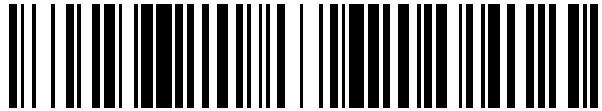


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 682**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4402** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 31/655** (2006.01)  
**A61K 31/77** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2007.01)  
**A61K 47/50** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2017 PCT/JP2017/000184**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017 WO17119462**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2017 E 17735999 (9)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3400941**

54 Título: **Agente antitumoral**

30 Prioridad:

**06.01.2016 JP 2016001128**

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

**11.10.2021**

73 Titular/es:

**KEIO UNIVERSITY (50.0%)**  
**15-45 Mita 2-chome Minato-ku**  
**Tokyo 108-8345, JP y**  
**TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAYA, HIDEYUKI;**  
**NAGANO, OSAMU;**  
**TSUCHIHASHI, KENJI;**  
**SUINA, KENTARO;**  
**NISHIYAMA, NOBUHIRO;**  
**TAKEMOTO, HIROYASU;**  
**NOMOTO, TAKAHIRO;**  
**MATSUI, MAKOTO;**  
**TOMODA, KEISHIRO;**  
**YAMADA, NAOKI y**  
**NISHIMORI, TSUKASA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 863 682 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

Agente antitumoral

**Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Japonesa nº 2016-001128 presentada el 6 de enero de 2016.

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a los agentes antitumorales y se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Antecedentes de la técnica**

10 La expresión de CD44v se observa en numerosos tumores epiteliales. Entre las células cancerosas, CD44v se expresa altamente en una población de células llamada células madre cancerosas que se sabe presenta una resistencia particularmente elevada al estrés oxidativo.

15 Dado que CD44v incrementa la estabilidad del transportador de cistina xCT, una molécula de superficie celular, la alta expresión de CD44v mejora la expresión de xCT. Como resultado, se promueve el transporte de cistina a las células. La cistina transportada se utiliza para la producción de glutatión, un poderoso antioxidante dentro de las células y, de este modo, aumenta la cantidad de glutatión dentro de las células. Se piensa que es responsable de la gran capacidad para hacer frente al estrés oxidativo y de la alta resistencia al tratamiento de las células cancerosas (documento de patente JP-A-2012-144498).

20 La sulfasalazina (conocida también como salazosulfapiridina, salazopyrina y salicilazosulfapiridina), que es un fármaco utilizado en el tratamiento de la colitis ulcerosa y la artritis reumatoide, es un azocompuesto ácido de sulfapiridina y del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA). Cuando se administra por vía oral, la sulfasalazina se metaboliza en sulfapiridina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) mediante bacterias intestinales. Para las enfermedades mencionadas anteriormente, el 5-ASA se considera, particularmente, el principal principio activo.

25 Sin embargo, en los últimos años, se ha descubierto que la sulfasalazina inalterada antes de la degradación metabólica tiene un efecto inhibitor sobre xCT y es eficaz como agente antitumoral (Leukemia vol. 15, pp. 1633-1640, 2001). Esto significa que, cuando se agrega sulfasalazina a las células cancerosas, se suprime el transporte de cistina a las células mediante xCT y se reduce la producción de glutatión; en consecuencia, se reduce la resistencia al estrés oxidativo de las células cancerosas y se incrementa la sensibilidad a los agentes anticancerosos.

30 Sin embargo, se prevé que el efecto antitumoral puede disminuir si la sulfasalazina se administra como agente oral convencional puesto que la sulfasalazina inalterada es eficaz frente a los tumores. Por consiguiente, se espera que se desarrollen inyecciones como las inyecciones locales de sulfasalazina; sin embargo, la sulfasalazina apenas es soluble en agua aunque es soluble en solución de hidróxido sódico o etanol.

Por lo tanto, la presente invención se realizó encaminada a proporcionar agentes antitumorales con sulfasalazina soluble en agua como principio activo.

**Compendio de la invención**

35 Un aspecto de la presente invención es un agente antitumoral que incluye sulfasalazina soluble en agua como principio activo, la sulfasalazina soluble en agua siendo una sulfasalazina modificada con PEG (polietilenglicol) y representada por la siguiente fórmula:



en donde el valor medio de n es 4 o mayor y 1136 o menor.

40 Un peso molecular promedio del PEG que modifica la sulfasalazina puede ser 500 o más y 6000 o menos, 1600 o más, 6000 o menos, o 4000 o más y 6000 o menos. Además, el agente antitumoral se puede formular como una inyección.

**Breve descripción de las figuras**

45 La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de la sulfasalazina obtenida en un ejemplo de la presente invención. El asterisco único (\*) indica  $p < 0.05$ .

La Figura 2 muestra fórmulas estructurales de la sulfasalazinas PEGiladas usadas en los ejemplos. La fórmula superior se conoce como de tipo A, y la fórmula inferior se conoce como de tipo B.

La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del análisis de RMN de sulfasalazinas PEGiladas de tipo A y de tipo B producidas en un ejemplo de la presente invención.

- 5 La Figura 4 es un gráfico que muestra una supresión del glutamato excretado por la sulfasalazina PEGilada de tipo A obtenida en un ejemplo de la invención presente. El asterisco único (\*) indica  $p < 0.05$ .

La Figura 5 es un gráfico que muestra un incremento del nivel de oxígeno activo en las células por una sulfasalazina PEGilada de tipo A obtenida en un ejemplo de la presente invención. El asterisco único (\*) indica  $p < 0.05$ .

- 10 La Figura 6 es un gráfico que muestra la dependencia de concentración de citotoxicidad de una sulfasalazina PEGilada de tipo A en un ejemplo de la presente invención.

La Figura 7 muestra un calendario de dosificación de sulfasalazina en ratones con tumores utilizados en un ejemplo de la presente invención.

- 15 La Figura 8 es un gráfico que muestra las transiciones de los pesos promedios de ratones con tumores desde el primer día de la dosificación de sulfasalazinas PEGiladas de tipo A (PEGiladas con PEG 500, PEG 1000, PEG 2000 o PEG 5000) en un ejemplo de la invención presente.

La figura 9 es un gráfico que muestra las transiciones de los volúmenes promedios de los tumores en ratones con tumores desde el primer día de la dosificación de sulfasalazinas PEGiladas de tipo A (PEGiladas con PEG 500, PEG 1000, PEG 2000, o PEG 5000) en un ejemplo de la invención presente. El asterisco único (\*) indica  $p < 0.05$  y el asterisco doble (\*\*) indica  $p < 0.001$ .

## 20 Realizaciones de la invención

A continuación, se describen detalladamente las realizaciones de la presente invención que se completó sobre la base de los hallazgos mencionados anteriormente haciendo referencia a los ejemplos. Los objetivos, características, ventajas, e ideas de la presente invención son evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción de esta memoria descriptiva. Los expertos en la técnica pueden reproducir fácilmente la presente invención a partir de la descripción de la presente memoria. Las realizaciones y los ejemplos específicos descritos a continuación representan los aspectos preferibles de la presente invención, que se proporcionan con fines ilustrativos o explicativos. La presente invención no se limita a eso. Resulta evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar varios cambios y modificaciones conforme a la descripción de la presente memoria descriptiva dentro del espíritu y el alcance de la presente invención descrita en la presente memoria.

### 30 Sulfasalazinas modificadas con PEG

Un agente antitumoral que contiene la sulfasalazina soluble en agua de la presente invención como un principio activo es una sulfasalazina modificada con PEG representada por la siguiente fórmula:



- 35 en donde el valor promedio de  $n$  es preferiblemente 4 o mayor y 1136 o menor, más preferiblemente 20 o mayor y 227 o menor e, incluso más preferiblemente, 80 o mayor o 136 o menor.

- El peso molecular promedio del PEG que modifica sulfasalazina no es particularmente escaso, pero el límite inferior es preferiblemente 200, más preferiblemente 500, incluso más preferiblemente 1000, todavía más preferiblemente 1600, aún todavía más preferiblemente 1800, incluso todavía más preferiblemente 4000 o más y, además, incluso todavía más preferiblemente 4500 o más. El límite superior es preferiblemente 50.000, más preferiblemente 20.000, incluso más preferiblemente 10.000, más preferiblemente 6000 y aún más preferiblemente 5500.

- Las sulfasalazinas modificadas con PEG se producen mediante una reacción química entre el extremo terminal de la molécula de PEG y la sulfasalazina, como se describe en <el ejemplo de producción 1> y <el ejemplo de producción 2>, pero un método específico no es particularmente escaso y se pueden utilizar técnicas muy conocidas. Un esquema del método de producción es, por ejemplo, del modo siguiente. Para las sulfasalazinas PEGiladas de tipo A, un grupo amino terminal del PEG y ácido carboxílico de la sulfasalazina se somete a una reacción de condensación. La sulfasalazina PEGilada de tipo B se produce mediante una sustitución nucleofílica entre un grupo de yodo terminal del PEG y un grupo hidroxilo de la sulfasalazina.

## Agentes antitumorales

El agente tumoral que contiene sulfasalazina soluble en agua como un principio activo se puede formular en cualquier forma de dosificación y se pueden considerar varias formas de dosificación; sin embargo, es preferible que el agente antitumoral sea un agente parenteral. Por ejemplo, el agente antitumoral puede ser, pero no se limita a, una inyección tal como una inyección subcutánea, una inyección intravenosa, una inyección intramuscular o una inyección intraperitoneal; un agente para administración transdérmica o un parche, un ungüento o una loción; un agente sublingual para la administración por vía bucal o un parche oral; un agente aerosol para la administración intranasal; o un supositorio. Estos agentes se pueden producir mediante un método públicamente conocido que se utiliza frecuentemente para la producción de productos farmacéuticos. El fármaco conforme a la presente invención se puede formular en una forma de dosificación de liberación sostenida o controlada.

Particularmente, se prefieren las inyecciones, pero se prefieren más aún las inyecciones locales, que se pueden inyectar en la proximidad de un tumor o dentro del tumor. La proximidad del tumor es preferiblemente una zona a una distancia de unos 5 cm, más preferiblemente a una distancia de unos 3 cm, incluso más preferiblemente a una distancia de aproximadamente 1 cm, y todavía más preferiblemente a una distancia de unos 0.5 cm de la superficie externa de la masa tumoral. Se pueden preparar inyecciones para inyecciones subcutáneas, intramusculares e intravenosas, utilizando una técnica muy conocida agregando un agente ajustador del pH, un tampón, un estabilizador, un agente isotónico, un agente anestésico local y otros al principio activo. En esta preparación, ejemplos de agentes ajustadores del pH y de tampones incluyen citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio. Ejemplos de estabilizadores incluyen piro-sulfito de sodio, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido tioglicólico y ácido tioláctico. Ejemplos de agentes anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína y clorhidrato de lidocaína. Ejemplos de agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y glucosa.

Se puede determinar adecuadamente la cantidad de principio activo contenida en el medicamento dependiendo de, por ejemplo, un intervalo de dosis del principio activo y de la cantidad de dosificaciones. El intervalo de dosis de administración no es particularmente escaso y se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de la eficacia de los ingredientes contenidos, un tipo de administración, una vía de administración, el tipo de enfermedad, las particularidades de un sujeto (p. ej., el peso corporal, edad, las afecciones médicas y la presencia o ausencia del consumo de otros medicamentos) y el criterio de un médico a cargo. Generalmente, una dosis apropiada se encuentra preferiblemente, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0.01  $\mu$ g a 100 mg, preferiblemente aproximadamente 0.1  $\mu$ g a 1 mg por kg de peso corporal del sujeto. Sin embargo, se pueden modificar estas dosis utilizando experimentos rutinarios convencionales con fines de optimización muy conocidos en la técnica. La dosis previa se puede administrar de una a varias veces al día.

**Ejemplos**

## (1) Efecto antitumoral de la sulfasalazina

Se administraron subcutáneamente células de cáncer de colon humano HCT-116, que prolifera de una manera dependiente de CD44v, a ratones desnudos KSN para formar tumores. Se trasplantaron las células a 10 ratones. Se inyectaron intraperitonealmente 250 mg/kg de sulfasalazina o 100  $\mu$ l de solución salina a cada uno de los grupos de 5 ratones una vez al día. Se midieron los diámetros de los tumores a los 14 y 28 días del trasplante y se calcularon los pesos sobre la base de los diámetros y se compararon entre los dos grupos.

Como se muestra en la Figura 1, el crecimiento del tumor fue significativamente más lento en el grupo de sulfasalazina que en el grupo de control. De este modo, la sulfasalazina tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tumor.

## 2) Síntesis de sulfasalazinas modificadas con PEG

En este ejemplo, se sintetizó una sulfasalazina PEGilada de tipo A, que se muestra en la mitad superior de la Figura 2 y una sulfasalazina PEGilada de tipo B, que se muestra en la mitad inferior de la figura.

## &lt;Ejemplo de producción 1&gt; Producción de sulfasalazina PEGilada de tipo A

Se disolvieron 500 mg de  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino-poli (etilenglicol) (peso molecular medio: 5000 Da) [NOF CORPORATION, SUNBRIGHT PA (nombre comercial), Número de registro CAS: 116164-53-5] en 20 ml de tetrahidrofurano y se mezclaron con 300 mg de DMT-MM (4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-cloruro de metilmorfolinio) [Número de registro CAS: 3945-69-5] y con 400 mg de sulfasalazina; y, después, se agitó la mezcla a 50 ° C durante 24 horas. El tetrahidrofurano de la solución así obtenida se eliminó por destilación a presión reducida y el reactivo sobrante se suspendió de nuevo en 10 ml de ácido clorhídrico 0.01 M. La suspensión se centrifugó a 20.000 x g durante 60 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se sometió a separación de líquidos utilizando una solución de cloruro de amonio acuoso saturado y cloruro de metileno, extraído con la capa de cloruro de metileno y, después, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida. El sólido resultante se disolvió en agua pura, se purificó en una columna PD-10 y se liofilizó para obtener un polvo amarillo como producto diana (sulfasalazina PEGilada de tipo A) (rendimiento: 450 mg). La figura 3A muestra el resultado de una medición de RMN.

## &lt;Ejemplo de producción 2&gt; Producción de sulfasalazina PEGilada de tipo B.

Se disolvieron 300 mg de  $\alpha$ -yodoacetamidopropil- $\omega$ -metoxi-poli (etilenglicol) en 5 ml de DMF y, después, se suspendieron 100 mg de carbonato de cesio en la solución. Se agregaron además 63 mg de sulfasalazina y se agitó la mezcla a 50 ° C durante toda la noche. La solución de reacción se purificó mediante diálisis con metanol, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida y el reactivo sobrante se suspendió de nuevo en 10 ml de ácido clorhídrico 0.01 M. La suspensión se centrifugó a 20.000 x g durante 60 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se purificó en una columna PD-10 y se liofilizó para obtener un polvo amarillo como producto diana (sulfasalazina PEGilada de tipo B) (rendimiento: 270 mg). La figura 3B muestra el resultado de una medición de RMN.

### (3) Medición de la cantidad de glutamato excretado.

La sulfasalazina tiene un efecto inhibitor sobre xCT. Cuando se agrega a las células cancerosas, la sulfasalazina suprime el transporte de cistina a las células mediante xCT. Dado que el transportador xCT excreta glutamato al mismo tiempo que la captación de cistina, es posible examinar la actividad inhibitora de la sulfasalazina sobre xCT examinando la supresión de la excreción de glutamato. De este modo, en este ejemplo, se examinaron las actividades inhibitoras de las sulfasalazinas PEGiladas sobre xCT midiendo la cantidad de glutamato excretado.

Utilizando DMEM (Nacalai Tesque, 08459-64; señalar que el DMEM se complementó con glutamato y FBS al 10% y era libre de antibióticos), se sembró una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello OSC 19 en placas de 6 pocillos a 200.000 células por pocillo. Después de 12 horas, las células que se habían adherido al fondo de las placas se lavaron dos veces con DMEM y, después, se reemplazó el medio de cultivo por 2 ml de un medio de cultivo libre de ácido glutámico que contenía sulfasalazina o 400  $\mu$ M (calculados en cantidades de sulfasalazina), de sulfasalazinas PEGiladas (sulfasalazinas PEGiladas de tipo A PEGiladas con PEG 2000 o PEG 5000 y sulfasalazinas PEGiladas de tipo B PEGiladas con PEG 5000). Después de 8 horas, se midió el contenido de glutamato en el medio de cultivo sobre la base de la absorbancia utilizando un kit de ensayo de glutamato (fabricado por Abcam plc.). Cabe destacar que se midió la absorbancia del propio medio de cultivo libre de fármaco, como referencia y se restó de las absorbancias medidas obtenidas de los medios de cultivo complementados con fármaco o de los medios de cultivo libres de fármaco tras el cultivo celular para obtener cantidades de glutamato. Después, se calculó cada valor como una relación frente al valor del control libre de fármaco establecido como 1 y los resultados se representaron gráficamente (Figura 4).

Como resulta evidente del gráfico de la Figura 4, las dos sulfasalazinas PEGiladas de tipo A PEGiladas con PEG 2000 o PEG 5000 suprimieron significativamente la excreción de glutamato en comparación con el control libre de fármaco. Además, también suprimieron significativamente la excreción de glutamato en comparación con la sulfasalazina PEGilada de tipo B.

De este modo, las sulfasalazinas PEGiladas de tipo A tienen actividad inhibitora sobre xCT, aunque ésta es ligeramente más débil que la de la sulfasalazina. En cambio, la sulfasalazina PEGilada de tipo B no tiene actividad inhibitora sobre xCT.

### (4) Medición de las especies reactivas de oxígeno en las células

La sulfasalazina tiene un efecto inhibitor sobre xCT y, cuando se agrega a las células cancerosas, suprime el transporte de cistina a las células mediante xCT. La cistina se convierte en glutatión reducido en las células. Dado que el glutatión reducido actúa para suprimir un incremento de las especies reactivas de oxígeno en las células, la inhibición de xCT conduce a un incremento de las especies reactivas de oxígeno; por lo tanto, es posible examinar la actividad inhibitora de la sulfasalazina sobre xCT examinando la cantidad de especies reactivas de oxígeno en las células. Por consiguiente, en este ejemplo, se examinaron las actividades inhibitoras de las sulfasalazinas PEGiladas sobre xCT midiendo la cantidad de especies reactivas de oxígeno en las células.

Mediante el uso del mismo medio de cultivo que en (3), se sembró la línea celular OSC 19 en placas de 96 pocillos a 4000 células por pocillo. Al día siguiente, se agregó sulfasalazina y sulfasalazinas PEGiladas de tipo A a 400  $\mu$ M (calculados en cantidades de sulfasalazina). A las 24 horas, se midió la intensidad de fluorescencia de CM-H<sub>2</sub>DCFDA (que es un derivado clorometílico del H<sub>2</sub>DCFDA: dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato), con un lector de placa como nivel de especies reactivas de oxígeno en las células. La parte de H<sub>2</sub>DCF del CM-H<sub>2</sub>DCFDA se oxida rápidamente generando diclorofluoresceína (DCF) al reaccionar con el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, peroxinitrito y otros en las células y emite fluorescencia. Por consiguiente, se pueden utilizar las intensidades de fluorescencia como indicaciones del nivel de especies reactivas de oxígeno en las células. Además, el número de células se midió por medio de la intensidad de fluorescencia de Hoechst 33342. Dado que Hoechst 33342 tiñe el núcleo, su intensidad de fluorescencia es proporcional al número de células. Después, se calculó un nivel de especies reactivas de oxígeno por célula en cada pocillo como la relación de CM-H<sub>2</sub>DCFDA frente a Hoechst 33342. Se calcularon los valores relativos de los niveles de especies reactivas de oxígeno en los grupos de células tratados con el fármaco frente a su nivel en las células con control libre de fármaco, definiendo este último como 1, y los resultados se representaron gráficamente (Figura 5).

Como resulta evidente en el gráfico de la Figura 5, las dos sulfasalazinas PEGiladas de tipo A PEGiladas con PEG 2000 o PEG 5000 mejoraron significativamente el nivel de especies reactivas de oxígeno en las células en

comparación con el control libre de fármaco. Además, también mejoraron significativamente el nivel de especies reactivas de oxígeno en las células en comparación con la sulfasalazina PEGilada de tipo B.

De este modo, la sulfasalazina PEGilada de tipo A mejora el nivel de especies reactivas de oxígeno en las células, aunque es ligeramente más débil que el de la sulfasalazina. En cambio, la sulfasalazina PEGilada de tipo B no mejora el nivel de especies reactivas de oxígeno en las células.

(5) Ensayo de viabilidad celular

En este ejemplo, se comparó la citotoxicidad de diferentes concentraciones de sulfasalazinas PEGiladas de tipo A (PEGiladas con PEG 2000 y PEG 5000) con las de sulfasalazina.

Mediante el uso del mismo medio de cultivo que en (3), se sembró la línea celular T98G en placas de 96 pocillos a 3000 células por pocillo. Al día siguiente, se agregó sulfasalazina y sulfasalazinas PEGiladas de tipo A a 0-1250  $\mu$ M calculados en concentraciones de sulfasalazina. Dos días después, se midió la viabilidad celular utilizando un contador de células viables en cultivo: CellTiter-Glo (fabricado por Promega). Se determinó la viabilidad de cada concentración como una proporción frente a la viabilidad (100 %) del control libre de fármaco (0  $\mu$ M) y los resultados se representaron gráficamente (Figura 6).

Como resulta evidente en el gráfico de la figura 6, la viabilidad celular se incrementó a 400  $\mu$ M en todos los casos. La sulfasalazina y la sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 2000) mostraron una dependencia de la concentración sustancialmente idéntica, pero la sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 5000) mostró una mayor viabilidad celular que la sulfasalazina y la sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 2000) a concentraciones mayores de 400  $\mu$ M.

De este modo, la sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 5000) incrementa la viabilidad celular, pero la sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 2000) sigue conduciendo a una viabilidad celular comparable a la obtenida con sulfasalazina.

(6) Ensayo de solubilidad de sulfasalazina y sulfasalazinas PEGiladas

Se disolvieron 10 mg de sulfasalazina en forma de polvo y 25 mg de sulfasalazina PEGilada de tipo A (PEGilada con PEG 5000) en 100  $\mu$ L de agua pura y solución salina. En este momento, se observó que el polvo de sulfasalazina permanecía sin disolverse en las soluciones acuosas a temperatura ambiente, sobre la base de que sulfasalazina se consideraba que estaba saturada. La sulfasalazina PEGilada de tipo A se disolvió completamente y no permaneció ninguna parte sin disolver. Las soluciones acuosas obtenidas de este modo se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y se extrajeron 50  $\mu$ L de cada sobrenadante. Se añadió 1  $\mu$ L de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5 N al sobrenadante y se midió la absorción ultravioleta (a 238 nm) de la solución resultante calculando de esa manera la concentración de sulfasalazina en la solución (solubilidad en agua pura y solución salina).

Como se muestra en la Tabla 1, las solubilidades saturadas de sulfasalazina en agua y solución salina a temperatura ambiente fueron de 0.050 mg/mL y 0.037 mg/mL, respectivamente. Estas solubilidades se podían incrementar hasta al menos 20.5 mg/mL y 19.1 mg/mL, respectivamente, a temperatura ambiente, al PEGilar la sulfasalazina en la sulfasalazina PEGilada de tipo A.

Tabla 1

Solubilidad saturada de la sulfasalazina (mg/mL)

	Agua pura	Solución salina
Sulfasalazina	0.050 mg/mL	0.037 mg/mL
Sulfasalazina PEGilada de tipo A	$\geq 20.5$ mg/mL	$\geq 19.1$ mg/mL

\* Las solubilidades saturadas de la sulfasalazina PEGilada de tipo A fueron valores calculados como sulfasalazina

(7) Evaluación de la actividad antitumoral de sulfasalazinas PEGiladas de tipo A (PEGilada con PEG500, PEG1000, PEG 2000 o PEG 5000)

En este ejemplo, se evaluaron los efectos de un peso molecular promedio de PEG utilizado para PEGilar sulfasalazina en la actividad antitumoral.

Se trasplantó subcutáneamente una suspensión celular que contenía  $1 \times 10^6$  células OS C19 en la espalda de un ratón hembra de 4 semanas de edad (balb/c nu/nu) para formar un tumor. después de 6 días del trasplante, en el momento en que el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 60 mm<sup>3</sup>, 25 ratones trasplantados con células se dividieron en 5 grupos de 5 ratones (5 ratones por grupo) y se administró a cada grupo sulfasalazinas PEGiladas de tipo A (PEGiladas con PEG 500, PEG 1000, PEG 2000 o PEG 5000) o solución salina. En primer lugar, cada 11.3 mg de sulfasalazina PEGilada-PEG 500 de tipo A (es decir, sulfasalazina PEGilada con PEG 500), 17.6 mg de sulfasalazina PEGilada-PEG 1000 de tipo A (es decir, sulfasalazina PEGilada con PEG 1000), 30.1 mg de sulfasalazina PEGilada-PEG 2k de tipo A (es decir, sulfasalazina PEGilada con PEG 2000), y 67,8 mg de sulfasalazina PEGilada-PEG 5k de

5 tipo A (es decir, sulfasalazina PEGilada con PEG 5000) se disolvieron en solución salina para preparar inyecciones de 31.5 mM (calculado en concentraciones de sulfasalazina). Conforme al calendario de dosificación que se muestra en la Figura 7, la inyección de sulfasalazina PEGilada de tipo A preparada con una dosis única del fármaco preparado de 400 µl (es decir, 250 mg/ml calculado en cantidades de sulfasalazina) o una inyección de solución salina se inyectó por vía intravenosa una vez cada 2 días en cada grupo. La frecuencia de dosificación se estableció en 7 veces en total (el primer día de la administración se estableció como día 0 y, después, a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de la primera dosificación). A los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días de la primera dosificación, se midieron el peso corporal de cada ratón portador de tumor así como los diámetros mayor y menor de cada tumor observado desde fuera y se calculó el volumen del tumor sobre la base de los diámetros medidos del tumor. Las Figuras 8 y 9 muestran gráficos de transiciones del peso corporal promedio (Figura 8) y del volumen promedio del tumor (Figura 9) en cada grupo desde el primer día de la dosificación.

10 Como se muestra en la Figura 8, dado que no se observó ningún cambio significativo en el peso corporal en todos los grupos, se confirmó que las sulfasalazinas PEGiladas de tipo A administradas no eran tóxicas. Además, como se muestra en la Figura 9, se confirmó que, en todos los grupos administrados sulfasalazinas PEGiladas de tipo A, actividades antitumorales significativamente mayores que las de los grupos administrados solución salina, lo que se pudo observar a los 15 días de la primera dosificación.

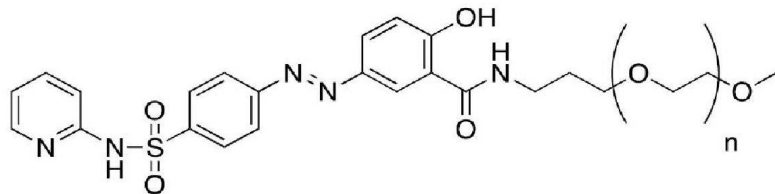
15 Por tanto, las sulfasalazinas PEGiladas tienen actividad antitumoral independientemente del peso molecular medio del PEG utilizado para PEGilar la sulfasalazina.

#### **Aplicabilidad Industrial**

20 Conforme a la presente invención, fue posible proporcionar agentes antitumorales con sulfasalazina soluble en agua como principio activo.

## REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende sulfasalazina soluble en agua para el tratamiento de un tumor, siendo la sulfasalazina soluble en agua una sulfasalazina modificada con PEG representada por la siguiente fórmula:



5 en donde el valor promedio de n es 4 o mayor y 1136 o menor.

2. El agente conforme a la reivindicación 1, en donde el peso molecular promedio de PEG que modifica la sulfasalazina es 500 o más y 6000 o menos.

3. El agente conforme a las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el peso molecular promedio de PEG que modifica la sulfasalazina es 4000 o más y 6000 o menos.

10 4. El agente conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente se formula para inyección.

FIG. 1

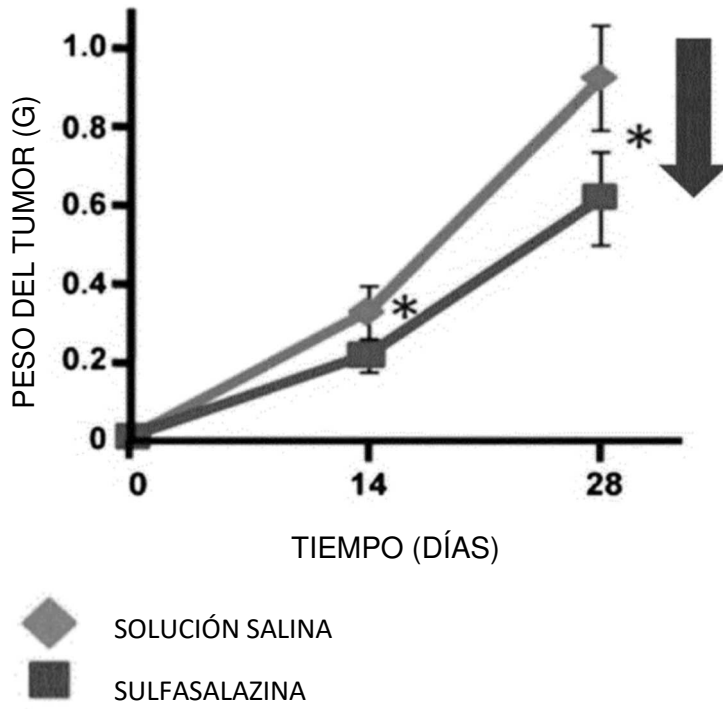


FIG. 2

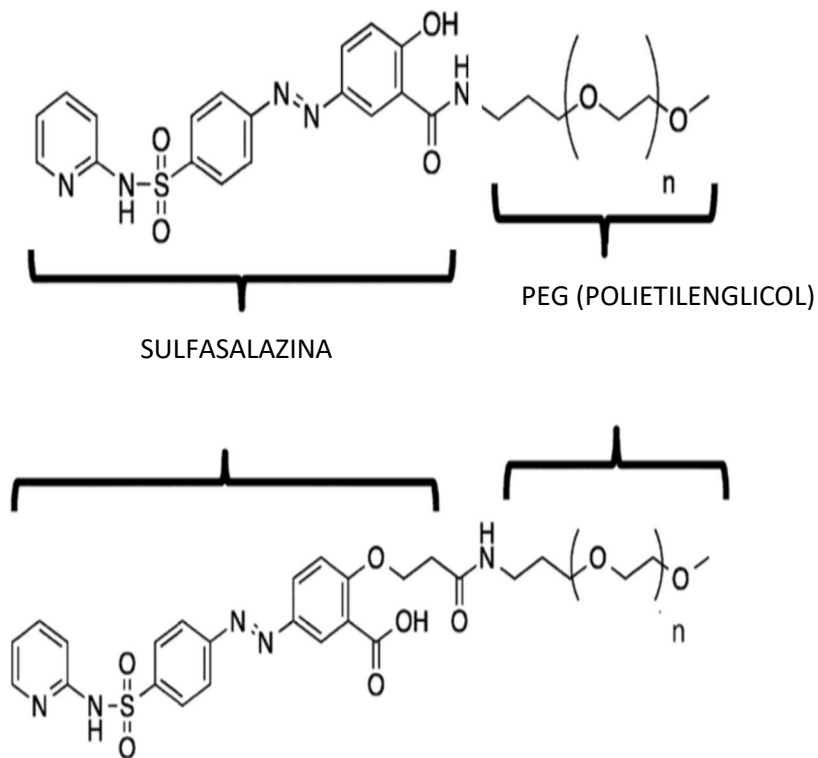
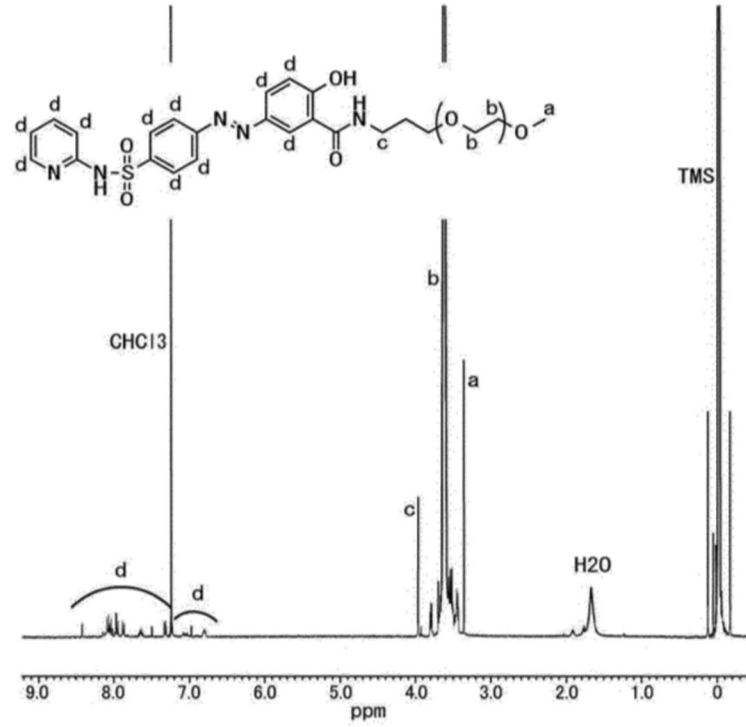


FIG. 3

A



B

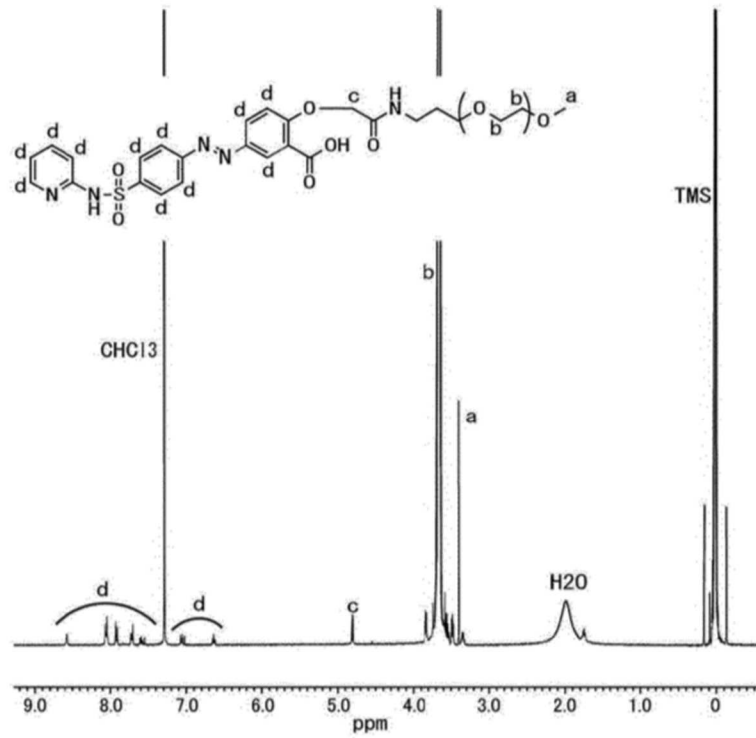


FIG. 4

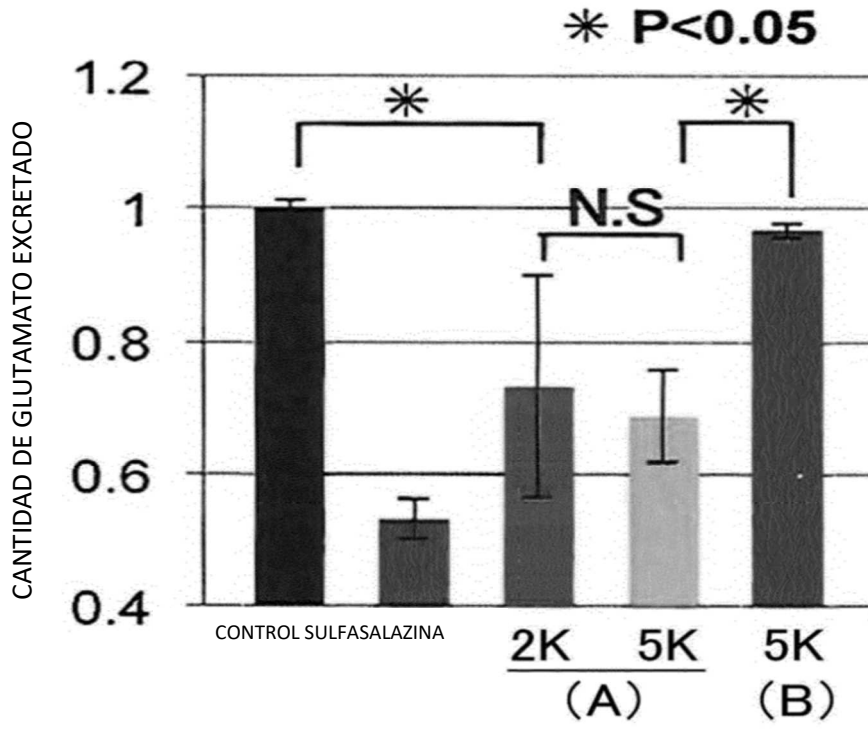


FIG. 5

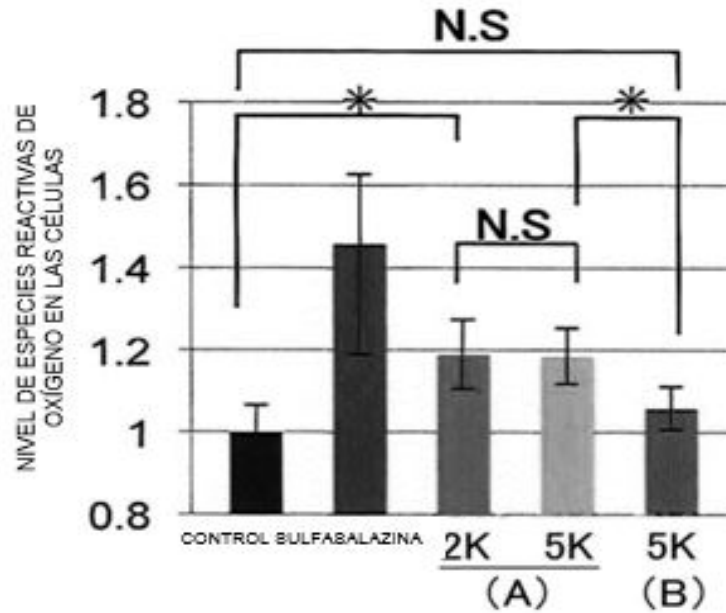


FIG. 6

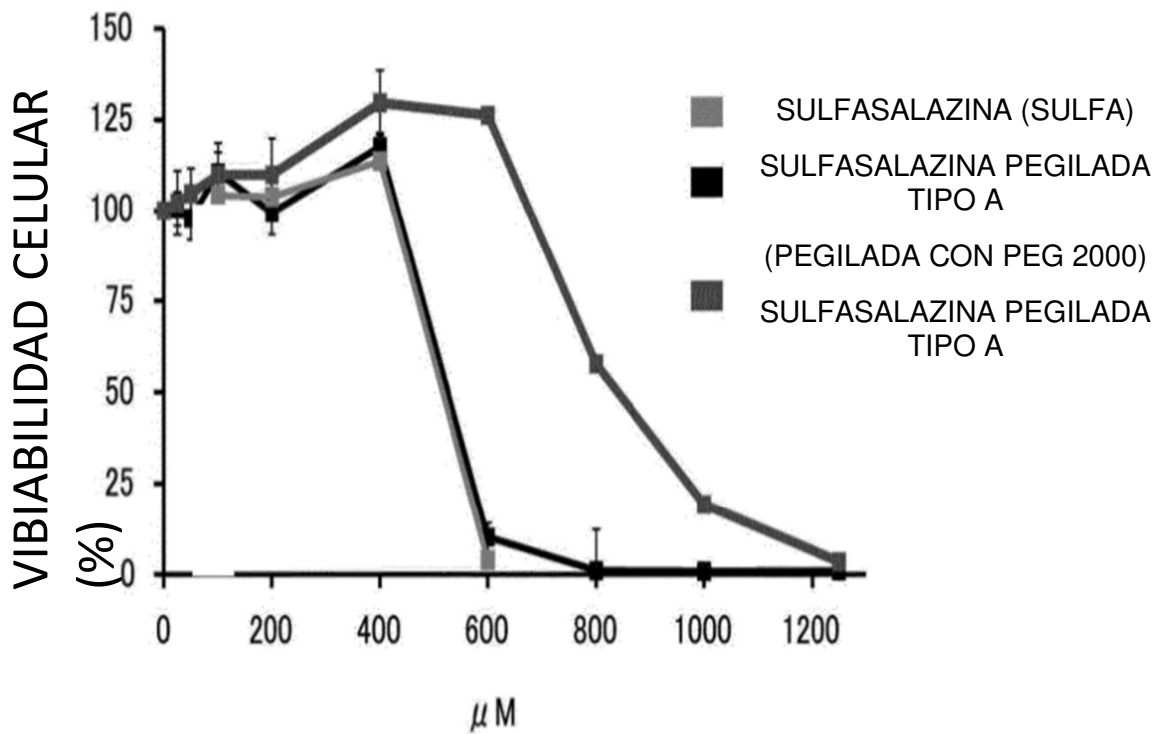


FIG. 7

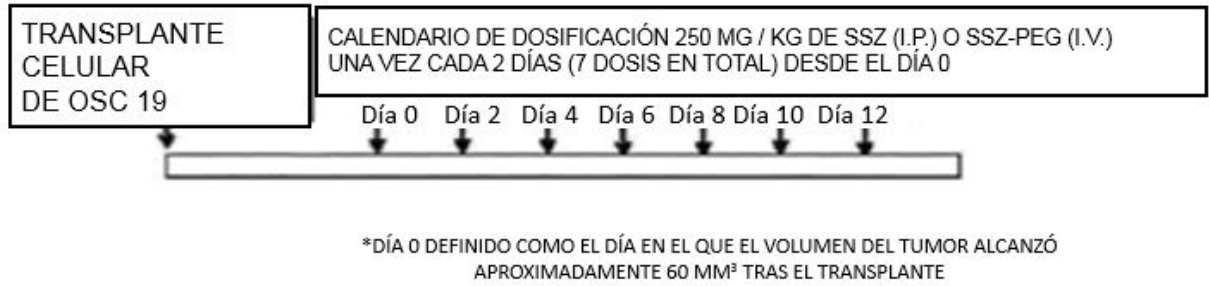


FIG. 8

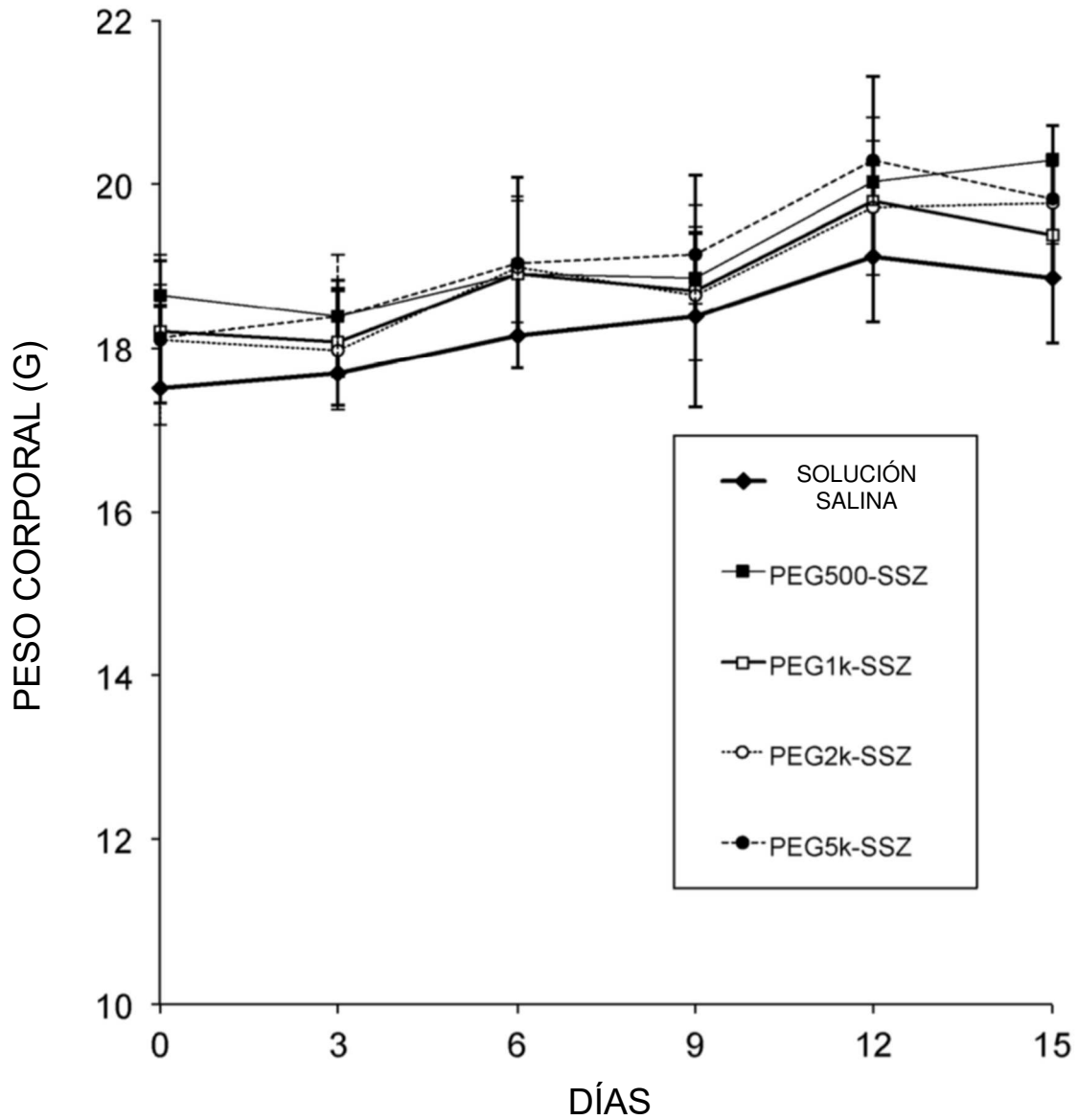


FIG. 9

