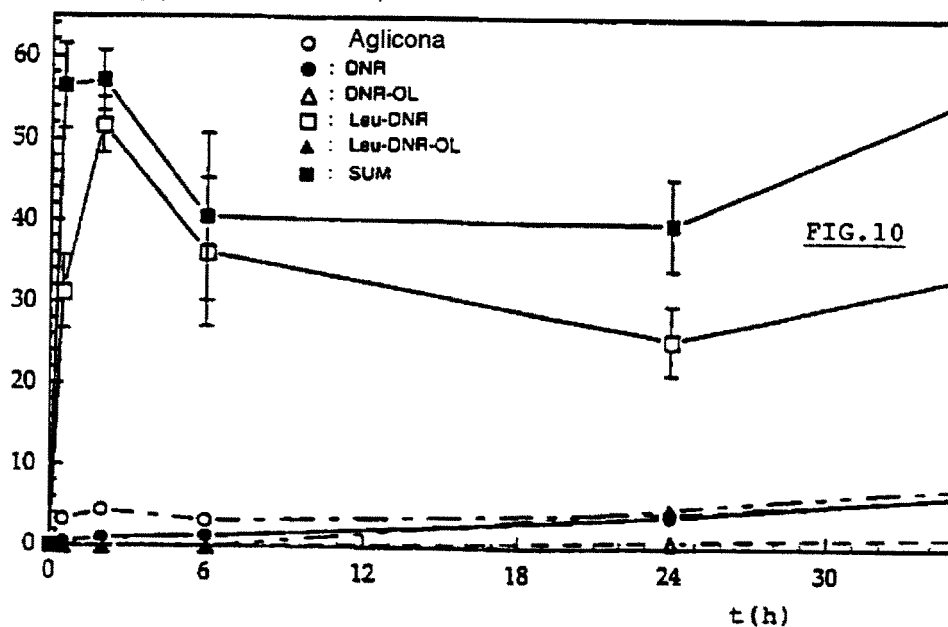
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



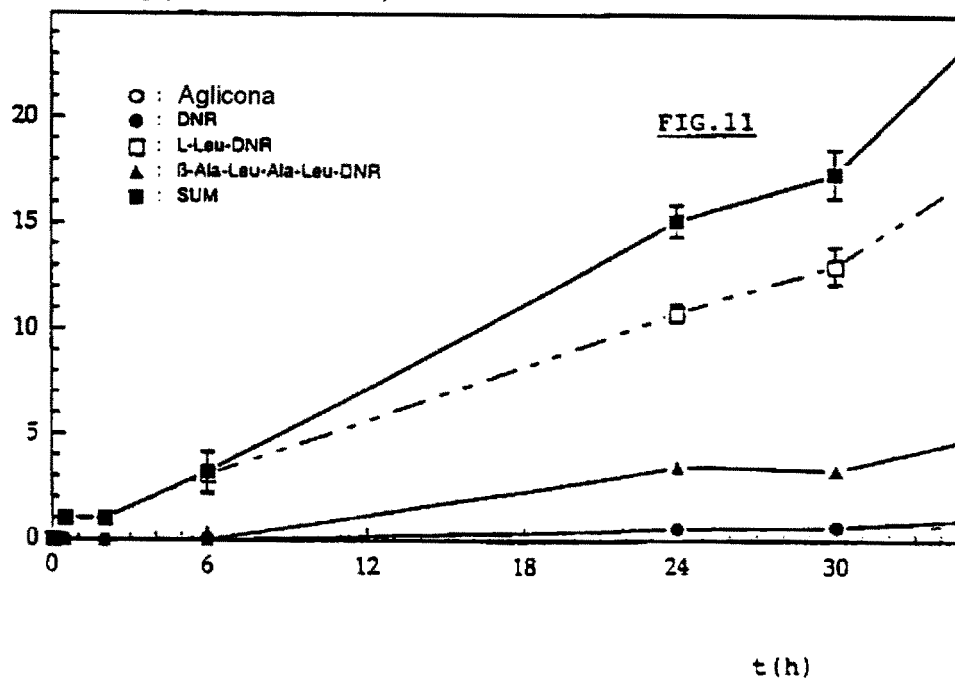
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



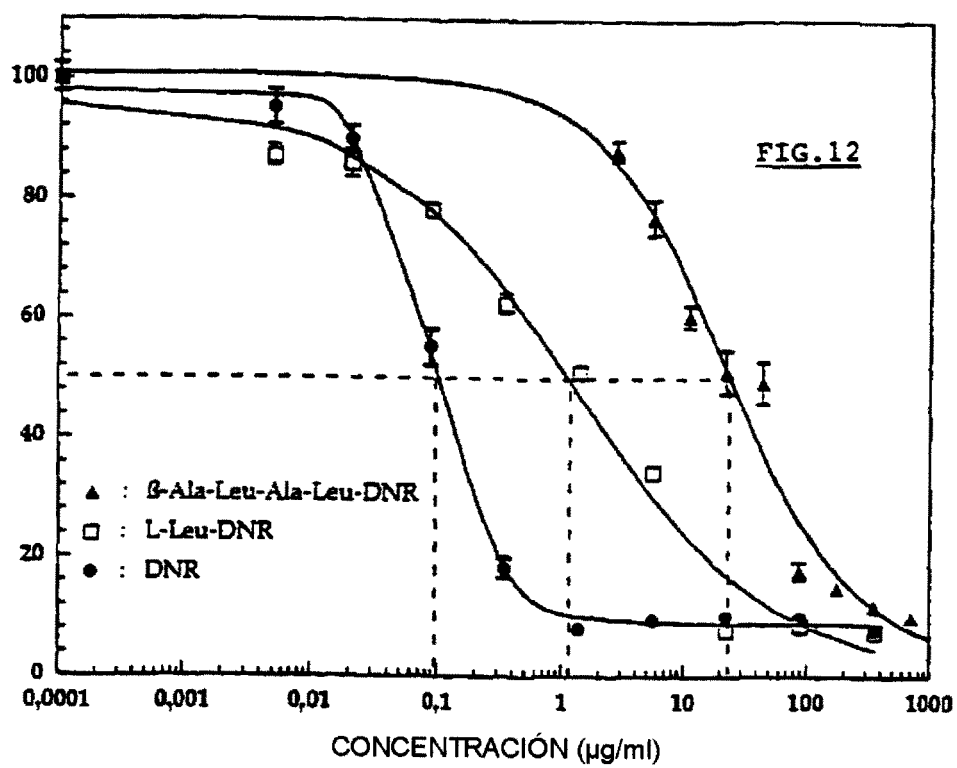
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



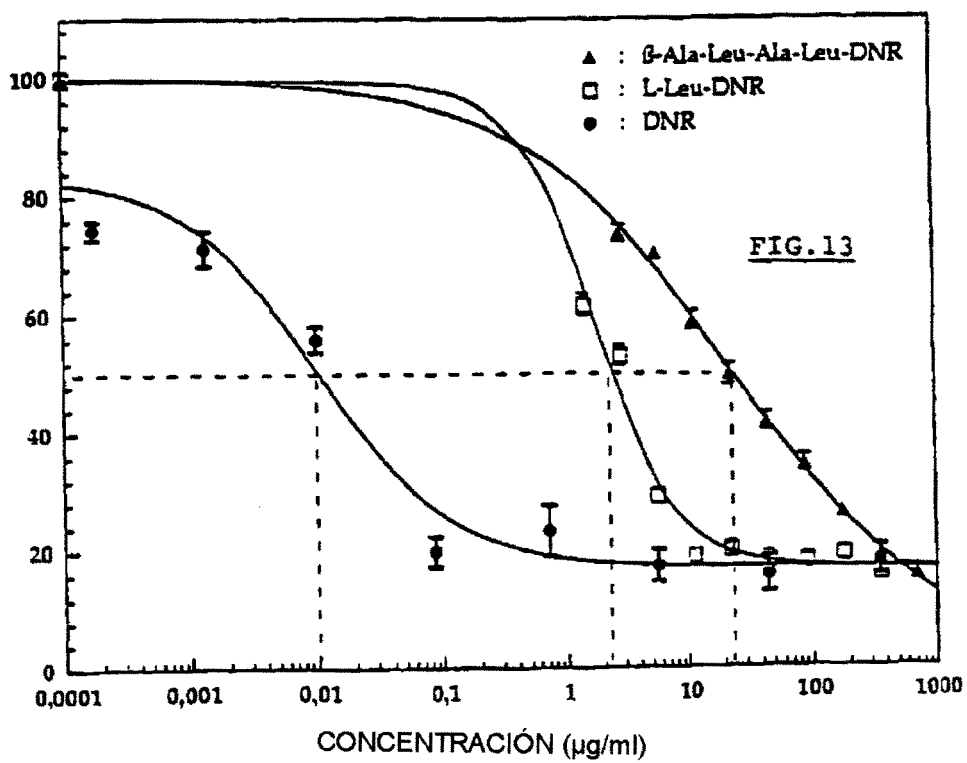
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)

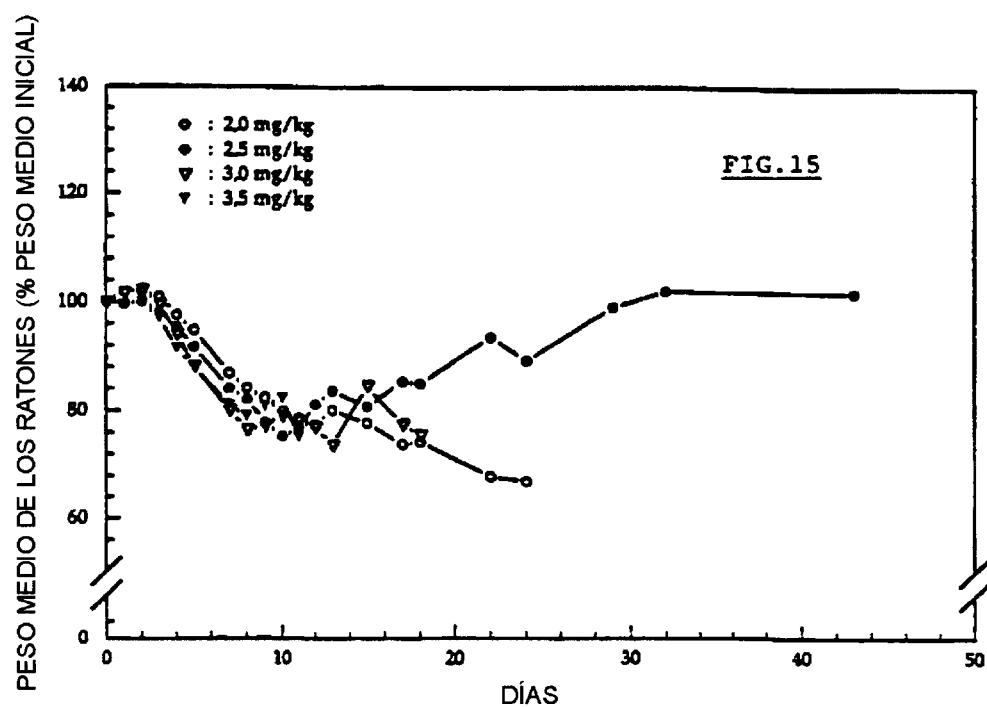
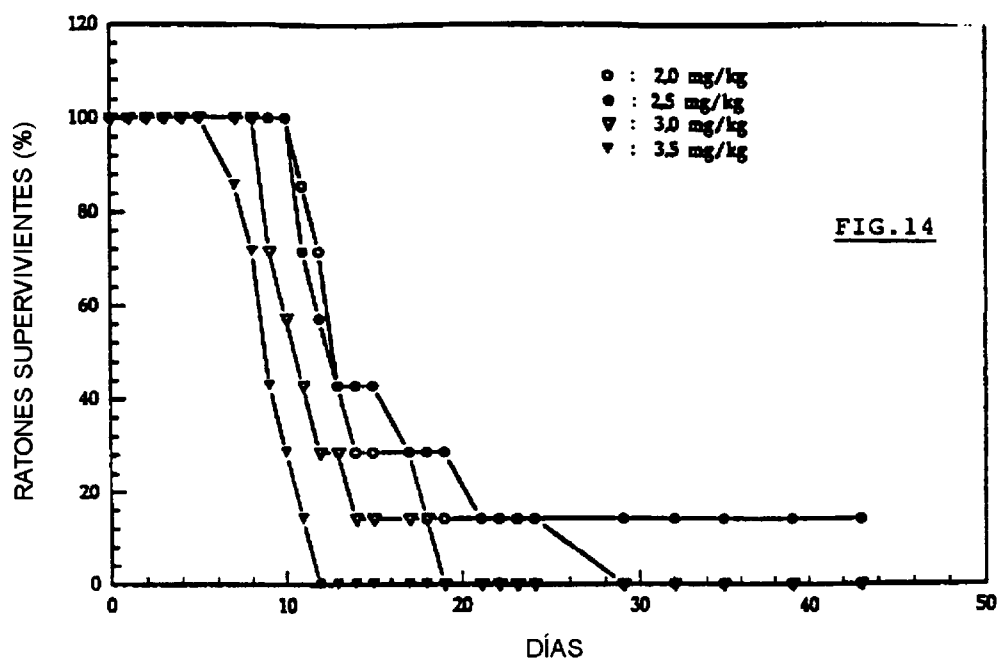


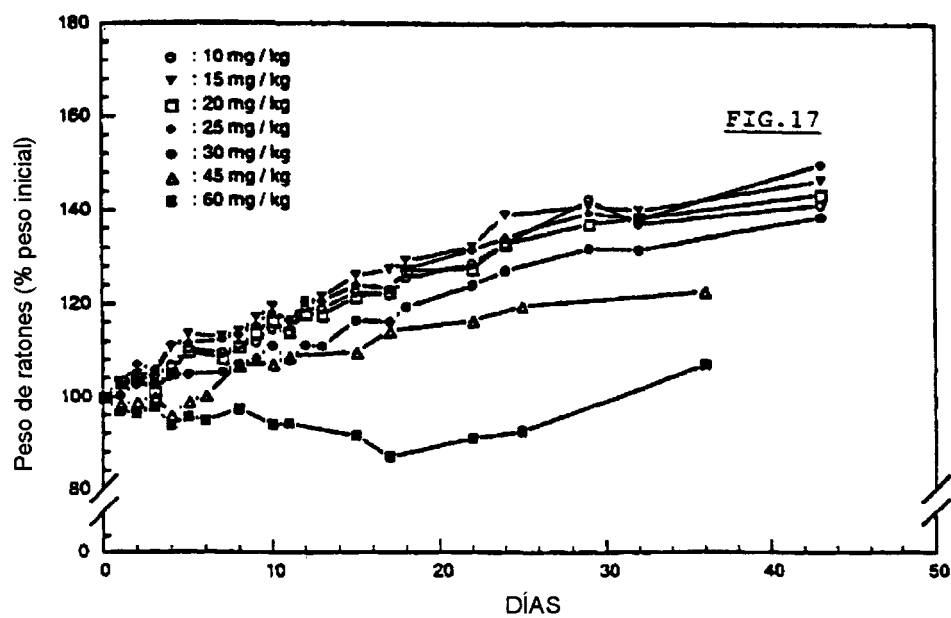
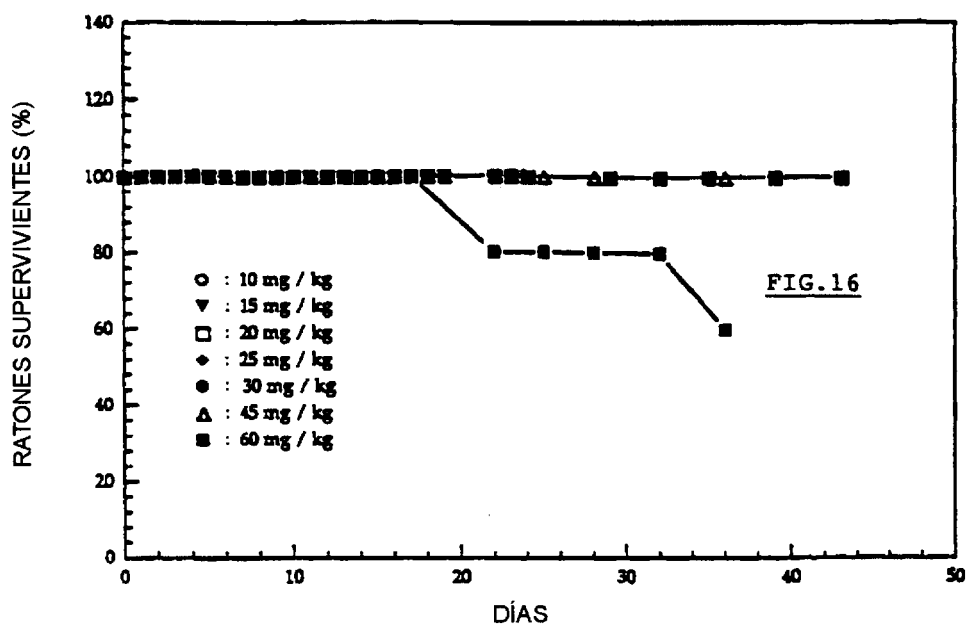
8

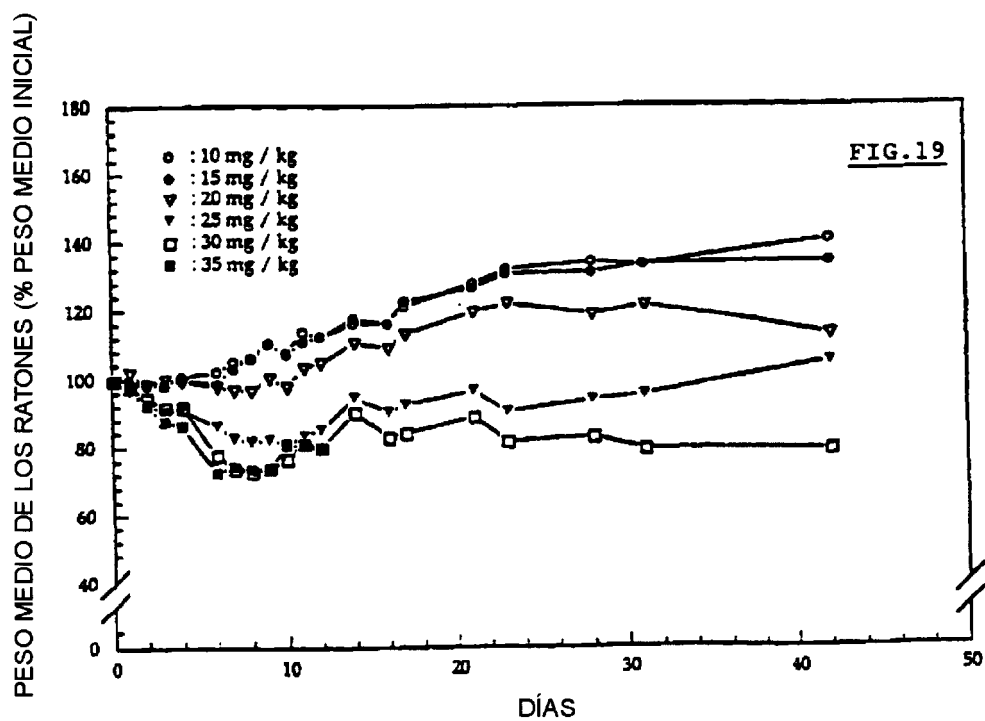
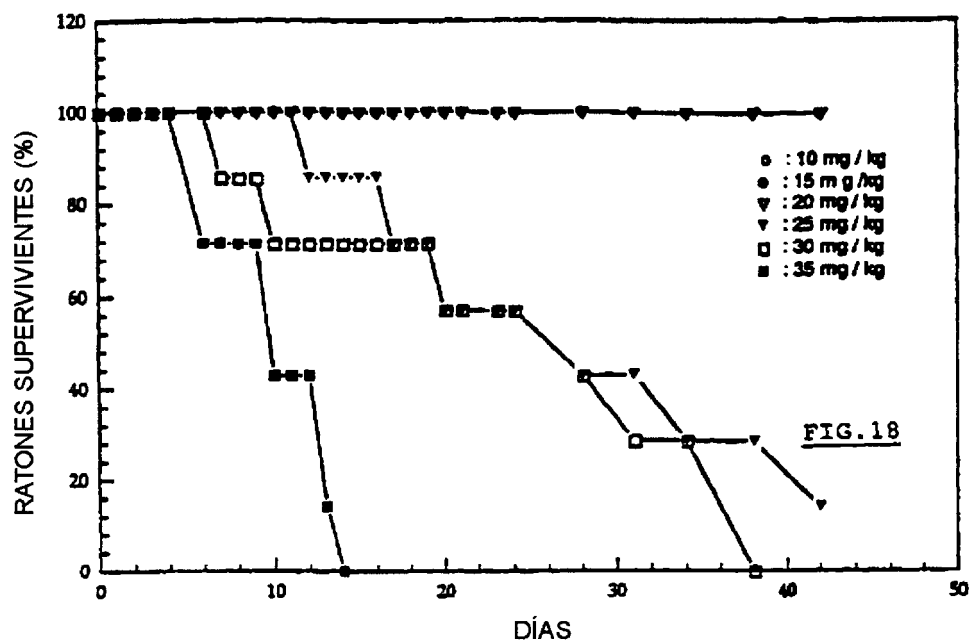


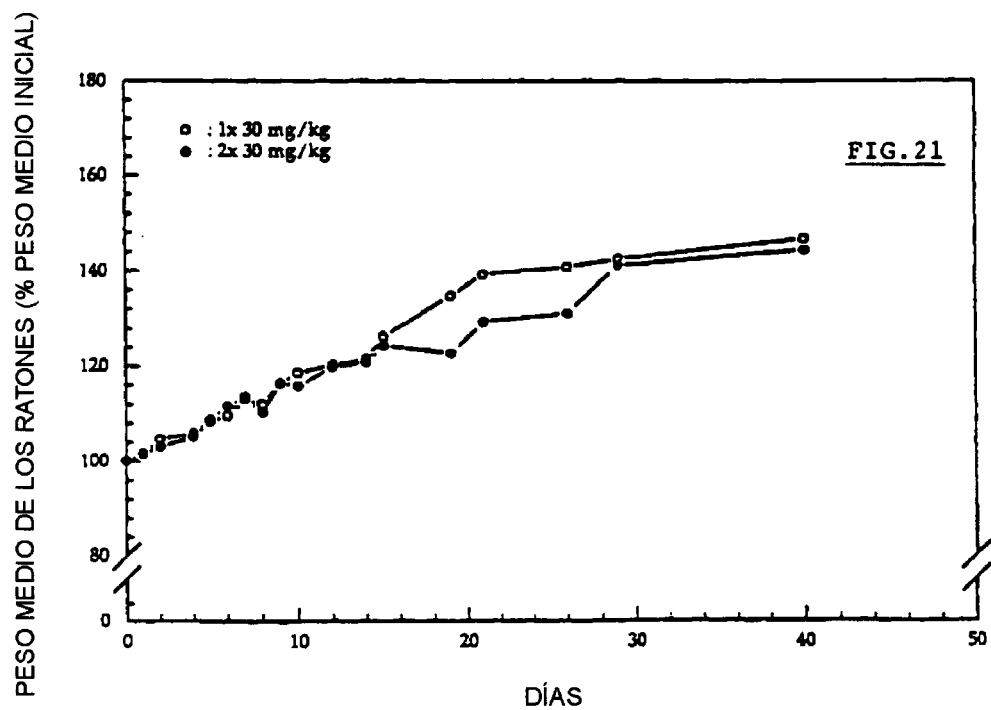
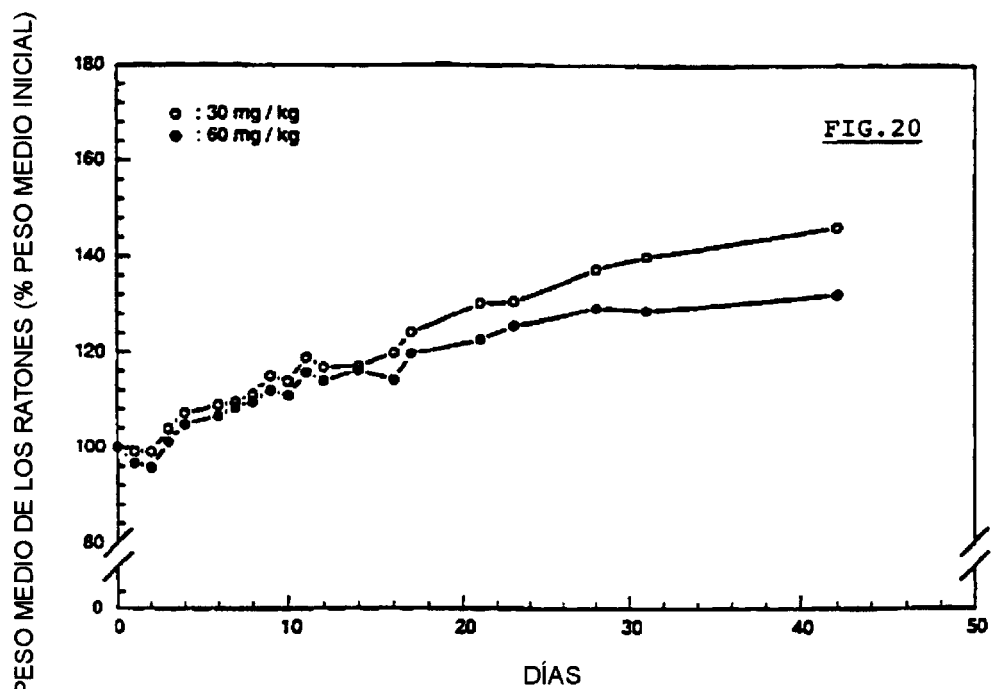
3











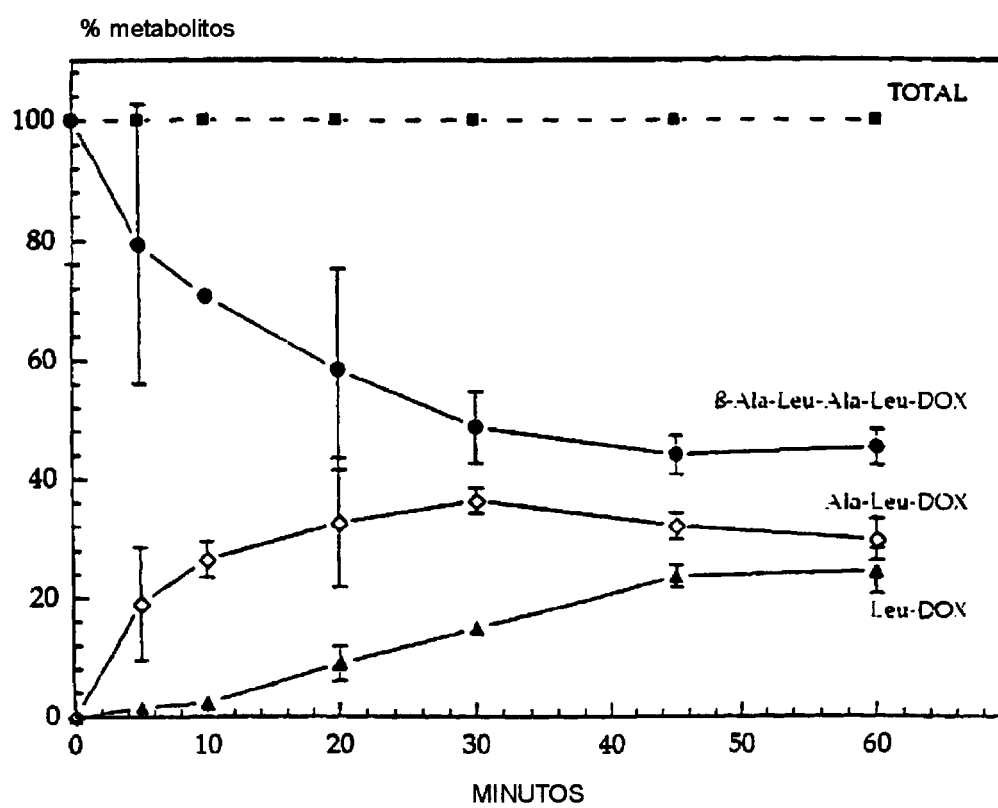
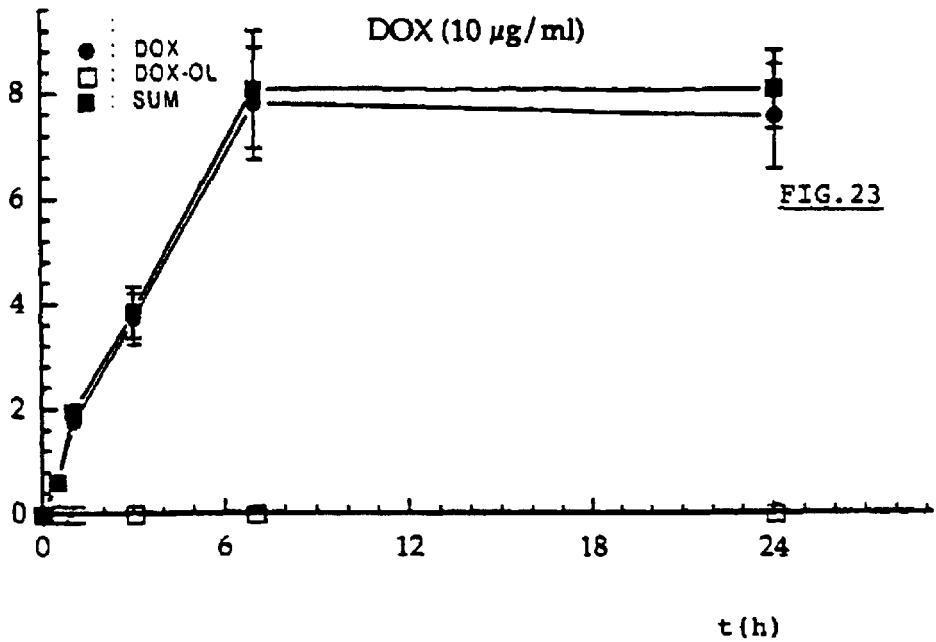
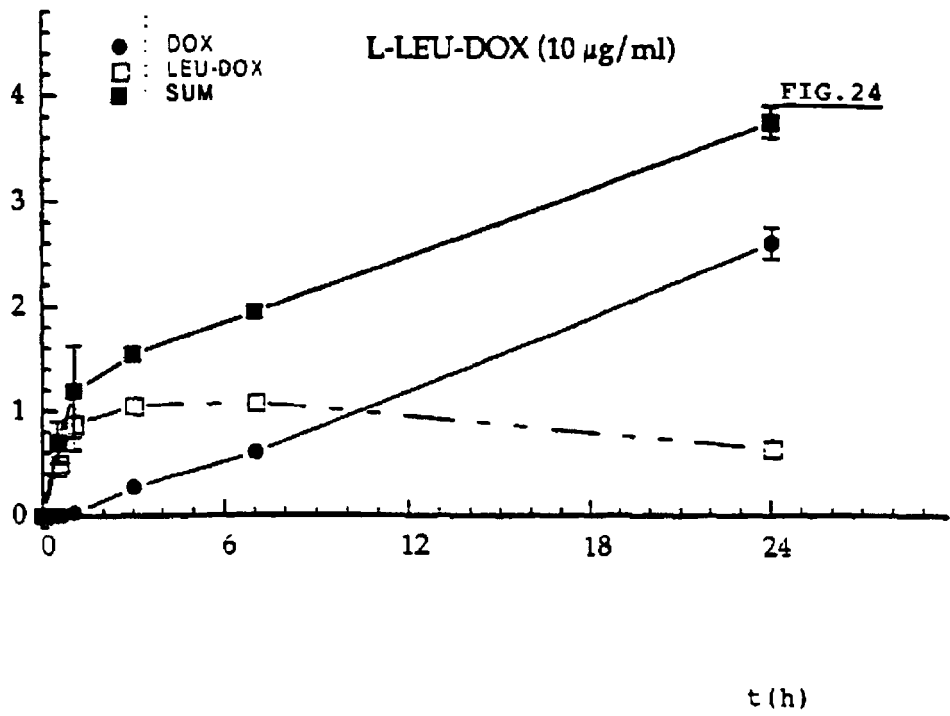


FIG. 22

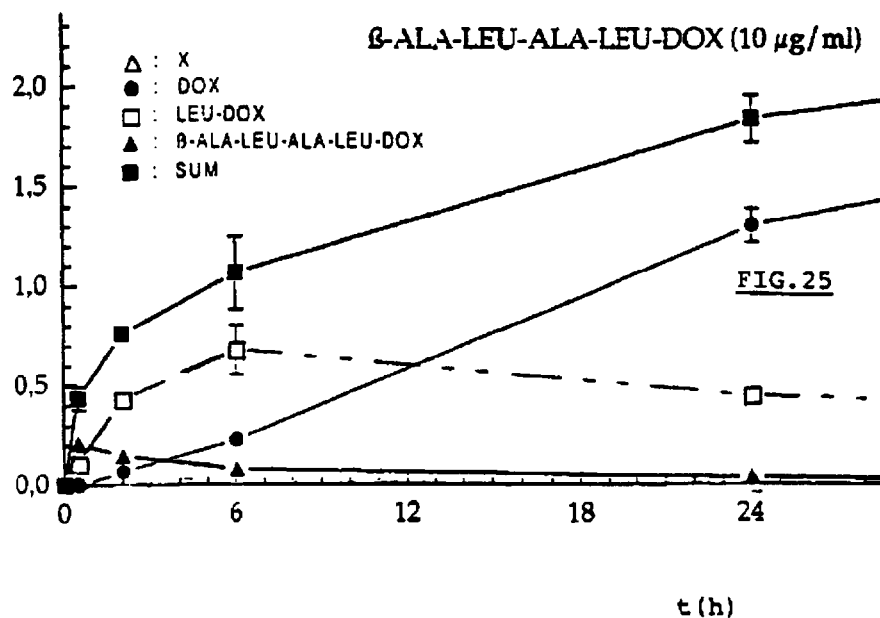
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



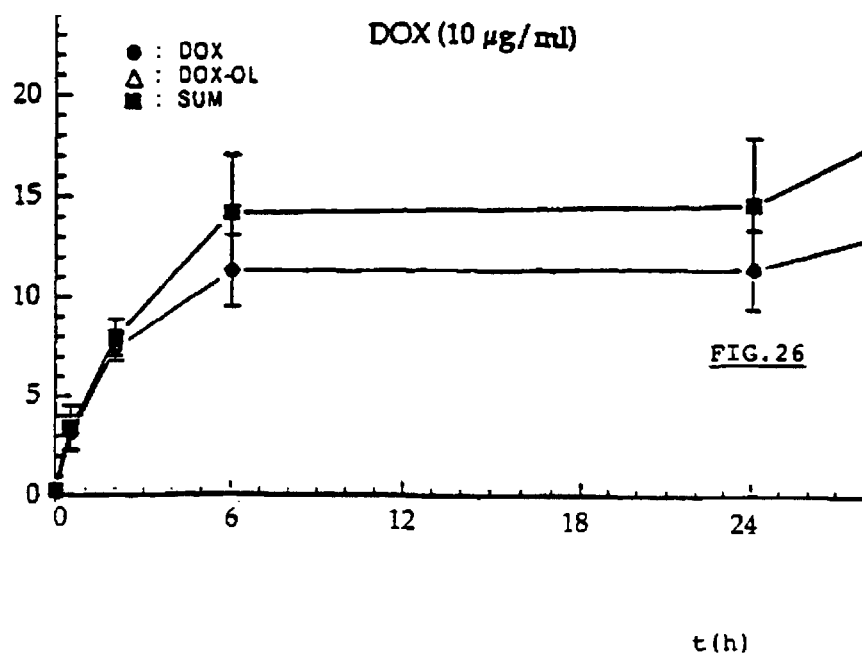
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



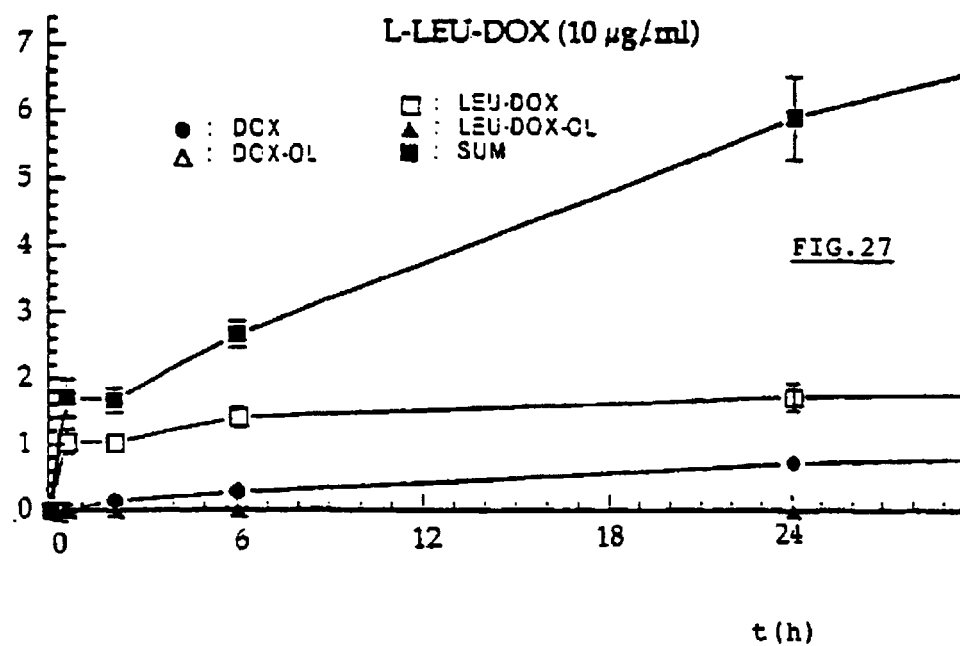
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



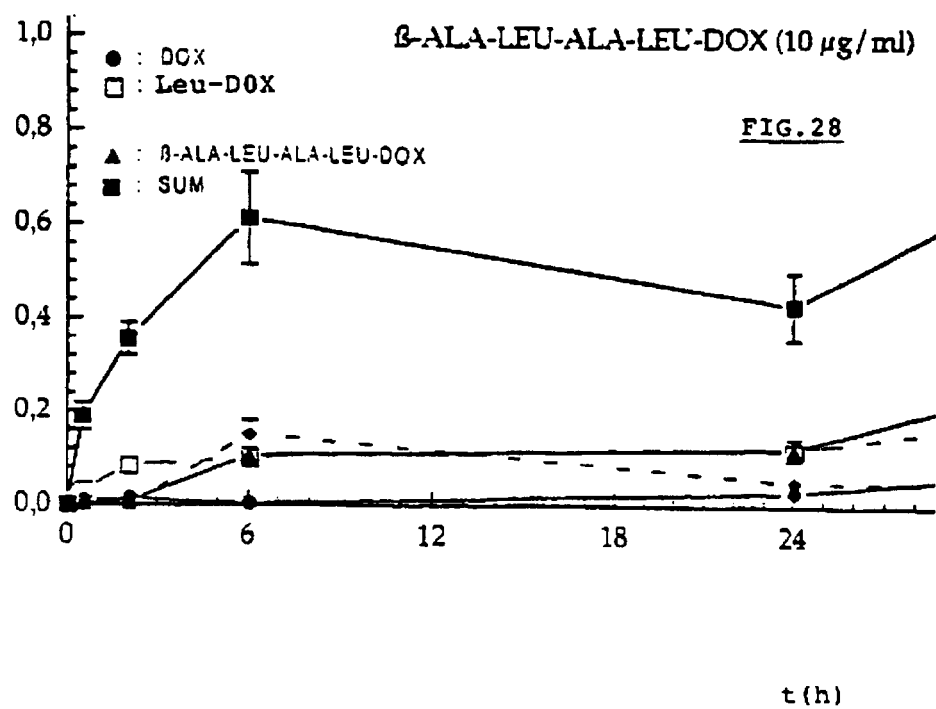
Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)

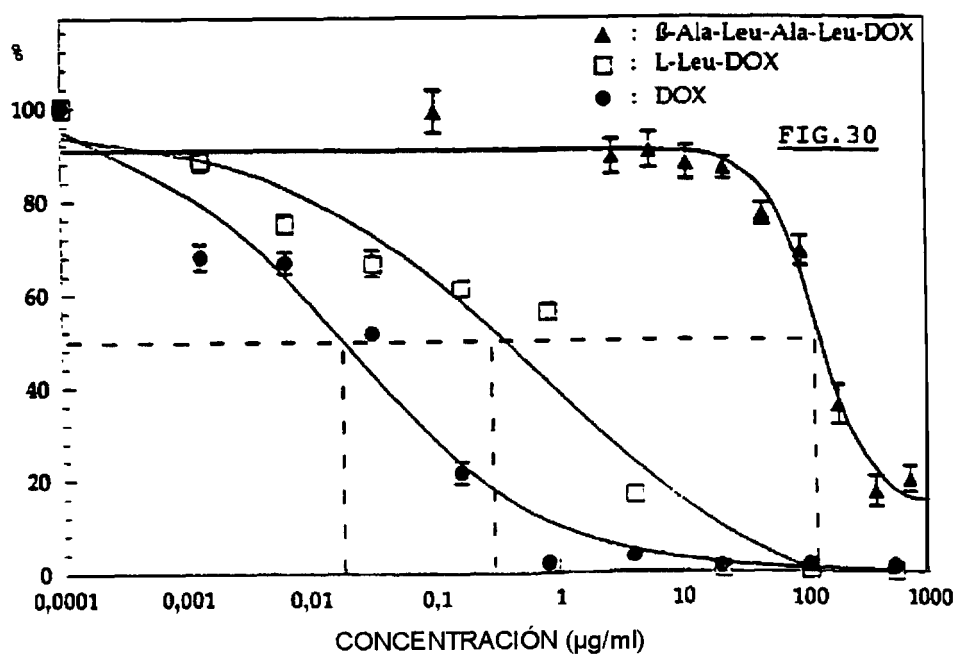
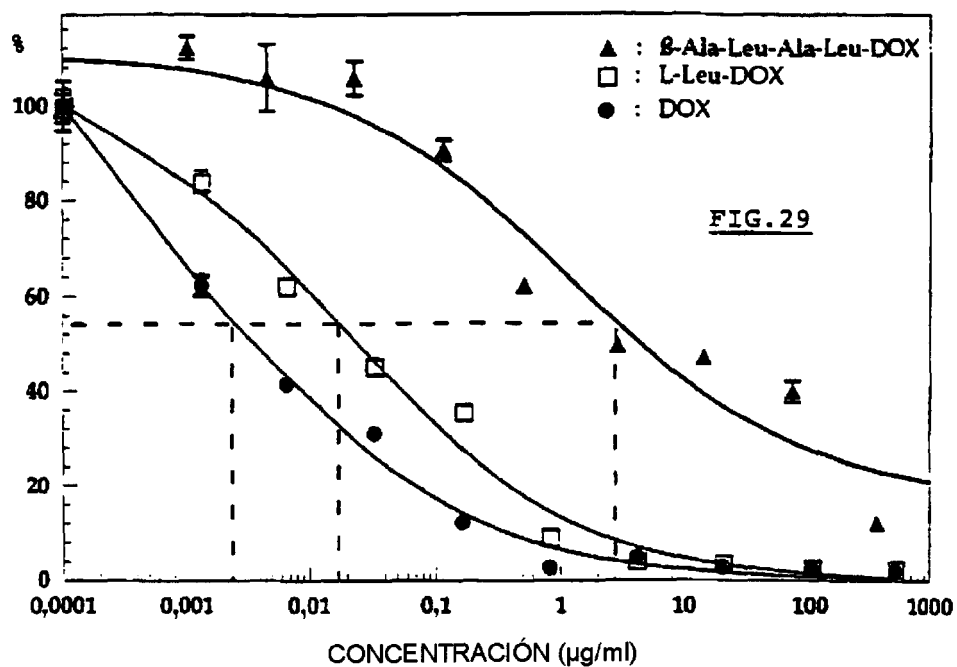


Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)



Acumulación del compuesto
($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína celular)





Masa tumoral media (mg)

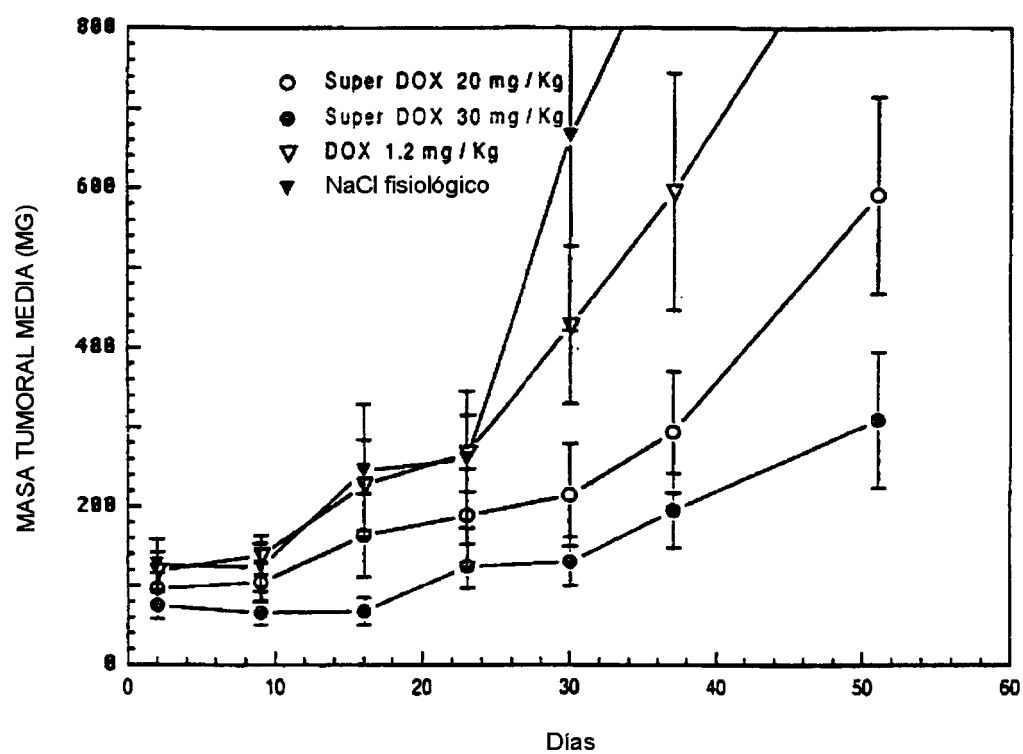


FIG. 31

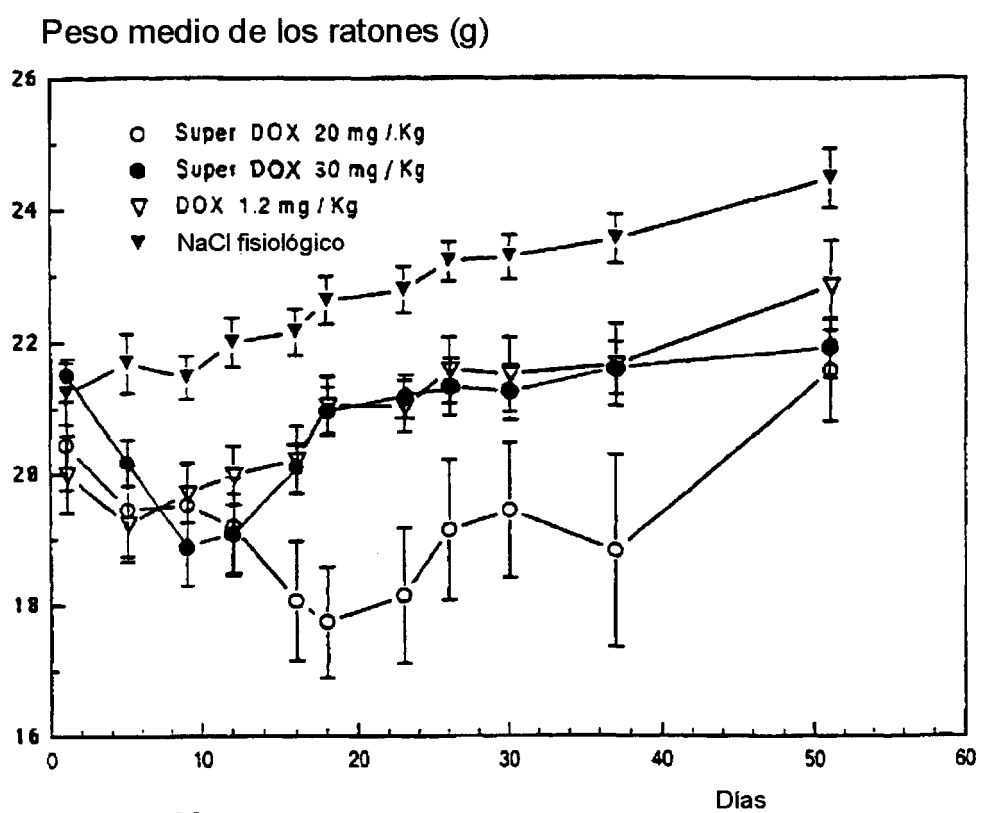


FIG.32