



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 452**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02746852 .9**  
96 Fecha de presentación : **11.06.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1404356**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Método para diseñar compuestos profármacos activados por CD10.**

30 Prioridad: **11.06.2001 US 297596 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.09.2011**

73 Titular/es: **MEDAREX, Inc.**  
**Route 206 & Province Line Road**  
**Princeton, New Jersey 08540, US**

72 Inventor/es: **Bebbington, Christopher, R.;**  
**Nieder, Matthew, H.;**  
**Cardarelli, Pina, M.;**  
**Gangwar, Sanjeev;**  
**Pickford, Lesley, B. y**  
**Pan, Chin**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 364 452 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).

## DESCRIPCION

Compuestos profármaco activados método para diseñar por cd10.

## 5 Introducción

## Campo Técnico

10 [0001] La presente invención se refiere a un método como se define en la reivindicación 1. Los profármacos identificados por el método de la reivindicación 1 pueden usarse para tratar una enfermedad, especialmente tumores, en pacientes.

## Antecedentes

15 [0002] Muchos agentes terapéuticos, tales como antraciclinas y alcaloides de la vinca, son especialmente eficaces para el tratamiento de cánceres. Sin embargo, estas moléculas se caracterizan con frecuencia *in vivo* por una toxicidad aguda, especialmente una toxicidad de la médula ósea y de las mucosas, así como una toxicidad cardiaca crónica en el caso de las antraciclinas y una toxicidad neurológica crónica en el caso de los alcaloides de la vinca. De forma similar, puede usarse metotrexato para el tratamiento de reacciones inflamatorias, tales como  
20 enfermedades reumáticas, pero su alta toxicidad limita sus aplicaciones. Es deseable el desarrollo de agentes antitumorales más seguros y específicos para una mayor eficacia contra células tumorales y una disminución en el número y la gravedad de los efectos secundarios de estos productos (toxicidad, destrucción de células no tumorales, etc.). También es deseable el desarrollo de agentes antiinflamatorios más específicos.

25 [0003] Para minimizar los problemas de toxicidad, los agentes terapéuticos se presentan ventajosamente a los pacientes en forma de profármacos. Los profármacos son moléculas capaces de convertirse en fármacos (compuestos terapéuticos activos) *in vivo* mediante ciertas modificaciones químicas o enzimáticas de su estructura. Con el fin de reducir la toxicidad, esta conversión debería estar confinada al sitio de acción o tejido diana más que al sistema circulatorio o tejido no diana. Sin embargo, los profármacos se caracterizan con frecuencia por una baja  
30 estabilidad en sangre y suero. Esto se debe a la presencia de enzimas en sangre y suero que degradan y, por consiguiente, pueden activar los profármacos antes de que los profármacos alcancen los sitios deseados dentro del cuerpo del paciente.

[0004] Una clase deseable de profármacos que superan dichos problemas se ha descrito en la Publicación  
35 Internacional del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes N° WO 96/05863 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.962.216. Compuestos de profármacos útiles adicionales y métodos de preparación de dichos profármacos son deseables, sin embargo, como lo son métodos de preparación de los profármacos. Pan Chin et al. "CPI-0004, a doxorubicin prodrug that is inactive *in vitro*, prolongs survival of both doxorubicin-resistant and -sensitive human tumor bearing-mice" en Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, vol.  
40 42, marzo 2001, página 324, describe el profármaco CPI-0004.

[0005] Son particularmente deseables profármacos que presenten una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida y una estabilidad mejorada en sangre, especialmente respecto a profármacos de estructura similar que han existido en el dominio público.

45

## Descripción resumida de la invención

[0006] La presente invención se refiere a un método de diseño de un profármaco *in vitro*, comprendiendo el método:

50

(1) proporcionar un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

55

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

cada AA representa independientemente un aminoácido,

(2) unir el oligopéptido en un primer sitio de unión del oligopéptido a un grupo estabilizante que obstaculice la escisión del oligopéptido por enzimas presentes en sangre completa;

60

en el que el grupo estabilizante se selecciona entre: ácido succínico, ácido adípico, ácido glutárico, ácido ftálico, ácido diglicólico, ácido fumárico, ácido naftaleno dicarboxílico, ácido piroglutámico, ácido acético, ácido 1- o 2-naftilcarboxílico, ácido 1,8-naftildicarboxílico, ácido aconítico, ácido carboxicinámico, ácido triazol dicarboxílico, ácido glucónico, ácido 4-carboxi-fenil borónico, ácido polietilén glicólico, ácido butano disulfónico, ácido maleico,

ácido nipecótico, ácido isonipecótico, y está unido al extremo N-terminal, o de:

5 beta-alanina, ácido tiazolidin-4-carboxílico, 2-tienilalanina, 2-naftilalanina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-fenilalanina, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, ácido gamma-aminobutírico, ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico, ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, 4-aminometilbenzoico y ácido aminoisobutírico; y

10 (3) unir directa o indirectamente el oligopéptido a un agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido, en el que las etapas (2) y (3) pueden realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo, y en el que además se forma un conjugado por realización de las etapas (1) a (3),

(4) ensayar si el conjugado puede escindirse por CD10 y PSA; y

15 (5) seleccionar el conjugado como un profármaco si: (i) la escisión del conjugado es superior al 10% por hora tras la incubación del conjugado y la enzima CD10 en condiciones experimentales que sirvan de modelo de las condiciones fisiológicas; y (ii) la velocidad de escisión por PSA no es superior al 15% de la velocidad de escisión de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu conjugado por el extremo carboxilo terminal al mismo agente terapéutico que el conjugado.

20 Los compuestos no forman parte de las reivindicaciones.

[0007] También se describe un compuesto que es una forma profármaco de un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico se une directa o indirectamente a un oligopéptido, que a su vez se une a un grupo estabilizante. El compuesto es escindible por CD10. Los profármacos descritos presentan una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida, una estabilidad mejorada en el suero y la sangre y no se mueven hacia células diana o lo hacen sólo mínimamente hasta que se activan por CD10. También se describen conjugados escindibles por CD10 u otra enzima de tipo termolisina. No obstante, los compuestos y conjugados no forman parte de las reivindicaciones.

30 [0008] También se describe una composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito y, opcionalmente, un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se describen artículos de fabricación, tales como kits para diagnóstico o ensayo.

[0009] Además, se describen métodos de diseño de profármacos y de disminución de la toxicidad modificando un agente terapéutico para crear un profármaco. Dicha modificación proporciona un índice terapéutico mejorado en comparación con el agente terapéutico libre. Puede utilizarse un método de exploración para un oligopéptido de secuencia apropiada que pueda escindirse por CD10 en el diseño de un profármaco.

[0010] También se describe el tratamiento de una afección médica o trastorno, tal como un tumor, por administración del profármaco de la invención. La afección implica células diana asociadas a CD10.

40 [0011] Se describen también varios procedimientos para preparar los profármacos.

#### Breve descripción de los dibujos

45 [0012] Las Figuras 1A-1D son una tabla de abreviaturas, nombres y estructuras.

[0013] La Figura 2 es un esquema ejemplar de la escisión de un profármaco de la invención en las proximidades extracelulares de la célula diana y en el interior de la célula diana.

50 [0014] La Figura 3 ilustra una síntesis de Fmoc-βAla-Ile-Ala-Leu, un intermediario típico de la invención.

[0015] La Figura 4 ilustra una síntesis por la "ruta de Fmoc" de Metil-succinil-βAla-Ile-Ala-Leu, un intermediario típico de la invención.

55 [0016] La Figura 5 ilustra una síntesis por la "ruta de Fmoc" de una forma de sal de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-DOX, un compuesto típico de la invención.

[0017] La Figura 6 ilustra una síntesis por la "ruta de éster" de una forma de sal de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-DOX, un compuesto típico de la invención.

60 [0018] La Figura 7 ilustra una síntesis de un βAla-Ile-Ala-Leu-DOX amino-prottegido, un intermediario típico de la invención.

[0019] La Figura 8 ilustra una síntesis por la "ruta de éster alílico" de una forma de sal de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-

DOX, un compuesto típico de la invención.

**[0020]** La **Figura 9** ilustra una síntesis por la “ruta de resina” de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-DOX, un compuesto típico de la invención.

5

**[0021]** La **Figura 10** es una tabla de oligopéptidos útiles en el profármaco de la invención.

**[0022]** La **Figura 11** ilustra la eliminación de agente terapéutico libre mediante el uso de resina o perlas de atrapamiento.

10

**[0023]** La **Figura 12** es una tabla de velocidades de hidrólisis específicas de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox y Suc-βAla-Leu-Tyr-Leu-Dox por homogeneizados de diversas líneas celulares humanas cultivadas.

15

**[0024]** La **Figura 13** es una tabla de velocidades de hidrólisis específicas de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox y Suc-βAla-Leu-Tyr-Leu-Dox por homogeneizados de diversos tejidos de xenoinjerto.

20

**[0025]** La **Figura 14** muestra la expresión de CD10 según se determinó por análisis citométrico de flujo para un panel de líneas celulares.

**[0026]** La **Figura 15** es una gráfica de algunas curvas de valoración de la escisión de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox por CD10 en ausencia o presencia de fosforamidón 300 nM.

25

**[0027]** La **Figura 16** es una gráfica de los niveles plasmáticos de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox y sus metabolitos a 1 y 4 horas después de la administración de una sola dosis en embolada intravenosa del profármaco.

**[0028]** La **Figura 17** es una gráfica de la cantidad de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox y sus metabolitos presentes en la orina recogida 0-2 y 2-24 horas después de la administración de un solo bolo intravenoso del profármaco.

30

**[0029]** La **Figura 18** es una gráfica de los niveles plasmáticos de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y sus metabolitos 1 y 4 horas después de la administración de una sola dosis en embolada intravenosa del profármaco.

35

**[0030]** La **Figura 19** es una gráfica de la cantidad de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y sus metabolitos presentes en la orina recogida 0-2 y 2-24 horas después de la administración de un solo bolo intravenoso del profármaco.

**[0031]** La **Figura 20** es una gráfica del cambio de peso corporal en porcentaje de ratones tratados con Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox o que reciben el control de vehículo.

40

**[0032]** La **Figura 21** es una gráfica de la velocidad de crecimiento de tumores en ratones con xenoinjertos de LS174T tratados con Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox o a los que se administró el control de vehículo.

**[0033]** La **Figura 22** es una gráfica de crecimiento de LNCaP en ratones atímicos tratados con vehículo, doxorubicina o Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox.

45

**[0034]** La **Figura 23** es una gráfica del peso corporal de ratones atímicos que contienen tumores LNCaP xenoinjertados.

50

**[0035]** La **Figura 24** es una gráfica del peso corporal de ratones atímicos que contienen tumores LNCaP xenoinjertados.

**[0036]** La **Figura 25** es una gráfica de crecimiento de tumores LNCaP en ratones atímicos tratados con vehículo, doxorubicina o Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox.

55

**[0037]** La **Figura 26** es una gráfica de la concentración de metabolitos de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox y doxorubicina en plasma con el tiempo.

60

**[0038]** La **Figura 27** ilustra una síntesis a gran escala de MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, un intermediario típico de la invención.

**[0039]** La **Figura 28** ilustra la asignación de NMR para MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, un compuesto típico de la invención.

[0040] La **Figura 29** ilustra la expresión de CD10 en células CHO transfectadas.

[0041] La **Figura 30** es una gráfica de crecimiento de tumores LNCaP en ratones atímicos tratados con Suc-βAla-5 Leu-Ala-Leu-Dox, doxorubicina o vehículo.

[0042] La **Figura 31** es una gráfica del índice de supervivencia de ratones atímicos que contienen tumores LNCaP xenoinjertados tratados con Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, doxorubicina o vehículo.

10 [0043] La **Figura 32** es una gráfica del peso corporal ajustado por la media de grupo de ratones atímicos que contienen tumores LNCaP xenoinjertados tratados con Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, doxorubicina o vehículo.

[0044] La **Figura 33** es una gráfica de crecimiento de tumores LNCaP en ratones atímicos tratados con Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox o vehículo.

15 [0045] La **Figura 34** es una gráfica del índice de supervivencia de ratones atímicos que contienen tumores LNCaP xenoinjertados tratados con Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox o vehículo.

[0046] La **Figura 35** es una gráfica del peso corporal ajustado por la media de grupo de ratones atímicos que 20 contienen tumores LNCaP xenoinjertados tratados con Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox o vehículo.

### Descripción detallada

#### 25 Abreviaturas

- [0047] ACN = Acetonitrilo  
 [0048] Aib = Ácido aminoisobutírico  
 [0049] All = Alilo  
 30 [0050] Aloc = Aliloxicarbonilo  
 [0051] Amb = Ácido 4-(aminometil)benzoico  
 [0052] APP = Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico  
 [0053] DCC = N,N'-diciclohexilcarbodiimida  
 [0054] Boc = t-butiloxicarbonilo  
 35 [0055] Cap = ácido aminocaproico  
 [0056] DBN = 1,5 Diazabicyclo [4.3.0] non-5-eno  
 [0057] DBO = 1,4 Diazabicyclo [2.2.2] octano  
 [0058] DBU = 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno  
 [0059] Dox-HCl= Sal clorhidrato de doxorubicina  
 40 [0060] DCM = Diclorometano  
 [0061] DIC = N,N'-Diisopropilcarbodiimida  
 [0062] DIEA = Diisopropiletilamina  
 [0063] Dg = Ácido diglicólico  
 [0064] DMF = Dimetilformamida  
 45 [0065] Dnr = Daunorrubicina  
 [0066] Dox = Doxorubicina  
 [0067] Et<sub>2</sub>O = Éter dietílico  
 [0068] Fmoc = 9-Fluorenilmetiloxicarbonilo  
 [0069] Gl = Ácido glutámico  
 50 [0070] HATU = Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio  
 [0071] HBTU = Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluronio  
 [0072] HEPES = Hidroxetilpiperidina  
 [0073] HOBt = N-hidroxibenzotriazol  
 [0074] HPLC = Cromatografía líquida a alta presión  
 55 [0075] MeOH = Metanol  
 [0076] MeOSuc = Metil hemisuccinilo/Metil hemisuccinato  
 [0077] MTD = Dosis máxima tolerada  
 [0078] NAA = Ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico  
 [0079] Nal = 2-Naftilalanina  
 60 [0080] Naph = Ácido 1,8-naftaleno dicarboxílico  
 [0081] Nle = Norleucina  
 [0082] NMP = N-metilpirrolidina  
 [0083] Nva = Norvalina  
 [0084] Resina de PAM = 4-hidroximetilfenilacetamidometilo

- [0085] Pyg = Ácido piroglutámico  
 [0086] Pyr = 3-Piridilalanina  
 [0087] rRTOP = TOP de rata recombinante  
 [0088] RT, rt = Temperatura ambiente  
 5 [0089] Suc = Ácido succínico/Succinilo  
 [0090] TCE = tricloroetilo  
 [0091] TFA = Ácido trifluoroacético  
 [0092] THF = Tetrahidrofurano  
 [0093] Thi = 2-Tienilalanina  
 10 [0094] Thz = Ácido tiazolidin-4-carboxílico  
 [0095] Tic = Ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico  
 [0096] TOP = Oligopeptidasa Thimet

- [0097] Se describen en la presente memoria compuestos que pueden describirse como formas profarmacológicas de agentes terapéuticos. El agente terapéutico se une directa o indirectamente a un oligopéptido, que a su vez se une a un grupo estabilizante. Opcionalmente puede estar presente un grupo enlazador entre el agente terapéutico y el oligopéptido. El oligopéptido tiene una longitud de al menos tres aminoácidos y, preferentemente, una longitud de tres a seis aminoácidos. El compuesto se caracteriza por su susceptibilidad a la escisión por la enzima CD10.

## 20 Profármaco

[0098] Más particularmente, el profármaco es una forma modificada de un agente terapéutico y comprende varias porciones, incluyendo:

- 25 (1) un agente terapéutico,  
 (2) un oligopéptido,  
 (3) un grupo estabilizante, y  
 (4) opcionalmente, un grupo enlazador.

30 Dicho profármaco no forma parte de las reivindicaciones.

[0099] Cada una de las porciones del profármaco se analizan en más detalle a continuación. La orientación típica de estas porciones del profármaco es la siguiente:

- 35 (grupo estabilizante)-(oligopéptido)-(grupo enlazador opcional)-(agente terapéutico)

[0100] El grupo estabilizante se une directamente al oligopéptido en un primer sitio de unión del oligopéptido. El oligopéptido se une directa o indirectamente al agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido. Si el oligopéptido y el agente terapéutico se unen indirectamente, entonces está presente un grupo enlazador.

40

[0101] El enlace directo de dos porciones del profármaco significa que existe un enlace covalente entre las dos porciones. El grupo estabilizante y el oligopéptido se unen por lo tanto directamente mediante un enlace químico covalente en el primer sitio de unión del oligopéptido, típicamente el extremo N-terminal del oligopéptido. Cuando el oligopéptido y el agente terapéutico se unen directamente, entonces se unen covalentemente entre sí en el segundo sitio de unión del oligopéptido. El segundo sitio de unión del oligopéptido es típicamente el extremo C-terminal del oligopéptido, pero puede ser otra parte del oligopéptido.

45

[0102] El enlace indirecto de dos porciones del profármaco significa que cada una de las dos porciones se une covalente a un grupo enlazador. El profármaco puede tener un enlace indirecto del oligopéptido con el agente terapéutico. Por lo tanto, el oligopéptido se une covalentemente al grupo enlazador, que a su vez se une covalentemente al agente terapéutico.

50

[0103] La orientación del profármaco puede invertirse, de modo que un grupo estabilizante se une al oligopéptido en el extremo C-terminal de estos oligopéptidos y el agente terapéutico se une directa o indirectamente al extremo N-terminal del oligopéptido. Por lo tanto, en una forma alternativa, el primer sitio de unión del oligopéptido puede ser el extremo C-terminal del oligopéptido y el segundo sitio de unión del oligopéptido puede ser el extremo N-terminal del oligopéptido. El grupo enlazador puede estar opcionalmente presente entre el agente terapéutico y el oligopéptido. Este profármaco alternativo funciona de la misma forma en que lo hace el primario.

55

- 60 [0104] El profármaco descrito es típicamente escindible dentro de su porción oligopeptídica. Para que el profármaco sea eficaz, el profármaco típicamente experimenta una modificación *in vivo* que produce una porción del profármaco que es capaz de entrar en la célula diana. Una primera escisión dentro de la porción oligopeptídica del profármaco puede dejar una porción activa del profármaco, es decir, una porción del profármaco que sea competente para transportarse a la célula diana, como uno de los productos de escisión. Como alternativa, puede

ser necesaria una escisión adicional por una o más peptidasas para dar como resultado una porción de transporte competente del profármaco. La porción activa o de transporte competente del profármaco tiene al menos el agente terapéutico y es esa parte del profármaco que puede entrar en la célula diana para ejercer un efecto terapéutico directamente o tras una conversión adicional dentro de la célula diana.

5

**[0105]** Por lo tanto, el compuesto tiene una porción activa, y la porción activa es más capaz de entrar en la célula diana después de la escisión por una enzima asociada con una célula diana que antes de dicha escisión. Las estructuras del grupo estabilizante y del oligopéptido se seleccionan para limitar el aclaramiento y el metabolismo del profármaco por enzimas que pueden estar presentes en la sangre o en tejidos no diana, y se seleccionan adicionalmente para limitar el transporte del profármaco al interior de las células. El grupo estabilizante bloquea la escisión del profármaco por exopeptidasa *in vivo* y, además, puede actuar proporcionando una carga preferible u otras características físicas del profármaco. La secuencia de aminoácidos del oligopéptido se selecciona por su susceptibilidad a la escisión por CD10, una enzima asociada con células diana y descrita en más detalle a continuación. Se describen profármacos que tienen oligopéptidos de longitud variable, pero se describen preferentemente oligopéptidos de al menos tres aminoácidos y se describen especialmente preferentemente oligopéptidos de tres a seis aminoácidos.

**[0106]** Es deseable preparar un agente terapéutico, especialmente un agente terapéutico antitumoral y/o antiinflamatorio, inactivo por modificación del agente terapéutico a una forma profármaco. Las células diana descritas en la presente memoria son habitualmente células tumorales o células tales como macrófagos, neutrófilos y monocitos, que participan en reacciones inflamatorias, especialmente las asociadas con enfermedades reumáticas. La modificación del agente terapéutico a una forma profármaco también reduce algunos de los efectos secundarios de los agentes terapéuticos.

**[0107]** El profármaco se administra al paciente, se transporta a través del torrente sanguíneo en una forma estable y, cuando está en las proximidades de una célula diana, es reconocido y modificado por una enzima asociada a la célula diana. Puesto que la actividad enzimática está sólo mínimamente presente dentro de las proximidades extracelulares de las células normales, el profármaco no se activa y su porción de transporte competente (incluyendo el agente terapéutico) consigue la entrada en las células normales sólo mínimamente como mucho. En las proximidades de células tumorales u otras células diana, sin embargo, la presencia aumentada de la enzima pertinente en el entorno local causa la escisión del profármaco. Después de la modificación de la forma profármaco y de su entrada en la célula diana, el agente terapéutico (opcionalmente unido a uno o más aminoácidos y posiblemente también a un grupo enlazador) actúa destruyendo o bloqueando la proliferación de la célula diana. El ejemplo mostrado en la **FIG. 2** representa un profármaco típico que se escinde extracelularmente y consigue la entrada en la célula diana. Una vez dentro de la célula diana, puede modificarse adicionalmente para proporcionar un efecto terapéutico. Aunque una porción del profármaco puede ocasionalmente conseguir acceso a y, posiblemente, dañar a células normales, la porción de transporte competente del profármaco se libera principalmente en las proximidades de células diana. Por lo tanto, se minimiza la toxicidad en células normales.

**[0108]** Los compuestos descritos en la presente memoria son buenos profármacos porque muestran una alta estabilidad, es decir, un bajo nivel de liberación del agente terapéutico activo en la circulación sistémica y en tejidos normales. Los profármacos descritos en la presente memoria no se activan en la sangre o tejidos normales en gran medida, pero se activan en sitios tumorales u otros sitios diana. Por consiguiente, tienen un índice terapéutico mejorado, un perfil toxicológico mejorado y una farmacocinética favorable en comparación con compuestos conocidos.

**[0109]** Sin limitación a teoría particular alguna, se cree que los compuestos que tienen secuencias particulares reconocibles por CD10 se activan en las proximidades de las células diana por la enzima CD10 o una enzima de tipo termolisina similar. La CD10 está presente al menos durante cierta parte del ciclo vital de la célula diana.

50

**[0110]** Se describen en la presente memoria compuestos que pueden escindirse en la porción oligopeptídica por CD10 pero que son resistentes a la escisión por la oligopeptidasa Thimet ("TOP"). Se cree que TOP es un miembro de una clase de enzimas descrita en más detalle en el documento WO 00/33888. El compuesto incluye preferentemente un oligopéptido que se caracteriza adicionalmente por su resistencia a la escisión por antígeno prostático específico (PSA). Dicha resistencia se mide en condiciones fisiológicas.

55

**[0111]** En la presente invención, un compuesto es resistente a la escisión por una enzima dada si la velocidad de escisión por una preparación purificada de la enzima dada no es superior al 15%, preferentemente no es superior al 5% e, idealmente, no es superior al 1% de la velocidad de escisión de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu conjugado a través del extremo carboxilo terminal al mismo agente terapéutico que el compuesto de interés. Los índices deberían compararse en las mismas condiciones de ensayo.

60

**[0112]** En la presente invención, un compuesto puede escindirse por una enzima dada si más del 10% por hora, preferentemente más del 50% por hora del compuesto se escinde tras la incubación del compuesto y la enzima en

condiciones experimentales que sirvan de modelo de las condiciones fisiológicas, particularmente las de fuera de la célula diana. La concentración de la enzima dada en condiciones experimentales debería ser representativa de la concentración de la enzima dada en el medio extracelular del tejido diana.

5 **[0113]** Como se describe en la presente memoria, un compuesto comprende:

(1) un agente terapéutico capaz de entrar en una célula diana,

(2) un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

10 n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

15 cada AA representa independientemente un aminoácido,

(3) un grupo estabilizante, y

(4) opcionalmente, un grupo enlazador,

20 en el que el oligopéptido se une directamente al grupo estabilizante en un primer sitio de unión del oligopéptido y el oligopéptido se une directamente al agente terapéutico o se une indirectamente a través del grupo enlazador al agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido,

en el que el grupo estabilizante obstaculiza la escisión del compuesto por enzimas presentes en sangre completa, y

25 en el que el compuesto puede escindirse por CD10.

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

El compuesto puede escindirse por CD10 en condiciones fisiológicas.

**[0114]** Los compuestos descritos en la presente memoria no incluyen los descritos específicamente en la técnica.

30 Por ejemplo, el documento WO 00/33888, la Patente de Estados Unidos N° 5.962.216, los documentos WO 00/69472, WO 98/52966, la Patente de Estados Unidos N° 5.599.686 y otras publicaciones pueden ser relevantes.

Por lo tanto, si el oligopéptido del compuesto es Leu-Ala-Leu, entonces el grupo estabilizante no es succinilo o  $\beta$ Ala o el agente terapéutico no es uno de doxorubicina y daunorrubicina. De forma similar, si el oligopéptido es  $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu, entonces el grupo estabilizante no es succinilo o el agente terapéutico no es uno de doxorubicina y

35 daunorrubicina. Si el oligopéptido es  $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu, entonces el grupo estabilizante no es glutarilo o el agente terapéutico no es doxorubicina. Además, el compuesto no se selecciona entre el grupo que consiste en Suc-Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr, pGlu-Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, D-Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr, D-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Dnr, D-Leu-D-Ala-Leu-

Ala-Leu-Dnr, Acetil-His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln-Dox, Morfolinocarboxil-His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln-Leu-Dox, N-(2-

hidroxipropil)metacrilamida-Gly-Phe-Leu-Gly-Dox, N-glutaril-(4-hidroxi-prolil)-Ala-Ser-ciclohexilglicina-Gln-Ser-Leu-

40 Dox, N-Cbz-Gly-Phe-Ala-Leu-Dox y N-Cbz-Gly-Phe-Ala-Leu-PABC-Dox.

### Enzimas asociadas a células diana

**[0115]** Los profármacos descritos en la presente memoria están diseñados para aprovechar la activación

45 preferente, a través de la interacción con una enzima asociada con la célula diana, en o próxima al sitio diana dentro del cuerpo del paciente. La totalidad de la enzima asociada a célula diana, o al menos el sitio activo de la enzima asociada a célula diana, puede asociarse con o unirse en la superficie externa de la célula. Como alternativa, la enzima asociada a célula diana puede secretarse, liberarse o estar presente de alguna otra forma en las

proximidades extracelulares de la célula diana.

50 **[0116]** A modo de antecedentes, un tipo de enzima asociada a célula diana es la trouasa, descrita en más detalle en el documento WO 00/33888. Se cree que la trouasa es una clase de enzimas de la que la oligopeptidasa Thimet

("TOP") es un miembro. Las trouasas son altamente discriminantes en su selectividad y escisión. La trouasa es una endopeptidasa que muestra un grado notable de discriminación entre leucina e isoleucina en el lado carboxilo del

55 sitio de escisión del oligopéptido. Una característica destacada es que, en condiciones de ensayo apropiadas, la trouasa escinde fácilmente la succinil- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Daunorrubicina, mientras que es al menos veinte veces

menos activa con la succinil- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Daunorrubicina.

**[0117]** Otra enzima asociada a célula diana y de una importancia particular pero distinta de las enzimas trouasas

60 es CD10.

Historia de CD10

**[0118]** La primera información de CD10 era una actividad en las membranas de borde en cepillo de riñón de rata capaz de hidrolizar la cadena B de 125 yodoinsulina a pH neutro (Wong-Leung et al., "Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney", *Biochem. J.* 110: 5P (1968)). La enzima se denomina por lo tanto proteinasa neutral del borde en cepillo renal. Se demostró que la enzima era una metalopeptidasa (Nepriylsin, Turner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* 1080-1085 (1998)). CD10 se redescubrió independientemente como una enzima de membrana cerebral responsable de la inactivación de las encefalinas (Malfroy et al., "High-affinity enkephalin-degrading peptidase is increased after morphine", *Nature*, 276: 523-526 (1978)), que condujo al uso del nombre trivial encefalinasa. CD10 también se denomina comúnmente neprilisina o endopeptidasa neutra 24.11 o EC 3.4.24.11 o NEP en la bibliografía. La clonación y secuenciación de la enzima (Devault et al., "Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA", *EMBO J.* 6: 1317-1322 (1987)) condujo al reconocimiento de que era idéntica a un antígeno de superficie celular de leucocitos, el antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA o CD10) que está presente en un grupo de leucemias de células pre-B (LeTarte et al., "Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase", *J. Exp. Med.*, 168: 1247-1253 (1988)).

Actividad Biológica de CD10

**[0119]** CD10 es esencialmente una oligopeptidasa que hidroliza péptidos de hasta aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, aunque generalmente la eficacia de la hidrólisis disminuye a medida que aumenta la longitud del péptido. Uno de los sustratos hidrolizados más eficazmente es el undecapéptido sustancia P (Matsas et al., "The metabolism of neuropeptides: the hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24.11", *Biochem J.* 223: 433-440 (1984)). Los sustratos principales *in vivo* parecen ser las encefalinas, taquicininas tales como sustancia P y la familia del péptido natriurético atrial.

**[0120]** El requisito de especificidad principal de acuerdo con la bibliografía es un resto hidrófobo voluminoso en la posición P1', funcionando la enzima normalmente como una endopeptidasa. La Leu en la posición P1' proporciona las mayores velocidades de hidrólisis mientras que la Phe muestra los menores valores de Km. El sustrato de menor tamaño identificado en la bibliografía es el péptido quimiotáctico formil-Met-Leu-Phe, produciéndose la escisión en el enlace Met+Leu (Connelly et al., "Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide", *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 86: 7103-7107 (1985)).

**[0121]** La enzima tiene un sitio activo prolongado que aloja al menos cuatro cadenas laterales de aminoácidos. Una secuencia de consenso para una hidrólisis eficaz por CD10 se sugiere como: -Phe-Phe-Gly+Phe-Leu-(Ala)- (Nepriylsin, Turner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* 1080-1085 (1998)). Con algunos sustratos, CD10 presenta carácter de peptidil-dipeptidasa, por ejemplo en la hidrólisis de [Leu]-encefalina: Tyr-Gly-Gly+Phe-Leu (kcat/Km 43,9 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>). El derivado C-terminalmente amidado de [Leu]-encefalina se hidroliza mucho menos eficazmente (kcat/Km 1,7 min<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>), reflejando la interacción del grupo carboxilato C-terminal libre en la [Leu]-encefalina con un resto arginilo (Arg102) en el sitio activo de la enzima (Bateman et al., "Identification of the active site arginine in rate neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as Arg 102 and analysis of a glutamine 102 mutant", *J. Biol. Chem.* 264: 6151-6157 (1989)). Los ejemplos de posiciones de escisión en otros sustratos biológicamente activos son para la sustancia P, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln+Phe+Phe-Gly+Leu-Met-NH<sub>2</sub>, produciéndose la hidrólisis más rápida en el enlace Gly+Leu, lo que concuerda con la secuencia de consenso para la hidrólisis. En la neurotensina se observan los siguientes sitios de hidrólisis: Pyg-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro+Tyr+Ile-Leu, y en la colecistocinina-8, Asp-Tyr-Met-Gly+Trp-Met-Asp+Phe-NH<sub>2</sub>. Los valores de Km para sustratos sintéticos y péptidos naturales están habitualmente en el intervalo de 10 μM-1 mM.

**[0122]** De acuerdo con la bibliografía, CD10 presenta un pH óptimo de 6,0 (Nepriylsin, Turner, *Handbook of Proteolytic Enzymes* 1080-1085 (1998)). Se inhibe por reactivos quelantes de cinc y se han diseñado una diversidad de inhibidores sintéticos de la enzima, de los cuales el primero fue tiorfano ([DL-3-mercapto-2bencilpropanoil]-glicina).

Química estructural de CD10

**[0123]** CD10 es una proteína integral de membrana de tipo II de la membrana plasmática; existe como una ectoenzima, mirando la parte voluminosa de la proteína, incluyendo el sitio activo, hacia el espacio extracelular. Está compuesta por un dominio citoplasmático N-terminal de 23 aminoácidos, un dominio transmembrana de 28 aminoácidos y un dominio extracelular de aproximadamente 700 aminoácidos que contiene el sitio activo (Li et al., "Nepriylsin: Assay Methods, Purification, and Characterization", *Methods in Enzymology*, 248: 253-263 (1995)). Contiene 1 mol de cinc por subunidad. Los enlaces disulfuro intracatenarios son importantes para el mantenimiento de la estructura y la actividad. El Mr de CD10 varía de aproximadamente 85000 a 100000 dependiendo de la fuente de tejido, pudiendo la variación atribuirse a diferencias en la glicosilación. La clonación de ADNc puso de manifiesto

que las enzimas de conejo, rata y ser humano consisten en polipéptidos de 750, 742 y 742 aminoácidos, respectivamente (Neprilysin, Turner, Handbook of Proteolytic Enzymes 1080-1085 (1998)).

- 5 **[0124]** CD10 está fuertemente glicosilada con cinco o seis sitios de glicosilación ligada a N, dependiendo de la especie. Parece no haber otras modificaciones postraduccionales de la enzima ni se ha identificado ningún inhibidor natural circulante. El gen de CD10, localizado en la región cromosómica 3q21-q27, existe en una sola copia, abarca más de 80 kb, está compuesto por 24 exones y está altamente conservado entre especies de mamífero (Barker et al., "The common acute lymphoblastic leukemia antigen maps to chromosomal region 3(q21-q27)", J. Immunol, 142: 283-287 (1989)).
- 10 **[0125]** El dominio C-terminal de CD10 contiene el motivo de unión a cinc HEXXH típico de muchas peptidasas de cinc. Las histidinas en este motivo (His583 y 587 en la secuencia de conejo) constituyen dos de los ligandos de cinc, actuando un glutamato en la posición 646 como el tercer ligando de cinc. La Glu584 es esencial para la catálisis.

#### Biología de CD10

- 15 **[0126]** CD10 muestra una amplia distribución tisular, pero la actividad de la enzima es bastante variable entre diferentes tejidos. Se ha descubierto que el riñón tiene la mayor concentración de CD10, y que la enzima se localiza principalmente en las membranas de borde en cepillo de los túbulos proximales renales (A. J. Kenny, Trends Biochem. Sci. 11, 40 (1986)).
- 20 **[0127]** Se encuentra una concentración relativamente alta de CD10 en membranas de las células epiteliales de borde en cepillo del intestino, ganglios linfáticos y placenta, mientras que se localizan niveles significativos de la enzima en células musculares en el estómago, intestino delgado y colon (A. J. Kenny, S. L. Stephenson y A. J. Turner, en "Mammalian Ectoenzymes" (A. J. Kenny and A. J. Turner, eds.), pág. 169. Elsevier, Amsterdam, (1987)).
- 25 Se encuentra CD10 en menores concentraciones en glándulas suprarrenales, testículos, próstata, fibroblastos, neutrófilos y pulmón (A. J. Kenny, S. L. Stephenson y A. J. Turner, en "Mammalian Ectoenzymes" (A. J. Kenny and A. J. Turner, eds.), pág. 169. Elsevier, Amsterdam, (1987); N. Sales, I. Dutriez, B. Maziere, M. Ottaviani y B. P. Roques, Regul. Pept. 33, 209 (1991)). En el tracto respiratorio superior, se cree que la enzima aparece en células epiteliales, células serosas de las glándulas submucosas y paredes de los vasos (J. N. Baraniuk, K. Ohkubo, O. J. Kwon, J. Mak, J. Rohde, M. A. Kaliner, S. R. Durham y P. J. Barnes, J. Appl. Physiol. 74, 272 (1993)).
- 30 El descubrimiento de CD10 en endometrio humano, donde está confinado a las células estromales, sugiere un posible papel en la regulación del ciclo ovulatorio (M. L. Casey, J. W. Smith, K. Nagai, L. B. Hersh y P. C. MacDonald, J. Biol. Chem. 266, 23041 (1991); J. R. Head, P. C. MacDonald y M. L. Casey, J. Clin. Endocrinol. Metab. 76, 769 (1993)).
- 35 **[0128]** En el cerebro de mamífero, se ha descubierto CD10 en concentraciones relativamente elevadas en el plexo coroideo, la sustancia negra, caudado, putamen, globo pálido, tubérculo olfatorio, núcleo acuminado y la sustancia gelatinosa de la médula espinal. La enzima también se detectó en las meninges de la médula espinal de rata y ser humano (G. Waksman, R. Bouboutou, J. Devin, R. Besselievre, M. C. Fournie-Zaluski y B. P. Roques, Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 262 (1985); J. M. Zajac, Y. Charnay, J. M. Soleilhac, N. Sales y B. P. Roques, FEBS Lett. 216, 118 (1987)).

#### Purificación de CD10

- 45 **[0129]** CD10 puede purificarse por aplicación de cromatografía de inmunoafinidad empleando un anticuerpo monoclonal después de la solubilización de la enzima a partir de la membrana por tratamiento con detergente. También se han aplicado procedimientos cromatográficos convencionales en la purificación de CD10. Se ha conseguido la expresión y purificación a gran escala de neprilisina o CD10 recombinante a partir de una línea celular de insecto infectada con baculovirus. Se describen adicionalmente métodos de purificación en Li et al., "Neprilysin: Assay Methods, Purification, and Characterization", Methods in Enzymology, 248: 253-263 (1995).
- 50

#### Ensayos para CD10

- 55 **[0130]** Un ensayo de dos fases particularmente conveniente y sensible para CD10, que puede adaptarse a un ensayo en placa de microtitulación, implica el sustrato Suc-Ala-Ala+Leu-NHPhNO<sub>2</sub> en presencia de aminopeptidasa de *S. griseus* como enzima de acoplamiento (Indig et al., "Investigation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and of neutral proteinases (EC 3.4.24.4) using a new two-stage enzymatic reaction", FEBS, 255: 237-240 (1989)). La liberación de Leu-NHPhNO<sub>2</sub> por CD10 viene seguida de la liberación por aminopeptidasa del grupo saliente 4-nitroanilina que puede controlarse a 405 nm.
- 60 **[0131]** Se usan varios otros métodos de ensayo para seguir la actividad de CD10. Estos incluyen un ensayo radiométrico que mide la hidrólisis de derivados de encefalina tritizada, ensayos fluorométricos que siguen la hidrólisis de péptidos sintéticos que contienen un fluoróforo y ensayos que siguen la escisión de sustratos inactivados internamente (Li et al., "Neprilysin: Assay Methods, Purification, and Characterization", Methods in Enzymology, 248:

253-263 (1995)).

#### CD10 en células diana

5 **[0132]** La CD10 se expresa por células precursoras linfoides, linfocitos B de centros germinales y algunos mielocitos y, por lo tanto, se usa ampliamente como marcador de superficie celular para la categorización de leucemias agudas y la subclasificación de linfomas malignos. CD10 se expresa ampliamente en carcinomas de los tractos gastrointestinal y genitourinario y en algunos sarcomas, y puede ser un marcador útil para el diagnóstico diferencial de estos tumores (Chu et al., "Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms: Frequent Expression of Renal Cell Carcinoma and Endometrial Stromal Sarcoma", Am J Clin Pathol, 113: 374-382 (2000)).

15 **[0133]** Se ha descubierto que el antígeno CD10 está ampliamente asociado con leucemias linfoblásticas agudas de células B precursoras (Greaves et al., "Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts", Blood, 61: 628-639 (1983)). CD10 también está asociada con leucemias linfoblásticas agudas de células T (Weiss et al., "Lymphoblastic lymphoma: an immunophenotype study of 26 cases with comparison to T cell acute lymphoblastic leukemia," Blood, 67: 474-478 (1986)).

20 **[0134]** CD10 se expresa ampliamente en neoplasias del tracto genitourinario, incluyendo carcinoma de células renales, carcinoma de células de transición y adenocarcinoma prostático (Chu et al., "Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms: Frequent Expression of Renal Cell Carcinoma and Endometrial Stromal Sarcoma", Am J Clin Pathol, 113: 374-382 (2000)). Además, los sarcomas estromales endometriales, rhabdomyosarcomas, adenocarcinomas pancreáticos, el schwannoma y el melanoma maligno son positivos para CD10 (Chu et al., "Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms: Frequent Expression of Renal Cell Carcinoma and Endometrial Stromal Sarcoma", Am J Clin Pathol, 113: 374-382 (2000)). La positividad a CD10 estaba limitada a la superficie apical de las células glandulares malignas de adenocarcinoma de colon, páncreas y próstata bien diferenciado, mientras que en el adenocarcinoma escasamente diferenciado y otros tumores, tales como melanoma, carcinoma de células de transición, carcinoma de células renales y sarcoma estromal endometrial, la positividad a CD10 mostraba patrones citoplasmáticos o membranosos/Golgi difusos (Chu et al., "Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms: Frequent Expression of Renal Cell Carcinoma and Endometrial Stromal Sarcoma," Am J Clin Pathol, 113: 374-382 (2000)).

#### Especificidad de sustrato

35 **[0135]** La bibliografía contiene varias pistas en relación con los sustratos preferidos para CD10. Dos estudios, Pozsgay et al., "Substrate and Inhibitor Studies of Thermolysin-like Neutral Metalloendopeptidase From Kidney Membrane Fractions. Comparison with Bacterial Thermolysin", Biochemistry, 25: 1292-1299 (1986), y Hersh et al., "Comparison of the Subsite Specificity of the Mammalian Neutral Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) to the Bacterial Neutral Endopeptidase Thermolysin", The Journal of Biological Chemistry, 261: 6433-6437 (1986) han descrito en detalle la especificidad de sustrato de CD10. Ambas publicaciones se incorporan en la presente memoria como referencia. A continuación se proporciona un breve resumen de los resultados de especificidad de sustrato obtenidos en estas dos publicaciones.

45 **[0136]** El sustrato óptimo para CD10 sería un oligopéptido de fórmula  $AA^{P3}-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-AA^{P2'}-AA^{P3'}$ , en la que:

50  $AA^{P3}$  es Phe o Ala  
 $AA^{P2}$  es Phe,  
 $AA^{P1}$  es Gly o Ala  
 $AA^{P1'}$  es Phe o Leu  
 $AA^{P2'}$  es Leu  
 $AA^{P3'}$  es Ala

55 De estos restos, la posición P3' parece ser la menos importante de acuerdo con la bibliografía.

60 **[0137]** La especificidad primaria de esta metaloendopeptidasa unida a membrana está dirigida hacia enlaces peptídicos en el lado amino de restos de aminoácidos hidrófobos. Como otras proteasas, esta enzima tiene un sitio de unión a sustrato prolongado que aloja al menos cuatro restos de aminoácidos. El sitio activo de la enzima contiene aparentemente un bolsillo hidrófobo en el subsitio S1' que interacciona con las cadenas laterales de restos de aminoácidos hidrófobos.

**[0138]** Las constantes de velocidad de renovación (kcat) y la constante de especificidad (kcat/km) aumentan enormemente cuando un resto Gly en el P1' se sustituye por restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales

hidrófobas. Por lo tanto, la sustitución del resto Gly por una Leu causa un aumento de 140 veces en la constante de velocidad de renovación y un aumento de 370 veces en la constante de especificidad. Sin embargo, se observa una disminución en estos parámetros cuando un resto Leu se sustituye por un resto Phe, y aún más por un resto Tyr, por experimentos descritos en la bibliografía.

5

**[0139]** Los parámetros cinéticos obtenidos con sustratos en los que los restos que se unen al bolsillo hidrófobo en el subsitio S1' de la enzima eran variados mostraban que un resto Leu en P1' proporcionaba la mayor kcat, mientras que restos Phe mostraban la menor Km. La sustitución del resto Phe por una Tyr condujo a un aumento marcado en la Km y a una disminución en la constante de velocidad de renovación.

10

**[0140]** La presencia de un resto Phe en la posición P1' causaba una disminución pronunciada en la constante de velocidad de renovación que era independiente de la clase de resto presente en la posición P2', sugiriendo la presencia de restricciones de tamaño definitivas en los restos que se unen en el subsitio S1'. De hecho, las mayores velocidades de reacción se obtuvieron con sustratos que tenían un resto Ala en esta posición. Los menores valores de Km se obtuvieron con un resto Phe en la posición P1', sugiriendo que este resto proporciona la mayor afinidad de unión.

15

**[0141]** En el subsitio P1', el efecto de la sustitución de aminoácidos se reflejada principalmente en la kcat y, por consiguiente, en la kcat/Km. Un resto Ala en esta posición da como resultado valores de kcat 8 y 3,5 veces mayores respecto a Gly o Phe. La sustitución de un D-aminoácido en esta posición conduce a un sustrato no reactivo. Las interacciones de P1' con la enzima no implican fuertes interacciones hidrófobas.

20

**[0142]** Se obtuvieron bajos valores de Km para la enzima cuando la posición P2' estaba representada por un resto Phe. Además, los sustratos con este resto proporcionaron tanto velocidades de reacción elevadas como valores de Km reducidos cuando la posición P1' se sustituía por un resto Ala o Gly.

25

**[0143]** Los efectos principales de la sustitución de aminoácidos en el subsitio P2' de la enzima se reflejan en la Km, uniéndose la Leu 3 veces más fuerte y la Gly 3 veces más débil que la Ala. Las interacciones hidrófobas de la enzima en P2' no afectan a las interacciones de P1' y, por lo tanto, se reflejan directamente en la Km. Las interacciones de unión en la posición P2' parecen implicar interacciones hidrófobas, como se observa a partir de los valores de Km 4 veces menores de la Phe y Ala respecto a la Gly. Un resto D-Ala en la posición P2' de la enzima no afecta mucho a la catálisis. Puede aceptarse un resto D-Ala en esta posición, dando como resultado los mayores valores de kcat.

30

**[0144]** El sustrato fluorogénico dansilo-D-Ala-Gly (pNO<sub>2</sub>)Phe-Gly se hidroliza a una velocidad apreciable por la enzima. La enzima muestra un aumento de 8-9 veces en la unión de un ácido libre respecto a su amida. Este descubrimiento sugiere que la unión de sustrato a la enzima depende en parte de interacciones de subsitio hidrófobas, así como de una interacción electrostática relativamente fuerte con un grupo carboxilo COOH-terminal libre. La consecuencia de esta interacción iónica debería ser una preferencia por la escisión de sustratos hacia su extremo COOH-terminal.

35

40

**[0145]** Se cree que la enzima implicada en la activación de los profármacos descritos está asociada con la membrana externa de células diana pero se encuentra en la circulación sólo a niveles muy reducidos. Más probablemente, se genera por las propias células diana o por células normales que se asocian con las células diana, tales como leucocitos, células estromales, células B, neutrófilos o macrófagos. El término leucocitos, como se usa en la presente memoria, incluye linfocitos, monocitos, macrófagos, granulocitos, leucocitos polimorfonucleares, células asesinas naturales y células dendríticas. Así, por ejemplo, la enzima asociada a célula diana puede estar presente de alguna otra forma en las proximidades extracelulares de la célula diana. En muchos casos, el profármaco incluye un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer y la célula diana es una célula tumoral. Por lo tanto, la enzima puede estar unida a la membrana extracelular de la célula tumoral, o puede estar presente extracelularmente debido a células asociadas a tumores que expresan las enzimas.

45

50

**[0146]** Son especialmente útiles compuestos que se escinden preferentemente por la enzima descrita en la presente memoria y que son resistentes a la escisión en otra parte del cuerpo por otras endopeptidasas. Otras enzimas que se sabe que escinden pequeños péptidos a cierta velocidad detectable y que podrían conducir a una activación excesiva o inapropiada de los profármacos incluyen TOP, PSA y metaloproteinasas de la matriz. Los compuestos que pueden escindirse por CD10 pero que son resistentes a la escisión por la enzima TOP son especialmente útiles. Son ejemplos de compuestos escindibles por CD10 pero resistentes a la escisión por TOP Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

55

60

**[0147]** También son útiles compuestos que pueden escindirse por CD10 pero que son resistentes a la escisión por antígeno prostático específico (PSA). Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox también son ejemplos de estos tipos de compuestos.

**Grupo estabilizante**

5 **[0148]** Una porción importante del profármaco es el grupo estabilizante, que sirve para proteger el compuesto de profármaco de la escisión en sangre circulante cuando se administra al paciente y, por lo tanto, permite que el profármaco alcance las proximidades de la célula diana relativamente intacto. El grupo estabilizante protege al profármaco de la escisión por proteinasas y peptidasas presentes en la sangre, suero sanguíneo y tejido normal. Puesto que el grupo estabilizante típicamente protege el extremo N-terminal del oligopéptido, y se le denomina por lo  
10 tanto a veces protección N-terminal o bloqueo N-terminal, sirve para guardar contra peptidasas a las que de otro modo el profármaco podría ser susceptible.

**[0149]** Idealmente, el grupo estabilizante es útil en el profármaco de la invención si sirve para proteger al profármaco de la degradación, es decir, de la escisión, cuando se ensaya por almacenamiento del compuesto de  
15 profármaco en sangre humana a 37 °C durante 2 horas y da como resultado una escisión inferior al 20%, preferentemente inferior al 2%, del profármaco por las enzimas presentes en la sangre humana en las condiciones de ensayo dadas.

**[0150]** En el método de la reivindicación 1, el grupo estabilizante es ácido succínico, ácido adípico, ácido glutárico o ácido ftálico, siendo más preferido ácido succínico y ácido adípico. Otros ejemplos incluyen ácido diglicólico, ácido  
20 fumárico, ácido naftaleno dicarboxílico, ácido piroglutámico, ácido acético, ácido 1- o 2-naftilcarboxílico, ácido 1,8-naftil dicarboxílico, ácido aconítico, ácido carboxicinámico, ácido triazol dicarboxílico, ácido glucónico, ácido 4-carboxifenil borónico, un análogo de (PEG)<sub>n</sub> tal como ácido polietilenglicólico, ácido butano disulfónico, ácido maleico, ácido nipecótico y ácido isonipecótico. Los grupos estabilizantes mencionados anteriormente son  
25 protecciones N-terminales.

**[0151]** Además, un aminoácido no codificado genéticamente seleccionado de uno de los siguientes también puede usarse como grupo estabilizante usado en el método de la reivindicación 1: β-alanina, ácido tiazolidin-4-carboxílico, 2-tienilalanina, 2-naftilalanina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-fenilalanina, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico,  
30 ácido γ-aminobutírico, ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico, ácido tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico, ácido 4-aminometilbenzoico y ácido aminoisobutírico.

**[0152]** Además, en algunos experimentos la administración intravascular de un profármaco agregante cargado positivamente en ratones daba como resultado una toxicidad aguda. Sin embargo, no se observó dicha toxicidad  
35 cuando la carga en este profármaco se invertía por derivatización con un grupo estabilizante cargado negativamente.

**[0153]** Muchos compuestos citotóxicos tienen intrínsecamente una escasa solubilidad. Las antraciclinas cargadas positivamente, por ejemplo, pueden formar agregados a alta concentración y estos agregados pueden inducir una  
40 coagulación intravenosa cuando los agregados se administran por vía intravenosa. Puesto que muchos oligopéptidos tienen extremos amino-terminales cargados positivamente expuestos a pH fisiológico, estos agregados pueden formar una superficie policargada positivamente *in vivo* e inducir una cascada de coagulación a los pocos minutos desde su administración. Esto tiene el potencial de volver cualquier profármaco cargado positivamente que  
45 forma agregados inadecuado para uso terapéutico.

**[0154]** Como se describe en mayor detalle en el documento WO 00/33888, una forma de abordar dicho obstáculo potencialmente peligroso es utilizar el grupo estabilizante en el extremo N-terminal de la cadena peptídica de una  
funcionalidad cargada negativamente o neutra. Por ejemplo, el uso de succinilo como grupo estabilizante en el profármaco puede aliviar la toxicidad aguda del profármaco. Esto resuelve un problema importante en el uso de  
50 profármacos peptídicos como terapias prácticas para uso intravenoso en seres humanos.

**Oligopéptido**

**[0155]** Los oligopéptidos se definen en general como polipéptidos de longitud corta, típicamente de veinte  
55 aminoácidos o menos. Un oligopéptido útil en el profármaco descrito en la presente memoria tiene una longitud de al menos tres aminoácidos y, preferentemente, una longitud de tres a seis aminoácidos. Sin embargo, también son útiles oligopéptidos de una longitud más allá del intervalo.

Esquema de numeración

60 **[0156]** La porción oligopeptídica del profármaco descrito en la presente memoria y reivindicado en el método de la reivindicación 1 tiene una fórmula (AA)<sub>n</sub>-AA<sup>P2</sup>-AA<sup>P1</sup>-AA<sup>P1</sup>-(AA)<sub>m</sub>. En esta fórmula, n y m son números enteros. Como se usa en la presente memoria, un número entero es cualquier número natural positivo o cero. El oligopéptido tiene una longitud de tres o más aminoácidos. En la realización preferida, n es un número entero de 0 a 3, y en conjunto, 0

a  $3m + n$  no es más de 3. Por lo tanto, el oligopéptido preferido tiene una longitud de 3-6 aminoácidos. Cada AA en la fórmula representa independiente un aminoácido. Ciertos aminoácidos se presentan con un superíndice que indica su posición respecto al sitio de escisión por CD10. Particularmente, CD10 escinde entre el aminoácido en la posición  $P1$ , es decir,  $AA^{P1}$ , y el aminoácido en la posición  $P1'$ , es decir,  $AA^{P1'}$ .

5

**[0157]** El oligopéptido se escribe de la forma convencional con el extremo carboxilo-terminal (o extremo C-terminal) a la derecha y el extremo amino-terminal (o extremo N-terminal) a la izquierda.

**[0158]** En el oligopéptido de la invención,  $AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido.  $AA^{P1}$  también representa cualquier aminoácido, como lo hace  $AA^{P1'}$ . Los aminoácidos adicionales pueden estar presentes unidos a la sección de núcleo  $AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}$  del oligopéptido. En general, se unen de 0 a 3 aminoácidos adicionales a  $AA^{P2}$  o  $AA^{P1}$ , pero son posibles más de tres. Estos aminoácidos adicionales se presentan en la fórmula como  $(AA)_n$  o  $(AA)_m$ . Cada AA en la serie representado por  $(AA)_n$  o  $(AA)_m$  también representa independientemente un aminoácido. Por lo tanto, cuando  $m = 1$ , entonces  $(AA)_m$  representa  $AA_{m=1}$  y  $AA_{m=1}$  se une a  $AA^{P1}$ .  $AA_{m=1}$  está entonces en la posición  $P2'$  y puede representarse mediante  $AA^{P2'}$ . Cuando  $m = 2$ , entonces  $(AA)_m$  representa  $AA_{m=1}-AA_{m=2}$ , con  $AA_{m=1}$  en la posición  $P2'$  y  $AA_{m=2}$  en la posición  $P3'$ , y  $AA_{m=1}$  se une a  $AA^{P1}$ . Cuando  $m = 3$ , entonces  $(AA)_m$  representa  $AA_{m=1}-AA_{m=2}-AA_{m=3}$ , (es decir,  $AA^{P2'}-AA^{P3'}-AA^{P4'}$ ) y  $AA_{m=1}$  se une a  $AA^{P1}$ . De forma similar, puede estar presente  $AA_{n=1}$  o  $AA_{n=2}-AA_{n=1}$  o  $AA_{n=3}-AA_{n=2}-AA_{n=1}$ , con el  $AA_{n=1}$  unido a  $AA^{P2}$  y representando  $AA^{P3}$ ,  $AA_{n=2}$  está por lo tanto en la posición  $P^4$ ,  $AA_{n=3}$  está en la posición  $P^5$ .

20

#### Aminoácidos preferidos

**[0159]** A menos que se indique otra cosa, todos los aminoácidos están en la configuración L. Aunque puede estar presente cualquier aminoácido en la porción oligopeptídica del profármaco, se prefieren ciertos aminoácidos.

25

**[0160]** Particularmente,  $AA^{P1}$  se selecciona preferentemente del grupo que consiste en arginina, alanina, glicina, leucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, glutamina, valina y serina.

**[0161]** De forma similar,  $AA^{P1'}$  se selecciona preferentemente del grupo que consiste en leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, tirosina y prolina.  $AA^{P1'}$  es preferentemente un aminoácido hidrófobo.

30

**[0162]** En algunas realizaciones de la invención, se prefieren emparejamientos de  $AA^{P1}-AA^{P1'}$  particulares. En concreto, la combinación de  $AA^{P1}-AA^{P1'}$  se selecciona preferentemente del grupo que consiste en Arg-Leu, Arg-Ile, Arg-Phe, Arg-Val, Ala-Phe, Ala-Leu, Gly-Phe, Gly-Leu, Leu-Phe, Leu-Tyr, Met-Leu, Pro-Phe, Pro-Tyr, Pro-Leu, Phe-Leu, Phe-Phe, Tyr-Ile, Tyr-Pro, Tyr-Leu, Gln-Phe, Val-Tyr, Val-Phe, Ser-Leu, Gly-Trp y Asp-Phe.

35

**[0163]** Preferentemente está presente un aminoácido hidrófobo como  $AA^{P2}$ . Por lo tanto, la isoleucina es un aminoácido particularmente útil en la posición  $P2$ . Si  $m$  es 1 a 3, entonces  $AA_{n=1}$  es preferentemente un aminoácido hidrófobo también.

40

**[0164]** Como ejemplos, pueden estar presentes las secuencias de aminoácidos siguientes en el oligopéptido como al menos una porción de la secuencia escindible por CD10:  $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu,  $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu, Leu-Ala-Leu, Met-Ala-Leu y Phe-Ala-Leu.

#### 45 Agentes terapéuticos

**[0165]** Los agentes terapéuticos que son particularmente ventajosos para modificar una forma profármaco son aquellos con una estrecha ventana terapéutica. Un fármaco o agente terapéutico con una estrecha ventana terapéutica es uno en el que la dosis a la que se manifiesta la toxicidad, por patrones médicos generales, está muy próxima a la dosis a la que se manifiesta la eficacia.

50

**[0166]** El agente terapéutico conjugado con el grupo estabilizante y el oligopéptido y, opcionalmente, el grupo enlazador para formar el profármaco descrito en la presente memoria y que se usará en la reivindicación 1 puede ser útil para el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria o alguna otra afección médica. Preferentemente, el agente terapéutico se selecciona entre las siguientes clases de compuestos: agentes alquilantes, agentes antiproliferativos, agentes de unión a tubulina, alcaloides de la vinca, enediinas, podofilotoxinas o derivados de podofilotoxina, la familia de fármacos de la pteridina, taxanos, antraciclinas, dolastatinas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes quimioterápicos de complejos de coordinación de platino y maitansinoides.

55

**[0167]** Particularmente, el agente terapéutico se selecciona ventajosamente de los compuestos siguientes, o un derivado o análogo de los mismos: doxorubicina, daunorubicina, vinblastina, vincristina, caliqueamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretastatina, fosfato de combretastatina  $A_4$ , dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecán, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina,

60

tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, halicondrina B, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, bleomicina, melfalán, cloroquina, ciclosporina A y maitansina. Por derivado se entiende un compuesto que se obtiene como resultado de la reacción del compuesto nombrado con otro resto químico, e incluye una sal, ácido, base o éster farmacéuticamente aceptable del compuesto nombrado. Por análogo se entiende un compuesto  
5 que tiene propiedades estructurales y funcionales similares, tales como actividades biológicas, a las del compuesto nombrado.

### Grupos enlazadores

10 **[0168]** Un grupo enlazador entre el oligopéptido y el agente terapéutico puede ser ventajoso por razones tales como las siguientes:

1. Como espaciador para consideraciones estéricas para facilitar la liberación enzimática del aminoácido unido al agente terapéutico u otras etapas de activación enzimática.
- 15 2. Para proporcionar una química de unión apropiada entre el agente terapéutico y el oligopéptido.
3. Para mejorar el procedimiento sintético de generar el conjugado de profármaco (por ejemplo, prederivatizando el agente terapéutico u oligopéptido con el grupo enlazador antes de la conjugación para aumentar el rendimiento o la especificidad).
4. Para mejorar las propiedades físicas del profármaco.
- 20 5. Para proporcionar un mecanismo adicional para la liberación intracelular del fármaco.

**[0169]** Las estructuras de enlazador vienen impuestas por la funcionalidad necesaria. Son ejemplos de químicas enlazadoras potenciales hidrazida, éster, éter y sulfhidrilo. El ácido aminocaproico es un ejemplo de un grupo enlazador bifuncional. Cuando se usa el ácido aminocaproico como parte del grupo enlazador, no se cuenta como  
25 un aminoácido en el esquema de numeración del oligopéptido.

### Diseño de profármaco

**[0170]** Un método de diseño de un profármaco como se describe en la reivindicación 1 de la invención implica  
30 inicialmente identificar un oligopéptido como se ha descrito anteriormente. Después, el oligopéptido se une en un primer sitio de unión del oligopéptido a un grupo estabilizante de la reivindicación 1, que obstaculiza la escisión del oligopéptido por enzimas presentes en sangre completa, y se une directa o indirectamente a un agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido. El primer sitio de unión es habitualmente el extremo N-terminal del oligopéptido, pero puede ser el extremo C-terminal del oligopéptido u otra parte del oligopéptido. El segundo sitio de  
35 unión es habitualmente el extremo C-terminal del oligopéptido, pero puede ser el extremo N-terminal del oligopéptido u otra parte del oligopéptido. El enlace del oligopéptido con el agente terapéutico y el grupo estabilizante puede realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo.

**[0171]** El conjugado resultante se ensaya para determinar su capacidad de escisión por CD10 como se menciona  
40 en la reivindicación 1, utilizando métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, el conjugado puede ensayarse para determinar su capacidad de escisión por CD10 por incubación del conjugado con CD10 purificada a partir de una fuente celular y análisis de los productos resultantes por HPLC usando detección de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 2. El conjugado puede seleccionarse como un profármaco si es escindible por  
45 CD10.

**[0172]** Un oligopéptido que todavía no está conjugado con el grupo estabilizante o con el grupo terapéutico también puede ensayarse para determinar su capacidad de escisión por CD10 mediante los métodos usados para  
50 ensayar la capacidad de escisión del conjugado. La capacidad de escisión por CD10 es indicativa del oligopéptido como candidato para el diseño de un profármaco.

**[0173]** En la presente memoria también se describe un método de exploración para identificar un oligopéptido útil para diseñar un profármaco. Se proporcionan oligopéptidos de tres o más aminoácidos y se ensayan para  
55 determinar su escisión por CD10. Como se ha analizado anteriormente, la capacidad de escisión por CD10 es indicativa del oligopéptido como candidato para el diseño de un profármaco.

**[0174]** Se describe en la presente memoria un ensayo adicional para determinar la capacidad de escisión por CD10 pero la resistencia a la escisión por TOP. El ensayo para determinar la capacidad de escisión por CD10 pero la resistencia a la escisión por antígeno prostático específico (PSA) es parte de la invención. El conjugado resultante también puede ensayarse para determinar su estabilidad en sangre completa. Pueden seleccionarse compuestos de  
60 ensayo estables en sangre completa. Se realiza una selección de compuestos que pueden escindirse por CD10 y resistentes a la escisión por PSA como se menciona en la reivindicación 1. También se describe un profármaco diseñado por un método de este tipo.

**[0175]** Además, en la presente memoria se describe un método para disminuir la toxicidad de un agente terapéutico que está destinado a su administración a un paciente. En concreto, una forma profármaco modificada del

agente terapéutico se forma uniendo directa o indirectamente el agente terapéutico a un oligopéptido escindible por CD10 y, preferentemente, también resistente a la escisión por TOP y PSA. El oligopéptido también se une a un grupo estabilizante. Preferentemente, el oligopéptido tiene la fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

- 5 n y m son números enteros,  
 $AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido,  
 cada AA representa independientemente un aminoácido.

10 Más preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y  $m + n$  no es más de 3.

**[0176]** El profármaco así formado proporciona una toxicidad disminuida del agente terapéutico cuando se administra al paciente. La modificación del agente terapéutico de esta forma también permite la administración de una dosificación aumentada del agente terapéutico al paciente respecto a la dosificación del agente terapéutico en forma no conjugada.

### Composiciones farmacéuticas

20 **[0177]** En la presente memoria también se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto, particularmente un compuesto de profármaco, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo un adyuvante o excipiente.

**[0178]** Más específicamente, una composición farmacéutica descrita comprende:

25 (1) un compuesto que comprende:

- (a) un agente terapéutico capaz de entrar en una célula diana,  
 (b) un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

30 n y m son números enteros,  
 $AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y  
 35 cada AA representa independientemente un aminoácido.

(c) un grupo estabilizante, y  
 (d) opcionalmente, un grupo enlazador no escindible por CD10,  
 en el que el oligopéptido se une directamente al grupo estabilizante en un primer sitio de unión del oligopéptido y el oligopéptido se une directamente al agente terapéutico o se une indirectamente a través del grupo enlazador al agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido,  
 en el que el grupo estabilizante obstaculiza la escisión del compuesto por enzimas presentes en sangre completa, y  
 en el que el compuesto es escindible por CD10, y

45 (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y  $m + n$  no es más de 3 en el oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  del compuesto.

50 **[0179]** En la presente memoria también se describe el uso de la composición farmacéutica para la preparación de un producto medicinal destinado al tratamiento de una afección médica.

**[0180]** Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse al paciente por vía parenteral, especialmente por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las composiciones farmacéuticas de la invención para administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Como vehículo o disolvente o excipiente farmacéuticamente aceptable puede emplearse propilenglicol, polietilenglicol, ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo, oleato de etilo o ciclodextrinas. La solución salina isotónica puede ser parte de la composición farmacéutica. Estas composiciones también pueden comprender agentes humectantes, emulsionantes y/o dispersantes.

**[0181]** La esterilización puede llevarse a cabo de varias formas, por ejemplo usando un filtro bacteriológico, incorporando agentes esterilizantes en la composición o por irradiación. También pueden prepararse en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el momento del uso en agua estéril o cualquier otro medio

inyectable estéril.

**[0182]** La composición farmacéutica también puede comprender adyuvantes que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, vitamina C, ácido málico, agentes antioxidantes, etc.) y capaces de usarse en combinación con el compuesto de la invención para mejorar y prolongar el tratamiento de la afección médica para la que se administran.

5

**[0183]** Las dosis para la administración a un paciente de los compuestos de acuerdo con la invención son generalmente al menos las dosis habituales de los agentes terapéuticos conocidos en el campo, descritas en Bruce A. Chabner y Jerry M. Collins, Cancer Chemotherapy, Lippincott Ed., ISBN 0-397-50900-6 (1990) o pueden ajustarse a juicio del médico adjunto, para adaptarse a la eficacia superior de las formulaciones profarmacológicas o a las circunstancias particulares del paciente que se esté tratando. Por lo tanto, las dosis administradas varían de acuerdo con el agente terapéutico usado para la preparación del compuesto descrito en la presente memoria.

10

#### Tratamiento con compuesto de profármaco

15 **[0184]** También se describe un medicamento para el tratamiento terapéutico de una afección médica que implica administrar, preferentemente por vía parenteral y, más preferentemente, por vía intravenosa, al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

20 **[0185]** Por lo tanto, un método para tratar a un paciente incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente memoria.

**[0186]** El compuesto de profármaco es generalmente útil para el tratamiento de muchas afecciones médicas incluyendo cáncer, enfermedades neoplásicas, tumores, enfermedades inflamatorias y enfermedades infecciosas. Son ejemplos de enfermedades preferidas para tratamiento el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cerebral y cáncer pancreático. Más específicamente, puesto que se han identificado varios tipos tumorales específicos como positivos para CD10, el tratamiento de estos tipos de tumores es especialmente ventajoso con los compuestos mostrados en la presente memoria. En concreto, puede efectuarse el tratamiento de uno de los tipos tumorales siguientes: leucemia linfoblástica de células B, leucemia linfoblástica de células T, linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, melanoma, melanoma ocular, melanoma cutáneo, adenocarcinomas de colon, carcinomas hepatocelulares, carcinoma de células renales, carcinoma ovárico, adenocarcinoma prostático, carcinoma hepático, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama y carcinoma de colon.

25

30

35 **[0187]** Formulado en vehículos farmacéuticamente aceptables (tales como solución salina isotónica), el compuesto de profármaco puede administrarse a animales o seres humanos en dosis intravenosas que varían de 0,05 mg/kg/dosis/día a 300 mg/kg/dosis/día. También puede administrarse por goteo intravenoso u otro método de infusión lenta.

40

**[0188]** Los pacientes humanos son los destinatarios habituales del profármaco descrito en la presente memoria, aunque también se contempla el uso veterinario.

45 **[0189]** En la presente memoria se describe un medicamento para su uso en un método para tratar un trastorno que tiene células diana asociadas a CD10, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende:

- (1) un agente terapéutico capaz de entrar en una célula diana,  
 (2) un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

50

n y m son números enteros,  
 $AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,  
 $AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y  
 cada AA representa independientemente un aminoácido.

55

- (3) un grupo estabilizante, y  
 (4) opcionalmente, un grupo enlazador no escindible por CD10,  
 en el que el oligopéptido se une directamente al grupo estabilizante en un primer sitio de unión del oligopéptido y el oligopéptido se une directamente al agente terapéutico o se une indirectamente a través del grupo enlazador al agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido,  
 en el que el grupo estabilizante obstaculiza la escisión del compuesto por enzimas presentes en sangre completa, y  
 en el que el compuesto es escindible por CD10.

60

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3. El compuesto es escindible por CD10 en condiciones fisiológicas.

5 **[0190]** A continuación se describe en más detalle un medicamento para su uso en un método para tratar un trastorno tal como un tumor en un paciente. El método incluye las etapas de detectar CD10 en una célula diana y administrar un profármaco escindible por CD10 al paciente si CD10 está asociada con la célula diana. La etapa de detección incluye además las etapas de obtener una muestra de tejido del paciente, combinar la muestra con un anticuerpo contra CD10 y determinar si se ha producido la unión del anticuerpo contra CD10 a la muestra.

10 **[0191]** Se describe en la presente memoria un medicamento para su uso en un método para tratar un tumor positivo para CD10 u otra célula diana positiva para CD10, que comprende administrar un profármaco escindible por CD10 al tumor u otra célula diana. El profármaco escindible por CD10 está caracterizado como se ha descrito anteriormente. También se describe particularmente un medicamento para su uso en un método de tratamiento del  
 15 profármaco tiene un agente terapéutico generalmente útil para el tratamiento del cáncer de próstata. Otro aspecto descrito en la presente memoria es el uso de un compuesto como se describe para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con un trastorno que tiene células diana asociadas a CD10.

20 **[0192]** Como se ha descrito anteriormente, una célula diana puede estar asociada a CD10 si se genera CD10 por la célula diana o por células normales que están asociadas con las células diana, tales como leucocitos, células estromales, células B, neutrófilos o macrófagos. Por lo tanto, la CD10 puede estar unida a la membrana extracelular de la célula diana o puede estar presente extracelularmente porque las células asociadas a la célula diana expresen la enzima.

25 Uso de la inmunoreactividad de CD10 en tejido tumoral humano para diagnosticar y tratar tumores positivos para CD10

**[0193]** Los profármacos descritos en la presente memoria tienen usos particularmente novedosos en el caso de tumores que expresan CD10 como marcador de superficie en algunas o todas las células del tumor. Pueden usarse  
 30 reactivos de tinción inmunohistoquímica para CD10 como marcadores de diagnóstico para tumores con una susceptibilidad particular a profármacos escindibles por CD10, de modo que puedan preseleccionarse pacientes para el tratamiento. Por ejemplo, se esperaría que la producción localizada de doxorubicina que se libera a partir de profármacos escindibles por CD10 mediante CD10 en células tumorales aumentase la seguridad relativa del profármaco en comparación con el tratamiento con doxorubicina libre que, por el contrario, se esperaría que  
 35 actuase sobre todas las células indiscriminadamente.

**[0194]** Los pacientes con tumores sólidos, o sospechosos de presencia de células tumorales en un tejido, podrían explorarse por biopsia de tejido tumoral, después de la identificación de la presencia de un tumor por procedimientos médicos convencionales. Los histopatólogos usan rutinariamente anticuerpos monoclonales de diagnóstico  
 40 convencionales para identificar y clasificar los tumores basándose en la inmunoreactividad de CD10. En particular, el anticuerpo monoclonal de ratón contra CD10 humana, clon 56C6, Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido, se usa ampliamente con este fin (Suzuki, et al., "Imbalance between neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-1 expression in human endometrial carcinoma" Oncology 60: 258-267 (2001); y Chu y Arber, "Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and  
 45 endometrial stromal sarcoma", Am. J. Pathol. 113: 374-382 (2000)).

**[0195]** Pequeñas biopsias de tumor pueden tratarse para inmunohistoquímica de la forma siguiente. Las biopsias pueden fijarse en formalina tamponada neutra, después embeberse en parafina y seccionarse (6-10 micrómetros). Las secciones pueden desparafinarse y rehidratarse. Para la recuperación de epítomos inducida por calor, las  
 50 secciones desparafinadas en tampón citrato 0,01 M pueden tratarse en un horno microondas. Puede realizarse una tinción inmunohistoquímica usando la técnica de inmunoperoxidasa con avidina-biotina. El anticuerpo monoclonal de ratón contra CD10 humana, clon 56C6, puede usarse como una dilución 1:20. El anticuerpo de IgG1 de ratón MOPC-31C puede usarse como control negativo del mismo isotipo. Después, se realiza la contratinción de las secciones con hematoxilina de Mayer. La inmunoreactividad de CD10 está indicada por una tinción marrón  
 55 específicamente alrededor de la periferia de células positivas en tejido tratado con anti-CD10 humana, pero no el control de isotipo. Estos tumores son dianas para el tratamiento con un profármaco que sea susceptible a la escisión por CD10.

**[0196]** De forma similar, otros tumores humanos no sólidos que pueden ser positivos para CD10, tales como  
 60 tumores hematológicos que pueden no ser accesibles por biopsia, pueden explorarse para determinar la presencia de CD10 por inmunohistoquímica y analizarse mediante métodos con citómetro de flujo clínico convencional (por ejemplo, FACS). Dichos tumores que se exploran como positivos también serían dianas para un profármaco escindible por CD10. Los ensayos *in vitro* con la línea celular Ramos (linfoma de células B humano) indican que CD10 puede detectarse fácilmente en células mediante este método.

**Diagnóstico o ensayo**

**[0197]** También se describe un artículo de fabricación, tal como un kit, para el diagnóstico o ensayo. Dicho artículo de fabricación utilizaría preferentemente un compuesto como se ha descrito anteriormente, excepto por el hecho de que un marcador, tal como cumarina, se conjuga con el oligopéptido y el grupo estabilizante en lugar de un agente terapéutico. Un marcador como se usa se define como cualquier resto que puede conjugarse con el oligopéptido y que es fácilmente detectable por cualquier método conocido en la técnica. Típicamente se incluye como parte del kit al menos un reactivo útil en la detección del marcador. Por lo tanto, el artículo de fabricación incluiría lo siguiente:

10

(1) un compuesto que comprende:

(a) un marcador,

(b) un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

15

n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

cada AA representa independientemente un aminoácido.

20

(c) un grupo estabilizante, y

(d) opcionalmente, un grupo enlazador,

en el que el oligopéptido se une directamente al grupo estabilizante en un primer sitio de unión del oligopéptido y el oligopéptido se une directamente al marcador o se une indirectamente a través del grupo enlazador al marcador en un segundo sitio de unión del oligopéptido,

25

en el que el grupo estabilizante obstaculiza la escisión del compuesto por enzimas presentes en sangre completa, y

en el que el compuesto es escindible por CD10, y

30

(2) al menos un reactivo útil en la detección de dicho marcador.

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

**[0198]** El artículo de fabricación puede usarse, por ejemplo, con muestras de pacientes para diagnosticar tumores o para identificar pacientes susceptibles a tratamiento por terapia con profármaco.

35

**Procedimientos generales de química de proceso****Oligopéptido: Método general para la síntesis de péptidos**

40

**[0199]** Las secuencias peptídicas, u oligopeptídicas, en los conjugados de profármaco de esta invención pueden sintetizarse mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (usando química de Boc o Fmoc) o por síntesis en fase de solución. Los métodos de Boc y Fmoc generales se usan ampliamente y se describen en las referencias siguientes: Merrifield, J. A. Chem. Soc., 88: 2149 (1963); Bodanszky y Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlín, 7-161 (1994); Stewart, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical, Rockford, (1984).

45

**Método general en fase sólida de Fmoc**

**[0200]** Usando el método de síntesis en fase sólida preferido, automático o manual, se sintetiza un péptido de secuencia y longitud deseada mediante la adición por etapas de aminoácidos a una cadena en crecimiento que está unida a una resina sólida. Los ejemplos de resinas compatibles con Fmoc útiles incluyen resina de Wang, resina HMPA-PEGA, resina ácida de Rink o una resina de hidroxietil-fotoenlazador. El extremo C-terminal de la cadena peptídica se une covalentemente a una resina polimérica y se añaden  $\alpha$ -aminoácidos protegidos de una forma por etapas con un reactivo de acoplamiento. Un grupo protector  $\alpha$ -amino preferido es el grupo Fmoc, que es estable en las condiciones de acoplamiento y puede eliminarse fácilmente en condiciones alcalinas suaves. Los disolventes de reacción son preferentemente DMF, NMP, DCM, MeOH y EtOH. Son ejemplos de agentes de acoplamiento: DCC, DIC, HATU, HBTU. La escisión del grupo protector N-terminal se efectúa en piperidina al 10-100% en DMF a 0-40 °C, prefiriéndose la temperatura ambiente. Al final de la síntesis, el grupo protector Fmoc final se elimina usando el procedimiento de escisión N-terminal anterior. El péptido restante en la resina se escinde de la resina junto con cualquier grupo protector de cadena lateral sensible a ácido por tratamiento de la resina en condiciones ácidas. Por ejemplo, una condición de escisión ácida es una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano. Si se usa la resina de hidroxietil-fotoenlazador, la longitud de onda apropiada para inducir la escisión es luz ultravioleta de  $\lambda$  365 nm. Se proporciona una representación esquemática de este procedimiento en la FIG. 3.

50

55

60

**Método general de protección N-terminal mediante síntesis en fase sólida**

[0201] La preparación de péptidos derivatizados en su extremo N-terminal se logra convenientemente en fase sólida. Cuando se completa la síntesis del péptido, el Fmoc terminal se elimina mientras que el péptido está todavía en el soporte sólido. La protección N-terminal de elección se acopla a continuación usando condiciones de acoplamiento de péptidos convencionales sobre el extremo N-terminal del péptido. A la finalización del acoplamiento de la protección N-terminal, el péptido se escinde de la resina usando el procedimiento descrito anteriormente si se usa el procedimiento de síntesis de Fmoc.

**Método general en fase sólida de Boc**

[0202] Para el método en fase sólida usando química de Boc, es útil la resina de Merrifield o resina de PAM. Los aminoácidos se acoplan a la cadena en crecimiento en fase sólida por adiciones sucesivas de aminoácidos protegidos con Boc activados por agente de acoplamiento. Son ejemplos de agentes de acoplamiento: DCC, DIC, HATU y HBTU. Los disolventes de reacción pueden ser DMF, DCM, MeOH o NMP. La escisión del grupo protector Boc se efectúa en TFA al 10-100% en DCM a 0-40 °C, prefiriéndose la temperatura ambiente. A la finalización del ensamblaje de la cadena peptídica, el grupo protector N-terminal (habitualmente Boc) se elimina como se ha descrito anteriormente. El péptido se elimina de la resina usando HF líquido o ácido trifluorometano sulfónico en diclorometano.

**Procedimiento general para la preparación de oligopéptido con Fmoc por síntesis en fase de solución**

[0203] Como alternativa, el intermediario peptídico de profármaco puede generarse mediante una síntesis en fase sólida, utilizando química de Boc o Fmoc. En la presentación esquemática de los métodos (FIG. 4), el tetrapéptido Leu C-terminal se usa generalmente como ejemplo, pero se entenderá que también pueden realizarse reacciones similares con otros péptidos C-terminales de cualquier longitud. El péptido puede construirse mediante el ensamblaje por etapas análogo al método en fase sólida (en la dirección N-terminal o en la dirección C-terminal) o mediante el acoplamiento de, por ejemplo, dos dipéptidos convenientemente protegidos o un tripéptido con un solo aminoácido.

[0204] Un método de síntesis en fase de solución es una construcción por etapas del intermediario peptídico de profármaco usando química de Fmoc, mostrado en la FIG. 4. El extremo C-terminal debe protegerse para reducir la formación de productos secundarios. El grupo R C-terminal en la FIG. 4 es Me, tBu, bencilo o TCE. (Obsérvese que cuando la protección N-terminal es metil succinilo, el grupo R C-terminal no puede ser metilo). Aunque se proporciona DMF como disolvente, otros disolventes tales como DMSO, CH<sub>3</sub>CN o NMP (o mezclas de los mismos) pueden sustituirlo. La piridina, Et<sub>3</sub>N u otras bases pueden sustituir a la piperidina en la desprotección del extremo amino-terminal protegido de la cadena peptídica en crecimiento. De forma similar, aunque HBTU se proporciona en el diagrama anterior como el agente activante, pueden usarse otros agentes activantes tales como DCC, DIC, DCC + HOBt, OSu, ésteres activados, azida o trifenil fosforil azida. Además, el cloruro de ácido o bromuro de ácido del péptido protegido puede usarse para acoplarse directamente con el aminoácido o fragmento peptídico. A la finalización del ensamblaje del oligopéptido, el extremo N-terminal se desprotege y el péptido protegido en su extremo C-terminal está listo para aceptar la protección N-terminal deseada.

**Procedimiento general para la preparación de oligopéptido con protección N-terminal mediante síntesis en fase de solución**

[0205] Cuando se construye el oligopéptido con protección N-terminal mediante síntesis en fase de solución, la protección N-terminal tiene que sintetizarse mediante un procedimiento ligeramente modificado (FIG. 4). En primer lugar, el extremo C-terminal del oligopéptido Fmoc tiene que protegerse con un grupo protector inestable a ácido o sensible a la hidrogenación compatible con la desprotección selectiva del extremo C-terminal sobre la protección N-terminal. Después, el grupo protector Fmoc tiene que eliminarse del oligopéptido para dejar al descubierto el extremo N-terminal. Con el extremo N-terminal desprotegido y el extremo C-terminal protegido, el oligopéptido se hace reaccionar con el hemiéster activado de la protección N-terminal deseada. La protección N-terminal puede activarse usando métodos para activar aminoácidos tales como DCC o HATU en una base y un disolvente apropiado. Como alternativa, cuando se usa el metil-hemisuccinato, el acoplamiento también puede realizarse mediante cloruro de metil hemisuccinilo (u otro haluro de ácido) (FIG. 4) usando un disolvente inerte en presencia de una base orgánica o inorgánica, tal como DIEA, trietilamina o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Un ejemplo de dicha síntesis incluye hacer reaccionar metil-hemisuccinato y éster βAla-Ile-Ala-Leu bencilico. El método de acoplamiento puede ser cualquiera de los métodos usados generalmente en la técnica (véase, por ejemplo: Bodanszky, M., The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, 185 (1984); Bodanszky, M., Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, 159 (1984). El grupo bencilico puede eliminarse después por hidrogenación catalítica, proporcionando la forma con protección N-terminal metil-succinilo deseada de un oligopéptido. Otros ejemplos de grupos protectores C-terminales adecuados que pueden eliminarse selectivamente pueden ser, pero sin limitación, tBu, alcoxi-metilo y TCE. Se describen en la bibliografía otros métodos de realización de esta etapa.

**[0206]** Puede considerarse cualquier combinación del método anterior, tal como la “condensación de fragmento” de di- o tripéptidos. Las condiciones de reacción son bien conocidas en la técnica y se detallan en las citas proporcionadas. La ventaja de los métodos descritos anteriormente es la fácil purificación del producto producido por síntesis en fase de solución.

### Conjugado de profármaco

#### Métodos generales para las etapas de conjugación y desprotección

10

**[0207]** La forma con protección N-terminal del oligopéptido-agente terapéutico descrito en esta invención puede sintetizarse por acoplamiento de una forma con Fmoc (que significa que está unido Fmoc al extremo N-terminal del oligopéptido) del oligopéptido con daunorrubicina, doxorubicina o cualquier agente terapéutico apropiado usando cualquiera de los reactivos activantes convencionales usados en la síntesis de péptidos (**FIG. 5**). El disolvente puede ser tolueno, acetato de etilo, DMF, DMSO, CH<sub>3</sub> CN, NMP, THF, DCM o cualquier otro disolvente inerte adecuado como se conoce en la técnica, y los reactivos son solubles en el mismo. Los disolventes preferidos son DMF y NMP. El intervalo de temperatura apropiado es de -25 a +25 °C, prefiriéndose la temperatura ambiente. El agente activante puede seleccionarse de uno de los siguientes: PyBOP, HBTU, HATU, EDC, DIC, DCC, DCC + HOBT, ésteres activados con OSu, azida o trifenilfosforilazida. HBTU o HATU es el agente activante preferido. Como alternativa, el cloruro de ácido o el bromuro de ácido del péptido protegido también puede usarse para esta reacción de acoplamiento. Son necesarios 2-4 equivalentes, ventajosamente 2-2,5 equivalentes de una base para la reacción de acoplamiento. La base puede seleccionarse de bases inorgánicas tales como CsCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o bases orgánicas, tales como TEA, DIEA, DBU, DBN, DBO, piridina, piridinas sustituidas, N-metil-morfolina, etc., preferentemente TEA o DIEA. La reacción puede llevarse a cabo a temperaturas de entre -15 °C y 50 °C, ventajosamente entre -10 °C y 10 °C. El tiempo de reacción es de entre 5-90 minutos y es ventajosamente de 20-40 minutos. El producto se aísla vertiendo la mezcla de reacción en agua y filtrando el precipitado formado. El producto bruto puede purificarse adicionalmente por recristalización a partir de DCM, THF, acetato de etilo o acetonitrilo, preferentemente a partir de diclorometano o acetonitrilo. La forma con Fmoc aislada del conjugado de oligopéptido-agente terapéutico se desprotege después durante 2-90 minutos, preferentemente 3-8 minutos, usando un exceso de diez a cien veces de base a una temperatura de entre -10 °C y 50 °C. Idealmente, se prefieren 5-60 equivalentes de la base. La piperidina es la base preferida para desproteger grupos Fmoc. El extremo amino-terminal desprotegido del conjugado de oligopéptido-agente terapéutico se acila mediante un anhídrido de diácido o un diácido activado hemi protegido (es decir, un monoéster que posteriormente se desprotege) para dar la forma con protección N-terminal final del oligopéptido-agente terapéutico.

35

**[0208]** Como alternativa, el profármaco final puede prepararse de forma similar a partir de la forma con protección N-terminal protegida del oligopéptido, tal como una forma de metil hemiéster de oligopéptido con protección N-terminal succinilo, y conjugarse con un agente terapéutico. Este método se ilustra en la **FIG. 6**.

**[0209]** La protección N-terminal-oligopéptido-agente terapéutico protegida se desprotege ahora por métodos compatibles con la estabilidad del agente terapéutico. Por ejemplo, las dicarboxil-peptidil-antraciclinas pueden protegerse con un grupo metilo y desprotegerse con una esterasa. Para otros agentes terapéuticos, pueden seleccionarse grupos protectores bencilo e hidrogenación catalítica para desprotegerlos.

**[0210]** La forma de sal de protección N-terminal-oligopéptido-agente terapéutico cargado negativamente se lleva a cabo con un disolvente seleccionado del grupo siguiente: alcohol (incluyendo metanol, etanol o isopropanol), agua, acetonitrilo, tetrahidrofurano, diglime u otros disolventes polares. La fuente de sodio es un equivalente molar de NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOAc, NaOCH<sub>3</sub> (en general alcóxido de sodio) o NaH. También es útil una columna de intercambio iónico cargada con Na<sup>+</sup> (tal como intercambiadores iónicos fuertes o débiles) para esta última etapa de preparación de la forma de sal de protección N-terminal-oligopéptido-agente terapéutico cuando sea apropiado. Se describe sodio como ejemplo solamente.

**[0211]** Generalmente, el profármaco puede convertirse en una forma de sal farmacéuticamente aceptable para mejorar la solubilidad del profármaco. La protección N-terminal-oligopéptido-agente terapéutico se neutraliza con una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH tris(hidroximetil)aminometano, KHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N, acetiltriethylamonio. La forma de sal preferida de profármaco es sodio y la sal neutralizante preferida es NaHCO<sub>3</sub>.

**[0212]** Está bien documentado que las moléculas de tipo antraciclina, incluyendo doxorubicina y daunorrubicina, forman geles en disolventes orgánicos a concentraciones muy reducidas (Matzanke, B. F., et al., Eur. J. Biochem., 207: 747-55 (1992); Chaires, J. B., et al., Biochemistry, 21: 3927-32 (1982); Hayakawa, E., et al., Chem. Pharm. Bull., 39: 1282-6 (1991)). Esto puede ser un obstáculo considerable para obtener altos rendimientos de producto limpio cuando se preparan conjugados de péptido-antraciclina. La formación de gel contribuye a la formación de reacciones secundarias indeseables. Una forma de minimizar este problema es usar soluciones muy diluidas (1-2%) para la

reacción de acoplamiento, sin embargo, esto no es práctico en el entorno de un procedimiento (grandes cantidades de desechos, aislamiento complicado). Para superar este problema puede usarse urea u otros agentes caotrópicos para romper las fuerzas de formación de enlaces de hidrógeno e hidrófobas fuertes que forman el gel. Por lo tanto, si la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente que contiene urea, ventajosamente de un 20% a una solución saturada de urea en DMF o NMP, las reacciones secundarias pueden mantenerse por debajo del 2% incluso si la concentración de reactivos supera el 10%. Esto hace que la etapa de conjugación sea práctica a altas concentraciones y produzca buenos rendimientos.

#### Método enzimático general

10

**[0213]** La hidrólisis de protección N-terminal-oligopéptido-agentes terapéuticos protegidos en el compuesto con protección N-terminal completo catalizada por ácidos o bases conduce a mezclas de reacción complejas debido a la inestabilidad de muchos agentes terapéuticos incluso en condiciones moderadamente ácidas o básicas. Las enzimas pueden promover la hidrólisis sin destruir el sustrato o el producto. Las enzimas adecuadas para esta reacción pueden ser esterasas o lipasas y pueden estar en su forma natural, hidrosoluble o inmovilizadas por acoplamiento cruzado o unión a materiales de soporte sólido disponibles en el mercado. De las enzimas solubles evaluadas, es especialmente útil la lipasa de *Candida antarctica* "B" (Altus Biologics). Un ejemplo de una enzima inmovilizada por acoplamiento cruzado es ChiroCLEC-PC™ (Altus Biologics). La lipasa de *Candida antarctica* "B" (Altus Biologics) puede inmovilizarse por reacción con Sepharose™ 4 Fast Flow activada con NHS (American Pharmacia Biotech). El pH de la mezcla de reacción durante la hidrólisis se controla cuidadosamente y se mantiene mediante un pH-stato entre 5,5 y 7,5, ventajosamente entre 5,7 y 6,5, mediante la adición controlada de solución de NaHCO<sub>3</sub>. Cuando la reacción se completa el producto se aísla por liofilización de la mezcla de reacción filtrada. Las enzimas inmovilizadas permanecen en la torta de filtro y pueden reutilizarse si se desea.

#### 25 Método general de éster alílico o alquílico

**[0214]** El profármaco también puede prepararse por acoplamiento de una forma alil-hemiestér o alquil-hemiestér del oligopéptido con protección N-terminal con un agente terapéutico, y liberación después del ácido libre del conjugado. La **FIG. 8** ilustra este procedimiento con succinil-βAla-Ile-Ala-Leu y doxorubicina.

30

**[0215]** El acoplamiento de alil-succinil-βAla-Ile-Ala-Leu con doxorubicina puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos de conjugación con oligopéptidos.

**[0216]** El alil-succinil-βAla-Ile-Ala-Leu-doxorubicina también puede sintetizarse por reacción de alil hemisuccinato, que se preparó mediante métodos conocidos (Casimir, J. R., et al., Tet. Lett. 36/19 3409 (1995)), con βAla-Ile-Ala-Leu-doxorubicina de forma similar al acoplamiento de los precursores tetrapeptídicos protegidos con doxorubicina que se describió en los métodos anteriores, mostrado en la **FIG. 5**. Son disolventes inertes adecuados THF, diclorometano, acetato de etilo, tolueno, preferentemente THF, a partir del cual precipita la forma de ácido del producto a medida que se desarrolla la reacción. El ácido aislado se convierte en su sal de sodio como se ha descrito anteriormente. Los tiempos de reacción varían entre 10-180 minutos, ventajosamente 10-60 minutos, a temperaturas entre 0-60 °C, preferentemente 15-30 °C.

**[0217]** La eliminación del grupo alilo o alquilo puede realizarse con Pd(0) o Ni(0), ventajosamente transferencia promovida por Pd(0) del grupo alilo o alquilo a moléculasceptoras, como se conoce bien en la técnica y está documentado en la bibliografía científica (Genet, J-P, et al., Tet. Lett., 50, 497, 1994; Bricout, H., et al. Tet. Lett., 54: 1073 (1998), Genet, J-P. et al. Synlett, 680 (1993); Waldmann, H., et al., Bioorg. Med. Chem., 7: 749 (1998); Shaphiro, G., Buechler, D., Tet. Lett., 35: 5421 (1994)). La cantidad de catalizador puede ser del 0,5-25% mol respecto al sustrato.

#### 50 Método general de tritilo o tritilo sustituido

**[0218]** El profármaco también puede sintetizarse mediante el método mostrado en la **FIG. 7**. Esta estrategia utiliza un R'-oligopéptido en el que R' es tritilo o tritilo sustituido. El acoplamiento de R'-oligopéptido con un agente terapéutico puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la conjugación de un oligopéptido protegido con un agente terapéutico en 30-120 minutos a 0-20 °C.

55

**[0219]** La eliminación del grupo tritilo o tritilo sustituido puede conseguirse en condiciones ácidas para dar el profármaco cargado positivamente. Este profármaco cargado positivamente está protegido N-terminalmente como se ilustra en la **FIG. 4** y se ha descrito anteriormente. La desprotección de tritilo puede efectuarse con ácido acético, ácido fórmico y ácido clorhídrico diluido.

60

**[0220]** El profármaco puede convertirse en (succinil o glutaril)-oligopéptido-agente terapéutico por reacción con anhídrido succínico o anhídrido glutárico, después convertirse adicionalmente en cualquier sal farmacéuticamente

aceptable. El disolvente para la etapa de acoplamiento puede ser DMF, DMSO, CH<sub>3</sub>CN, NMP o cualquier otro disolvente adecuado conocido en la técnica.

#### Método general de conjugación en fase sólida de dirección inversa

5

**[0221]** El compuesto de profármaco de la presente invención puede sintetizarse usando química en fase sólida mediante métodos de dirección inversa (del extremo N-terminal al extremo C-terminal) "por etapas".

**[0222]** Una forma es usar resinas para inmovilizar un succinil hemiéster, por ejemplo, éster succinil-mono-bencílico o éster succinil-mono-alílico. Son ejemplos de resinas que podrían seleccionarse las "resinas de Wang" (Wang, S. S., J. Am. Chem. Soc., 95: 1328 (1973); Zhang, C., Mjaili, A. M. M., Tet. Lett., 37: 5457(1996)), "resinas de Rink" (Rink., H., Tet. Lett., 28: 3787 (1987)), "resinas de tritilo o tritilo sustituido" (Chen, C., et al., J. Am. Chem. Soc., 116: 2661 (1994); Bartos, K. et al., Peptides, Proc. 22nd European Peptide Symposium (1992); Schneider, C. H.; Eberle, A. N. (Eds.), ESCOM, Leiden, pág. 281 (1993). El éster inmovilizado se desprotege después y se hace reaccionar con, por ejemplo, una βalanina protegida C-terminalmente de forma similar. Estas etapas se repiten después con isoleucina, alanina y, finalmente, ésteres de leucina, seguidas del acoplamiento de doxorubicina al succinil-tetrapéptido inmovilizado. Después, la molécula se libera de la resina usando condiciones ligeramente ácidas para formar un profármaco libre, tal como Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox. Esta metodología está representada por el esquema de la **FIG. 9**. Otra versión de la síntesis de fase utiliza éster de succinil oligopéptido inmovilizado. Después, éste se desprotege C-terminalmente, seguido de la etapa de acoplamiento con doxorubicina u otro agente terapéutico, y finalmente se libera de la resina como se representa mediante el esquema de la **FIG. 9**. La forma de ácido de las moléculas de profármaco puede convertirse después finalmente en su sal de sodio como se ha descrito anteriormente.

#### 25 Síntesis general de compuesto a gran escala

**[0223]** El compuesto de profármaco puede sintetizarse usando un procedimiento de tres etapas simple y eficaz de la invención: (1) acoplamiento de un grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido y un agente terapéutico en presencia de un agente activante para generar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico, (2) eliminación del agente terapéutico no acoplado que queda después de la etapa de acoplamiento y (3) desprotección del conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico para generar el compuesto de profármaco de grupo estabilizante-oligopéptido-agente terapéutico.

**[0224]** La primera etapa implica el acoplamiento de un fragmento oligopeptídico protegido con éster alquílico con un agente terapéutico. Una realización preferida de la primera etapa implica el acoplamiento de un grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido, tal como MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-OH, con un agente terapéutico, tal como doxorubicina (**FIG. 27**) usando un agente activante, tal como HATU, para dar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico, por ejemplo, MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. El centro de esta etapa está en la pureza y el rendimiento del éster metílico, ya que se descubrió que la etapa de hidrólisis no afectaba a la pureza. Preferentemente, la proporción molar del grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido respecto al agente terapéutico será de entre 2:1 y 1:1. Más preferentemente, la proporción molar está entre 1,75:1 y 1,5:1. Más preferentemente, la proporción molar es de 1,66:1.

45

**[0225]** El acoplamiento del grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido y un agente terapéutico se realiza preferentemente por: (a) combinación del grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido y el agente terapéutico en DMF, (b) adición de DIEA, (c) reacción del grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido y el agente terapéutico en presencia del agente activante para formar el conjugado y (d), precipitación del conjugado por adición de una solución de salmuera para formar un precipitado. Preferentemente, la proporción molar del DIEA y el grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido está entre 3:1 y 1,5:1. Más preferentemente, la proporción molar está entre 2,5:1 y 2:1. Más preferentemente, la proporción molar es de 2,18:1. La etapa de reacción se realiza preferentemente a 0 °C, durante 30 minutos. Preferentemente, la proporción molar del agente activante y el grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido está entre 1,5:1 y 1:1. Más preferentemente, la proporción molar es de 1,1:1. La solución de salmuera está preferentemente entre el 20% (p/v) y el 40% (p/v) de NaCl en agua. Más preferentemente, la solución de salmuera está entre el 25% (p/v) y el 35% (p/v) de NaCl en agua. Más preferentemente, la solución de salmuera es del 30% (p/v) de NaCl en agua. El conjugado se precipita preferentemente en una solución de salmuera, en la que el pH está entre 5,0 y 7,0, ambos inclusive. Más preferentemente, el conjugado se precipita a un

60

**[0226]** Puesto que muchos agentes terapéuticos son sustancias tóxicas, es preferible eliminar cualquier agente terapéutico libre del producto acoplado. La etapa de eliminación se realiza preferentemente por: (a) disolución del conjugado en DMF, (b) disolución de una resina de atrapamiento en DMF anhidro, (c) adición del conjugado de

grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico formado en la etapa de acoplamiento a la resina de atrapamiento para formar una mezcla de conjugado-resina, (d) mantenimiento de la mezcla a entre 0 °C y 30 °C durante 2 a 24 horas, en las que el agente terapéutico no acoplado reacciona con la resina, (e) eliminación de la resina de la mezcla, y (f) precipitación del resto por adición de una solución de salmuera para formar un precipitado del conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico. Preferentemente, la resina de atrapamiento es poliestireno-isocianato (PS-isocianato), PS-metilisocianato, PS-tioisocianato, PS-metil-tioisocianato, PS-cloruro de sulfonilo, PS-cloruro de metilsulfonilo o PS-benzaldehído. Más preferentemente, la resina de atrapamiento es PS-isocianato. La etapa de eliminación se realiza preferentemente para eliminar el agente terapéutico libre, que es una antraciclina.

**[0227]** La tercera etapa es desproteger el conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico, preferentemente por hidrólisis mediante una enzima, más preferentemente mediante hidrólisis por una esterasa, que directamente proporciona el compuesto de profármaco a un buen rendimiento con una pureza final de al menos el 90%. Por ejemplo, la tercera etapa puede ser la hidrólisis del grupo éster metílico en MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox mediante una enzima, tal como CLEC CAB (lipasa de *Candida antartica* B entrecruzada), que proporciona directamente la sal de sodio de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox en rendimientos cuantitativos con alta pureza.

**[0228]** La enzima está preferentemente entrecruzada o inmovilizada sobre un soporte sólido. La esterasa puede ser la esterasa de hígado de cerdo, lipasa de *Candida antartica* B, lipasa de *Candida rugosa*, lipasa de *Pseudomonas cepacia*, esterasa de hígado de cerdo inmovilizada en sepharose, lipasa de *Candida antartica* B inmovilizada en sepharose, CLEC-PC™ (lipasa de *Pseudomonas cepacia*), CLEC-CAB (lipasa de *Candida antartica* B) o CLEC-CR (lipasa de *Candida rugosa*). La desprotección mediante hidrólisis por una enzima se realiza preferentemente por: (a) lavado de la enzima para eliminar la enzima libre, (b) adición de la enzima lavada al conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico o alílico-oligopéptido-agente terapéutico, (c) reacción de la enzima con el conjugado a entre 15 °C y 40 °C, ambos inclusive, a un pH de entre 5,0 y 8,0, ambos inclusive, durante al menos 18 horas, para crear el compuesto de profármaco de grupo estabilizante-oligopéptido-agente terapéutico, y (d) separación de la enzima del compuesto de profármaco. Más preferentemente se añade enzima entrecruzada o inmovilizada lavada adicional después de la etapa de reacción de la enzima con el conjugado, antes de separar la enzima del compuesto de profármaco.

#### Eliminación de agente terapéutico libre

**[0229]** Puede haber presente agente terapéutico no conjugado tarde en el procedimiento de generación del profármaco. Por ejemplo, durante la etapa de acoplamiento del conjugado de (grupo estabilizante)-(oligopéptido) con doxorubicina como agente terapéutico se descubrió, en algunos casos, que la reacción no se desarrollaba completamente. Quedaba aproximadamente el 2-4% de doxorubicina residual en el producto acoplado. Los intentos iniciales para eliminar completamente la doxorubicina del producto mediante lavados ácidos no dio como resultado una eliminación completa. La eliminación completa del agente terapéutico libre se efectuó mediante el procedimiento resumido en el Ejemplo 47 y la **FIG. 11**, que utiliza resina o perlas de atrapamiento.

**[0230]** El producto bruto, que contiene el intermediario y doxorubicina residual, se disolvió en DMF y se añadieron perlas o resina de metilisocianato de poliestireno o poliestireno-cloruro de sulfonilo. La reacción se agitó durante 60 minutos. El grupo amino libre de la doxorubicina reacciona con el grupo isocianato o cloruro de sulfonilo en las perlas para formar un derivado de urea o sulfonamida. Las perlas sólidas con doxorubicina unida a las mismas se separaron después del producto deseado por filtración. El producto deseado permanece en la solución de DMF. Esta estrategia parece ser un método muy suave y eficaz para eliminar agente terapéutico residual del producto.

**[0231]** Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método de generación de un compuesto como se usa en el método de la reivindicación 1, que comprende:

(1) seleccionar un oligopéptido protegido con Fmoc de fórmula Fmoc-(AA)<sub>n</sub>-AA<sup>P2</sup>-AA<sup>P1</sup>-AA<sup>P1</sup>-(AA)<sub>m</sub>, en la que:

n y m son números enteros,

AA<sup>P2</sup> representa cualquier aminoácido,

AA<sup>P1</sup> representa cualquier aminoácido,

AA<sup>P1</sup> representa cualquier aminoácido, y  
cada AA representa independientemente un aminoácido,

(2) acoplar el oligopéptido protegido con Fmoc a un agente terapéutico por activación del oligopéptido protegido con Fmoc con un agente activante en presencia del agente terapéutico para formar un conjugado de oligopéptido

protegido con Fmoc-agente terapéutico,

(3) desproteger el conjugado de oligopéptido protegido con Fmoc-agente terapéutico por contacto del mismo con una base para formar un conjugado de oligopéptido-agente terapéutico, y

(4) acoplar el conjugado de oligopéptido-agente terapéutico a un grupo estabilizante como se define en la reivindicación 1, para formar el compuesto.

Preferentemente, n es de 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

**[0232]** Como alternativa, un método de generación de un compuesto como se usa en el método de la reivindicación 1, comprende las etapas siguientes:

(1) seleccionar un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

cada AA representa independientemente un aminoácido

(2) acoplar el oligopéptido a un grupo estabilizante protegido con éster alquílico mencionado en la reivindicación 1, para formar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico-oligopéptido,

(3) acoplar el conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico-oligopéptido a un agente terapéutico por activación del conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico-oligopéptido con un agente activante en presencia de un agente terapéutico para formar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico-oligopéptido-agente terapéutico, y

(4) desproteger el conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alquílico-oligopéptido-agente terapéutico para formar el compuesto.

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

**[0233]** Un compuesto descrito en la presente memoria y usado en el método de la reivindicación 1 también puede generarse mediante las etapas siguientes:

(1) seleccionar un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

cada AA representa independientemente un aminoácido

(2) acoplar el oligopéptido a un grupo estabilizante protegido con éster alílico mencionado en la reivindicación 1, para formar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alílico-oligopéptido,

(3) acoplar el conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alílico-oligopéptido a un agente terapéutico por activación del conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alílico-oligopéptido con un agente activante en presencia de un agente terapéutico, para formar un conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alílico-oligopéptido-agente terapéutico, y

(4) desproteger el conjugado de grupo estabilizante protegido con éster alílico-oligopéptido-agente terapéutico para formar el compuesto.

Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

**[0234]** Otro método más para generar un compuesto descrito en la presente memoria y usado en el método de la reivindicación 1 comprende las etapas siguientes:

(1) seleccionar un oligopéptido protegido con tritilo de la fórmula tritil- $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

n y m son números enteros,

AA<sup>P2</sup> representa cualquier aminoácido,  
 AA<sup>P1</sup> representa cualquier aminoácido,  
 AA<sup>P1'</sup> representa cualquier aminoácido, y  
 cada AA representa independientemente un aminoácido,

5 (2) acoplar el oligopéptido protegido con tritilo a un agente terapéutico por activación del oligopéptido protegido con tritilo con un agente activante en presencia de un agente terapéutico, generando de este modo un conjugado de oligopéptido protegido con tritilo-agente terapéutico,

10 (3) desproteger el conjugado de oligopéptido protegido con tritilo-agente terapéutico en condiciones ácidas para formar un conjugado de oligopéptido-agente terapéutico, y

(4) acoplar el conjugado de oligopéptido-agente terapéutico con un grupo estabilizante como se define en la reivindicación 1 para formar el compuesto.

15 Preferentemente, n es 0 a 3, m es 0 a 3 y m + n no es más de 3.

[0235] Otra etapa posible en relación con cualquiera de estos métodos es eliminar el agente terapéutico no acoplado mediante el uso de perlas o resina de atrapamiento. Además, el compuesto puede neutralizarse con una sal farmacéuticamente aceptable si se desea.

### Compuestos específicos

[0236] El compuesto descrito en la presente memoria incluye los ejemplos específicos siguientes:

25 [0237] Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Met-Ala-Leu-Dox y Suc-Phe-Ala-Leu-Dox.

[0238] Son ejemplos de compuestos escindibles por CD10 pero resistentes a la escisión por TOP los siguientes:  
 30 Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1:

#### 35 Actividad específica de proteína de homogeneizados celulares

[0239] Diversos sedimentos de células humanas cultivadas se homogeneizaron en un tampón HEPES 100 mM pH 7,2 y el homogeneizado se incubó durante hasta 1 h a 37 °C con 12,5 μg/ml de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox, Suc-βAla-Leu-Tyr-Leu-Dox. Además, se incluyó fosforamidón 1 μM, un inhibidor de CD10 en las incubaciones con homogeneizado de células LNCaP. Para estimar la actividad específica se estimó el contenido de proteína en la porción soluble de los homogeneizados. Los resultados expresados como actividad específica de proteína (FIG. 12) indican que las células LNCaP que se sabe que contienen CD10 muestran la mayor actividad hidrolizante de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox. Esta actividad se inhibe por fosforamidón. Las células PC-3 que no expresan CD10 hidrolizan los otros tres sustratos, pero no Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

[0240] Se extirparon quirúrgicamente xenoinjertos de tumores de ratón de diversas fuentes, se homogeneizaron en un tampón HEPES 100 mM pH 7,2 y se incubaron durante hasta 1 h a 37 °C con Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox 12,5 μg/ml. Se midió la proteína y los resultados se describen como actividad específica de proteína. Los resultados, ilustrados en la FIG 13, indican que las células LNCaP contienen la mayor actividad hidrolizante de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, mientras que las células HL-60 no muestran actividad hidrolizante de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

#### Ejemplo 2:

#### 55 Hidrólisis por CD10 purificada

[0241] Se incubaron cantidades iguales de CD10 de riñón porcino purificada (Elastin Products Company) con 12,5 μg/ml de diversos compuestos de peptidil-doxorrubicina durante hasta 10 h a 37 °C en TrisHCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,1%. Los productos de reacción se analizaron mediante HPLC con detección de fluorescencia. Las velocidades eran esencialmente lineales durante el periodo de incubación. El producto observado era Leu-doxorrubicina. La Tabla 1 proporciona el porcentaje de cada compuesto de ensayo que se hidrolizó a lo largo del periodo de diez horas. Además, estos resultados se expresan respecto a un compuesto ensayo patrón,

Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox.

**TABLA 1. Hidrólisis por CD10**

Sustrato	% hidrólisis/10 h	Fracción hidrolizada respecto a patrón
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	10,9	1,0
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	12,5	1,1
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	22,1	2,0
Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox	0	0
Suc-βAla-Leu-Tyr-Leu-Dox	0	0
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	8,3	0,75
Suc-Met-Ala-Leu-Dox	37,7	3,5
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	0	0

### 5 Ejemplo 3:

#### El efecto del agente unido al péptido sobre la escisión por CD10

[0242] Para ensayar el efecto de velocidad catalizado por CD10 de la estructura en la posición de “toxina” del profármaco, la velocidad hidrolítica de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se comparó con la del análogo en el que par-nitroanilida (pNA) sustituye a la doxorubicina, es decir, Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-pNA. Se incubó CD10 de riñón porcino (Elastin Products Company) con los dos sustratos en condiciones idénticas (37 °C, pH 7,4, Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,01%) y la velocidad de liberación de Leu-Dox se comparó con la velocidad de liberación de Leu-pNA. Los resultados indicaban que el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-pNA se escinde 590 veces más rápidamente que el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. Esto indica que la estructura (o sitio de unión) de la toxina en estos compuestos de profármaco activados por tumores puede influir en la velocidad de escisión.

#### Ejemplo 4: EJEMPLO DE REFERENCIA

### 20 Exploración de profármacos potenciales

[0243] Son manifestaciones preferidas de esta invención compuestos de profármaco que no se escindan por trouasa u oligopeptidasa Thimet, pero que se escindan por CD10. Por lo tanto, se prefiere la exploración de compuestos para determinar la ausencia de capacidad de escisión por trouasa. Se usaron tres preparaciones diferentes de trouasa de células de carcinoma para explorar diversos compuestos de ensayo. Estas tres preparaciones eran las siguientes:

- (a) homogeneizado de células MCF 7/6 (carcinoma de mama)
- (b) medios acondicionados de MCF 7/6 (carcinoma de mama), y
- (c) combinación de fracciones de intercambio aniónico de extracto de células HeLa (carcinoma cervical).

#### a. Preparación de homogeneizado de células MCF 7/6

[0244] Se cultivaron células MCF 7/6 hasta la confluencia en un medio sin suero que contenía DMEM:F12 (1:1), albúmina de suero bovino 50 mg/l, ITS-X (insulina 10 mg/l, transferrina 5,5 mg/l, selenito sódico 6,7 mg/l, etanolamina 2 mg/l) y concentrado lipídico (*Gibco* n° 21900-030). Se recogieron 100 ml de células por centrifugación a 4 °C 10.000 x g durante 20 min y decantación del sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (*Gibco*) y se centrifugó a 18.000 x g durante 10 minutos. Después de la decantación del sobrenadante, las células (aproximadamente 300 µl en húmedo) se homogeneizaron por trituración en 1,7 ml de tampón HEPES 10 mM, pH 7,2 (sal de sodio). El homogeneizado se centrifugó a 18.000 x g a 4 °C durante 5 min y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a ≤-20 °C para su uso posterior en la exploración de compuesto.

#### b. Preparación de medios acondicionados de MCF 7/6

[0245] Se cultivaron células MCF 7/6 hasta la confluencia en medio DMEM/F12 (1:1) que contenía suero bovino fetal al 10 %, L-glutamina al 0,05% (p/v), penicilina 250 UI/ml y estreptomina 100 µg/ml. Después, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron 24 h a CO<sub>2</sub> al 5%, 37 °C, en

DMEM/F12 (1:1), BSA al 0,02%, ITS-X (insulina 10 mg/l, transferrina 5,5 mg/l, selenito sódico 6,7 µg/l, etanolamina 2 mg/l). Después, los medios acondicionados se decantaron y, usando un aparato de agitación celular con una membrana de ultrafiltración YM 10 (límite de 10.000 PM) (*Millipore*), se intercambiaron una vez con tampón HEPES 10 mM, pH 7,2 y se concentraron veinte veces. Esta solución se almacenó en alícuotas a -20 °C para su uso en la exploración de compuesto.

### c. Preparación de combinación de fracciones de intercambio aniónico de células HeLa

[0246] Treinta mil millones de células HeLa producidas comercialmente (carcinoma cervical humano, *Computer Cell Culture Center*, Seneffe, Bélgica) se homogeneizaron con un sonicador y con un homogeneizador Dounce en 108 ml de solución acuosa de lisis. La solución de lisis contenía Triton X-100 al 0,02% p/v, azida sódica al 0,04% p/v y un cóctel de inhibidores de proteasas (2 comprimidos/50 ml Complete™, comprimidos sin EDTA, *Roche Molecular Biochemicals*). El homogeneizado celular se centrifugó 30 minutos a 4 °C a 5000 x g y el sedimento se homogeneizó en una segunda solución de lisis de 108 ml usando un homogeneizador Dounce y se centrifugó como anteriormente.

15 Los sobrenadantes se combinaron y se centrifugaron durante 90 min a 145.000 x g a 4 °C.

[0247] Se diluyó una porción del sobrenadante de ultracentrifugación 2 veces con un tampón de trietanolamina-HCl 20 mM, pH 7,2 que contenía Triton X-100 al 0,01% (p/v) y azida sódica al 0,02% (p/v) (tampón de equilibrado). Se cargaron treinta ml de la solución resultante, que corresponden a aproximadamente 180 mg de proteína, a 4 °C en una columna de cromatografía de intercambio aniónico a baja presión de 2,6 x 9,4 cm Source™ 15Q (*Amersham Pharmacia Biotech*) (1 ml/minuto). Después, la columna se lavó con 250 ml del tampón de equilibrado a un caudal de 1 ml/minuto. Las proteínas se eluyeron en un gradiente de concentración lineal de NaCl (0-0,5 M en el tampón de equilibrado, el volumen total del gradiente era de 1000 ml) a un caudal de 3 ml/minuto. Se recogieron fracciones de dos minutos y se usaron para la determinación de la actividad enzimática usando βAla-Leu-Ala-Leu-Dox como sustrato. Su transformación en Ala-Leu-Dox se cuantificó por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa utilizando detección de fluorescencia del resto de antraciclina. Las fracciones que contenían los mayores niveles de actividad se combinaron (fracciones nº 43-46; NaCl ~0,13 M), se complementaron con inhibidores de proteasas (Complete™, comprimidos sin EDTA, *Roche Molecular Biochemicals*), y se almacenaron como alícuotas a -80 °C.

### d. Ensayo de escisión

[0248] Se incubaron compuestos de ensayo durante 2 h a 37 °C a una concentración de 12,5 µg/ml con cada una de las tres preparaciones diferentes de enzima de células de carcinoma. Después de la incubación, se añadieron tres volúmenes de acetonitrilo para detener la reacción y eliminar la proteína de la mezcla. La muestra se centrifugó a 18.000 g durante 5 minutos y se mezclaron 100 µl de sobrenadante con 300 µl de agua antes del análisis por HPLC. Para el análisis de HPLC, se inyectaron 50 µl de muestra en una columna de cromatografía de 4,6 x 50 mm 2µm TSK Super-ODS a 40 °C y se eluyó con un gradiente lineal de 3 minutos de acetonitrilo del 26% al 68% en tampón acetato de amonio acuoso 20 mM pH 4,5 a 2 ml/min. La detección fue por fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 235 nm y una longitud de onda de emisión de 560 nm.

[0249] Los compuestos de ensayo que no se escindieron (escisión <5% - 2 h) por las preparaciones de enzima en las condiciones dadas se muestra en la **Tabla 2** a continuación. Con escasas excepciones, los resultados para la escisión por enzimas de células de carcinoma era idéntica para una fracción parcialmente purificada de células HeLa, homogeneizado de células MCF 7/6 y medios acondicionados de MCF 7/6.

Tabla 2

Nº:	Grupo estabilizante	(AA)	(AA)	(AA)	(AA)	Compuesto terapéutico
1	Suc	βAla	Ile	Ala	Phe	Dnr
2	Suc	βAla	Ile	Ala	Ile	Dnr
3	Suc	Tic	Ile	Ala	Leu	Dnr
4	Suc	Thi	Ile	Ala	Leu	Dnr
5	Suc	Nal	Ile	Ala	Leu	Dnr
6	Suc	βAla	Ile	Ala	Leu	Dnr
7	Suc	Amb	Ile	Ala	Leu	Dnr

Nº:	Grupo estabilizante	(AA)	(AA)	(AA)	(AA)	Compuesto terapéutico
8	Suc	Aib	Ile	Ala	Leu	Dnr
9	Suc	βAla	Ile	Ala	Leu	Dox
10	Suc	Thi	Ile	Aib	Leu	Dnr
11	Suc	Nal	Ile	Aib	Leu	Dnr
12	Suc	PAla	Ile	Aib	Leu	Dnr
13	Suc	Amb	Ile	Aib	Leu	Dox
14	Suc	Aib	Ile	Aib	Leu	Dnr
15	Suc	βAla	Ile	Gly	Phe	Dnr
16	Suc	βAla	Ile	Gly	Ile	Dnr
17	Suc	Tic	Ile	Gly	Leu	Dnr
18	Suc	Thi	Ile	Gly	Leu	Dnr
19	Suc	Nal	Ile	Gly	Leu	Dnr
20	Suc	βAla	Ile	Gly	Leu	Dnr
21	Suc	Amb	Ile	Gly	Leu	Dnr
22	Suc	Aib	Ile	Gly	Leu	Dnr
23	Suc	βAla	Ile	Thr	Ile	Dnr
24	Suc	βAla	Ile	Tyr	Ile	Dnr
25	Suc	βAla	Ile	Tyr	Leu	Dnr
26	Suc	βAla	Ile	Tyr	Gly	Dox
27	Suc	∅	Ile	Ala	Leu	Dox
28	Suc	∅	Ile	N(Me)Ala	Leu	Dox
∅ = no presente						

**Ejemplo 5:****Expresión de CD10 en líneas celulares**

5

**[0250]** CD10 (CD10) se expresa ampliamente en varios tipos tumorales (Chu y Arber, Am. J. Clin. Pathol. 113: 374-382 (2000)), incluyendo una alta proporción (61%) de tumores de próstata. También se ha demostrado que CD10 se expresa en algunas líneas celulares derivadas de tumor de próstata humano cultivadas *in vitro*. Por lo tanto, era de interés determinar si los profármacos peptídicos de la invención eran citotóxicos para líneas tumorales derivadas de próstata, así como de otros tipos tumorales, que expresan CD10 en su superficie. La línea tumoral de próstata LNCaP expresa altos niveles de CD10 (Krongrad, et al., Urol. Res. 25: 113-116 (1997); Liu, Cancer Res. 60: 3429-3434 (2000)). Varias líneas tumorales de próstata en cultivo también expresan otra endoproteasa asociada a superficie celular bien caracterizada, antígeno prostático específico (PSA). Las líneas celulares de próstata descritas en la **Tabla 3** se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se exploraron para determinar la expresión de CD10 por citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal específico de CD10 (**Caltag Clon 5-1 B4**).

**TABLA 3**

Línea celular	Nº ATCC	PSA	CD10
LNCaP	CRL-1T40	+	+
PC-3	CRL-14S5	-	-

Línea celular	N° ATCC	PSA	CD10
22Rv1	CRL-2505	+	-

**[0251]** Se realizó un análisis citométrico de flujo con un panel de líneas celulares para determinar la expresión de CD10. La **FIG. 14** muestra que también se expresa CD10 a altos niveles en algunas líneas de linfoma de células B que no expresan PSA. Dichas líneas de células B incluyen células Ramos y Namalwa. También se demostró que las células de carcinoma de próstata LNCaP expresaban altos niveles de CD10, mientras que las células HT29, PC-3 y BALL-1 no expresaban niveles detectables de este antígeno y sirvieron como control negativo para los estudios posteriores. Se encontró una escasa expresión de CD10 en carcinoma de colon LS174T y carcinoma de mama MCF-7.

#### 10 Ejemplo 6:

##### Actividad de profármaco activado por tumor en células LNCaP, HT-29 y PC-3

**[0252]** Se cultivaron células adherentes, LNCaP (carcinoma de próstata), HT-29 (carcinoma de colon) y PC-3 (carcinoma de próstata) en medios DMEM que contenían suero fetal de ternera (FCS) inactivado térmicamente al 10%. El día del estudio las células se desprendieron de la placa con una solución de tripsina. Las células recogidas se lavaron y se resuspendieron a una concentración de  $0,25 \times 10^6$  células/ml en DMEM que contenía FCS al 10%. Se añadieron 100  $\mu$ l de suspensión celular a placas de 96 pocillos y las placas se incubaron durante 3 horas para permitir que las células se adhiriesen. Después de esta incubación, se realizaron diluciones seriadas (incrementos de 3 veces) de doxorubicina o compuestos de ensayo y se añadieron 100  $\mu$ l de compuestos por pocillo. Las placas se incubaron después durante 24 horas, se estimularon con 10  $\mu$ l de una  $^3$ H-timidina 100  $\mu$ Ci/ml y se incubaron durante 24 horas adicionales (tiempo de incubación total de 48 horas). Las placas se recogieron usando un recolector de 96 pocillos (Packard Instruments) y se contaron en un contador Packard Top Count. Curvas logísticas de cuatro parámetros se ajustaron a la incorporación de  $^3$ H-timidina en función de la molaridad del fármaco usando en programa informático Prism para determinar los valores de  $CI_{50}$ .

**[0253]** La  $CI_{50}$  del control positivo, Doxorubicina, era de 0,02-0,08  $\mu$ M en las líneas celulares usadas. Los compuestos que mostraban el mayor grado de selectividad para células LNCaP eran Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-NMeAla-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox (**Tabla 4**). Las características comunes de estos tres profármacos son que contienen una isoleucina en la posición de aminoácido 3. Compuestos tales como Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-NMeAla-Leu-Dox, que contienen una leucina en la posición de aminoácido 3, también muestran selectividad aunque el grado de selectividad es menor que el de los análogos de isoleucina.

**TABLA 4. Actividad sobre células LNCaP, HT-29 y PC-3**

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)			Proporción PC-3:LNCaP
	LNCaP	HT29	PC-3	
DOX	0,016	0,052	0,075	5
Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox	0,19	38	57	300
Suc-Ile-NMeAla-Leu-Dox	0,51	36	66	129
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	0,87	19	28	32
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	1,0	36	50	50
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	1,1	47	88	83
Suc-Leu-NMeAla-Leu-Dox	1,2	24	45	37
Suc-Ile-Pro-Leu-Dox	2,0	44	106	53
Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox	9,4	42	51	5
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Tyr-Leu-Dox	14	23	46	3
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	15	32	39	3
Suc-Leu-Tyr-Gly-Dox	15	25	64	4

**Ejemplo 7:**

**Actividad de profármaco activado por tumor sobre células Ball-1, Ramos y Namalwa**

5 **[0254]** Además de LNCaP, varias líneas de células B, tales como células Ramos y Namalwa, expresan CD10 (células CD10<sup>pos</sup>). Sin embargo, otra línea de células B, células BALL-1, no expresa CD10 y sirve como línea de células B negativa para CD10 (células CD10<sup>neg</sup>).

10 **[0255]** Se cultivaron células en suspensión, células BALL-1, Ramos y Namalwa, en medios RPMI que contenían suero fetal de ternera (FCS) inactivado térmicamente al 10%. El día del estudio, las células se recogieron, se lavaron y se resuspendieron a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/ml en RPMI que contenía FCS al 10%. Se añadieron 100  $\mu$ l de suspensión celular a placas de 96 pocillos. Se realizaron diluciones seriadas (incrementos de 3 veces) de doxorubicina o compuestos de ensayo y se añadieron 100  $\mu$ l de compuestos por pocillo. Finalmente, se añadieron 10  $\mu$ l de una <sup>3</sup>H-timidina 100  $\mu$ Ci/ml y las placas se incubaron durante 24 horas. Las placas se recogieron usando un recolector de 96 pocillos (Packard Instruments) y se contaron en un contador Packard Top Count. Curvas logísticas de cuatro parámetros se ajustaron a la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en función de la molaridad del fármaco usando el programa informático Prism para determinar los valores de CI<sub>50</sub>.

20 **[0256]** La mayor selectividad se observó con Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, que mostraba una selectividad de 120-172 veces por células Ramos y Namalwa, respectivamente, en comparación con células BALL-1 CD10<sup>neg</sup> (**Tabla 5**). El segundo análogo más selectivo era Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, con una diferencia de ~30-35 veces entre células CD10<sup>pos</sup> y CD10<sup>neg</sup>.

**TABLA 5. Actividad sobre células BALL (CD10<sup>neg</sup>)-1, Ramos (CD10<sup>pos</sup>) y Namalwa (CD10<sup>pos</sup>)**

Compuesto	CI50 ( $\mu$ M)			Proporción	
	Ball-1	Ramos	Namalwa	Ball-1:Ramos	Ball-1:Namalwa
DOX	0,02	0,01	0,01	1	2
Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox	50,00	0,42	0,29	120	172
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	78,67	2,63	2,27	30	35
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	26,00	6,43	6,47	4	4
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	17,00	6,93	5,77	2	3
Suc-Leu-Tyr-Leu-Dox	17,00	20,00	14,00	1	1
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	23,33	22,67	17,33	1	1

25

**Ejemplo 8:**

30 **[0257]** Se cultivaron células adherentes, LNCaP (carcinoma de próstata), PC-3 (carcinoma de próstata) y 22 RV 1 (carcinoma de próstata) en medio DMEM que contenía suero fetal de ternera (FCS) inactivado térmicamente al 10%. El día del estudio las células se desprendieron de la placa con una solución de tripsina. Las células recogidas se lavaron y se resuspendieron a una concentración de  $0,25 \times 10^6$  células/ml en DMEM que contenía FCS al 10%. Se añadieron 100  $\mu$ l de suspensión celular a placas de 96 pocillos y las placas se incubaron durante 3 horas para permitir que las células se adhiriesen. Después de esta incubación, se realizaron diluciones seriadas (incrementos de 3 veces) de doxorubicina o compuestos de ensayo y se añadieron 100  $\mu$ l de compuestos por pocillo. Después, 35 las placas se incubaron durante 24 horas, se estimularon con 10  $\mu$ l de una <sup>3</sup>H-timidina 100  $\mu$ Ci/ml y se incubaron durante 24 horas adicionales (tiempo de incubación total de 48 horas). Las placas se recogieron usando un recolector de 96 pocillos (Packard Instruments) y se contaron en un contador Packard Top Count. Curvas logísticas de cuatro parámetros se ajustaron a la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en función de la molaridad del fármaco usando el programa informático Prism para determinar los valores de CI<sub>50</sub>.

40

**TABLA 6**

	LNCAP CD10 <sup>+</sup> PSA <sup>+</sup>	PC-3 CD10 <sup>-</sup> PSA <sup>-</sup>	22RV1 CD10 <sup>-</sup> PSA <sup>+</sup>
CI <sub>50</sub> (mM)			
Dox	0,02	0,04	0,03
Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox	0,15	190,00	10,80

	LnCaP CD10 <sup>+</sup> PSA <sup>+</sup>	PC-3 CD10 <sup>+</sup> PSA <sup>-</sup>	22RV1 CD10 <sup>+</sup> PSA <sup>+</sup>
CI <sub>50</sub> (mM)			
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	0,17	48,00	14,00
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	28,50	57,00	34,50

[0258] La **Tabla 6** ejemplifica que las células que eran positivas para PSA y negativas para CD10 tales como 22RV1 no escindían fácilmente Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox o Suc-Ile-Ala-Leu-Dox. Los datos sugieren que CD10 es responsable de la escisión de estos compuestos y no PSA.

5

**Ejemplo 9:**

**La inhibición de CD10 disminuye la potencia de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox para células Ramos y LNCaP, pero no células Ball-1**

10

[0259] Se evaluó el efecto de dos inhibidores conocidos de CD10 sobre la actividad de profármaco en células Ramos, LNCaP y Ball-1. Se determinó la CI<sub>50</sub> de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox en presencia de una concentración creciente de los inhibidores de CD10, fosforamidón y tiorfano. El aumento de la concentración de fosforamidón dio como resultado una pérdida de potencia de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox con células Ramos y LNCaP, mientras que las células BALL-1 no se vieron afectadas (**Tabla 7**). Así mismo, la CI<sub>50</sub> de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se desplazó 7 veces en células LNCaP tratadas con 100 nM de fosforamidón (no se muestran los datos). La **FIG. 15** muestra un ejemplo de algunas curvas de valoración con Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox en ausencia o presencia de fosforamidón 300 nM.

15

20

**TABLA 7. Inhibición por fosforamidón en células Ball-1, Ramos y LNCaP**

Fosforamidón (nM)	CI <sub>50</sub> (μM)		
	CD 10 <sup>neg</sup>	CD 10 <sup>pos</sup>	CD 10 <sup>pos</sup>
	Ball-1	Ramos	LNCaP
0	22	0,51	0,24
30	20	2,1	1,3
100	21	5,3	3,3
300	24	8,1	7,7
1000	25	9,7	11,3
3000	26	10,5	15,4

[0260] El tiorfano, el segundo inhibidor de CD10, también desplaza la CI<sub>50</sub> de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox en células CD10+ (**Tabla 8**). Sin embargo, el tiorfano mostraba más actividad inhibitoria con LNCaP en comparación con células Ramos.

25

**TABLA 8. Inhibición por tiorfano en células Ramos (CD10<sup>pos</sup>) y LNCaP (CD10<sup>pos</sup>)**

DL-Tiorfano	CI <sub>50</sub> (μM)	
	CD10 <sup>pos</sup>	CD10 <sup>pos</sup>
	Ramos	LNCaP
0	0,25	0,51
30	0,27	2,1
100	0,31	5,3
300	0,28	8,1
1000	0,44	9,7

	CI50 ( $\mu$ M)	
	CD10 <sup>pos</sup>	CD10 <sup>pos</sup>
DL-Tiorfano	Ramos	LNCaP
3000	1,1	10,5

**Ejemplo 10:****Detección de CD10 asociada con una diana celular**

5

[0261] Se realizó un análisis inmunohistoquímico en muestras de tejido de LNCaP y PC3 tomadas de xenoinjertos desarrollados en ratones atímicos y después fijados en formalina. Se prepararon secciones tisulares y se inmunotifieron con un anticuerpo específico para CD10 o un control negativo del mismo isotipo, después se sometieron a contratinción con hematoxilina. Las muestras de LNCaP mostraban un patrón de tinción asociado a membrana de superficie celular intenso por el anticuerpo específico de CD10, que estaba relativamente uniformemente distribuido alrededor de la periferia de todas las células en la muestra de tejido tumoral de todas las células LNCaP. Por el contrario, no se observó inmunorreactividad en el tejido de PC3. Los compuestos escindibles por CD10 pero no por TOP, tales como Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, eran eficaces en la inhibición del crecimiento de tumores LNCaP en ratones, mientras que no eran activos frente a células PC3 (véase el Ejemplo 6). Por lo tanto, la inmunohistoquímica de CD10 es útil en la selección de tumores sensibles a profármacos escindibles por CD10.

**Ejemplo 11:****El Suc-Ile-Ala-Leu-Dox es bien tolerado en ratones sanos**

20

[0262] El Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, un profármaco tripeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un estudio de dosis máxima tolerada (MTD) de dosis única, a grupos de cinco ratones normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 28 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran 0, 23, 47, 70, 93 y 117 mg/kg, equivalentes a 0, 14, 28, 42, 56 y 70 mg de doxorubicina/kg, respectivamente. No había toxicidad aguda y el único signo de toxicidad observado era una disminución en el peso corporal medio de grupo para el grupo de mayor dosis, que era inferior al del grupo de control con vehículo durante todo el estudio. Sin embargo, no hubo mortalidades y ningún animal mostró morbilidad. La dosis máxima tolerada (MTD) de dosis única a 28 días de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox no se alcanzó en este experimento y, por lo tanto, es superior que la mayor dosis ensayada, 117 mg/kg. Esta MTD (equivalente a 66 mg de doxorubicina/kg) es al menos 16 veces superior que la de la doxorubicina en solitario, que da como resultado mortalidad después de dosis superiores a 4 mg/kg.

**Ejemplo 12:****El Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox es bien tolerado en ratones sanos**

[0263] El Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, un profármaco tetrapeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un estudio de dosis máxima tolerada (MTD) de dosis única, a grupos de cinco ratones normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 28 días y se midieron los pesos corporales dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran 0, 25, 50, 75, 100 y 125 mg/kg, equivalentes a 0, 14, 28, 42, 56 y 70 mg de doxorubicina/kg, respectivamente. No se observó toxicidad aguda después de la administración. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial) en los dos grupos de mayor dosis. El Día 14, cuatro animales en el grupo de dosis de 125 mg/kg se eutanasiaron debido a toxicidad relacionada con el tratamiento. El Día 21, dos animales en el siguiente grupo de mayor dosis, es decir, 100 mg/kg, se eutanasiaron de forma similar. No se observó morbilidad en el grupo de dosis siguiente (75 mg/kg) y el peso corporal medio de grupo aumentó durante el estudio.

[0264] Basándose en la supervivencia a Día 28, se estimó que el valor MTD de dosis única para Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox era de 75 mg/kg (equivalente a una dosis de 40 mg de doxorubicina/kg). Por lo tanto, la MTD era aproximadamente 10 veces superior que la MTD de la doxorubicina en solitario, que se estimó que era de 4 mg/kg basándose en la dosis eficaz segura convencional (4-8 mg/kg).

**Ejemplo 13:****El Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox se tolera mejor *in vivo* que la doxorubicina**

55

[0265] El Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, un profármaco tetrapeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un segundo estudio de dosis máxima tolerada de dosis única (SD-MTD), a grupos de cinco ratones ICR normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 49 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran de 0, 50, 75 ó 100 mg/kg, equivalentes a 0, 28, 42 ó 56 mg/kg de doxorubicina, respectivamente. No hubo toxicidad aguda en las 24 horas siguientes a ningún nivel de dosis. Se observaron los signos de toxicidad dependientes de la dosis y del tiempo durante el estudio. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial) en los grupos de dosis de 75 y 100 mg/kg. A Día 35 se observó mortalidad en el 40% del grupo de dosis de 75 mg/kg. Basándose en la supervivencia y en la ausencia de signos de toxicidad a Día 49, se determinó que la SD-MTD para Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox era de 50 mg/kg (equivalente a 28 mg/kg de doxorubicina). Esta dosis se toleraba muy bien y no se observaron efectos adversos. Por lo tanto, la SD-MTD era aproximadamente 1,8 veces superior en base molar que la SD-MTD para la doxorubicina en solitario (16 mg/kg). Véase la **Tabla 9**. Esta es una determinación de SD-MTD aproximada basándose en un intervalo de dosis a incrementos equivalentes a 14 mg/kg de doxorubicina a lo largo del intervalo ensayado.

Tabla 9

Nombre de compuesto	SD-MTD (mg/kg)	SD-MTD (mg/kg Dox =)	SD-MTD Proporción molar (Dox=)
Doxorrubicina	16	16	1
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	50	28	1,8

## Ejemplo 14:

20

El Suc-Leu-Ala-Leu-Dox se tolera mejor *in vivo* que la doxorubicina

[0266] El Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, un profármaco tripeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un segundo estudio de dosis máxima tolerada de dosis única (SD-MTD), a grupos de cinco ratones ICR normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc-Leu-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 49 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran 0, 47, 59, 71, 94, 117, 140 ó 164 mg/kg, equivalentes a 0, 28, 35, 42, 56, 70, 84 ó 98 mg/kg de doxorubicina, respectivamente. No hubo toxicidad aguda en las 24 horas siguientes a ningún nivel de dosis. Se observaron los signos de toxicidad dependientes de la dosis y del tiempo durante el estudio. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial) en los grupos de dosis de 94 mg/kg y superior. Basándose en la supervivencia y en la ausencia de signos de toxicidad a Día 49, se determinó que la SD-MTD para el Suc-Leu-Ala-Leu-Dox era de 71 mg/kg (equivalente a 42 mg/kg de doxorubicina). Por lo tanto, la SD-MTD era aproximadamente 2,6 veces superior en base molar que la SD-MTD para doxorubicina en solitario (16 mg/kg). Véase la **Tabla 10**. Esta es una determinación de SD-MTD aproximada basándose en un intervalo de dosis a incrementos equivalentes a 7 ó 14 mg/kg de doxorubicina a lo largo del intervalo ensayado.

TABLA 10

Nombre de compuesto	SD-MTD (mg/kg)	SD-MTD (mg/kg Dox =)	SD-MTD Proporción molar (Dox=)
Doxorrubicina	16	16	1
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	71	42	2,6

## 40 Ejemplo 15:

El Suc-Ile-Ala-Leu-Dox se tolera mejor *in vivo* que la doxorubicina

[0267] El Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, un profármaco tripeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un segundo estudio de dosis máxima tolerada de dosis única (SD-MTD), a grupos de cinco ratones ICR normales se les administraron por vía intravenosa dosis en embolada de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 49 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran 0, 94, 117, 140 ó 164 mg/kg, equivalentes a 0, 56, 70, 84 ó 98 mg/kg de doxorubicina, respectivamente. No hubo toxicidad aguda en las 24 horas siguientes a ningún nivel de dosis. Se observaron los signos de toxicidad dependientes de la dosis y del tiempo durante el estudio. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial)

en los grupos de mayor dosis. Los signos de toxicidad eran parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad a 164 mg/kg a Día 14, pérdida de peso a 140 mg/kg a Día 14 en un animal y a 117 mg/kg a Día 21 también en un animal. Basándose en la supervivencia y en la ausencia de signos de toxicidad a Día 49, se determinó que la SD-MTD para Suc-Ile-Ala-Leu-Dox era de 94 mg/kg (equivalente a 56 mg/kg de doxorubicina), que es 3,5 veces superior en base molar que la SD-MTD para la doxorubicina en solitario (16 mg/kg). Véase la Tabla 11. Esta es una determinación de SD-MTD aproximada basándose en un intervalo de dosis a incrementos equivalentes a 14 mg/kg de doxorubicina a lo largo del intervalo ensayado.

TABLA 11

Nombre de compuesto	SD-MTD (mg/kg)	SD-MTD (mg/kg Dox =)	SD-MTD Proporción molar (Dox=)
Doxorrubicina	16	16	1
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	94	58	3,5

10

**Ejemplo 16:****El Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox se tolera mejor *in vivo* que la doxorubicina**

15 **[0268]** El Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, un profármaco tetrapeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un segundo estudio de dosis máxima tolerada de dosis única (SD-MTD), a grupos de cinco ratones ICR normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 49 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran 0, 50, 75 ó 100 mg/kg, equivalentes a 0, 28, 42 ó 56 mg/kg de doxorubicina, respectivamente.

20 No hubo toxicidad aguda en las 24 horas siguientes a ningún nivel de dosis. Se observaron los signos de toxicidad dependientes de la dosis y del tiempo durante el estudio. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial) en el grupo de mayor dosis. A Día 21, tres animales en la dosis de 100 mg/kg se eutanasiaron debido a pérdida de peso o parálisis. No se observó morbilidad o mortalidad en el grupo de dosis de 75 mg/kg. Basándose en la supervivencia y en la

25 ausencia de signos de toxicidad a Día 49, se determinó que la SD-MTD para Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox era de 75 mg/kg (equivalentes a 42 mg/kg de doxorubicina), que es 2,6 veces superior en base molar que la SD-MTD para doxorubicina en solitario (16 mg/kg). Véase la Tabla 12. Esta es una determinación de SD-MTD aproximada basándose en un intervalo de dosis a incrementos equivalentes a 14 mg/kg de doxorubicina a lo largo del intervalo ensayado.

30

TABLA 12

Nombre de compuesto	SD-MTD (mg/kg)	SD-MTD (mg/kg Dox =)	SD-MTD Proporción molar (Dox=)
Doxorrubicina	16	16	1
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	75	42	2,6

**Ejemplo 17:****35 Metabolismo de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox**

**[0269]** El metabolismo y el aclaramiento de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox se estudió en ratones normales. A los ratones se les administró Suc-Ile-Ala-Leu-Dox a una sola dosis en embolada intravenosa de 117 mg/kg. Se obtuvieron muestras de plasma a 1 y 4 horas. Se transfirieron muestras de plasma de 100 μl a tubos de microcentrifuga (1,5 ml) y se

40 añadió un patrón interno de daunorrubicina (20 μl a 0,5 mg/ml) junto con acetonitrilo (400 μl). Los tubos se taparon y se agitaron vorticialmente brevemente, seguido de centrifugación a 14.000 rpm. Se retiraron 420 μl de cada tubo y se secaron al vacío. Cada muestra se reconstituyó en 65 μl de tampón formiato de amonio acuoso 20 mM, pH 4,5 (AF) que contenía acetonitrilo (20%) antes del análisis por cromatografía líquida en fase inversa en combinación con espectrometría de masas en tándem (LC MS/MS).

45

**[0270]** Se recogió orina a las 2 y 24 horas post-administración de parejas de ratones en jaulas metabólicas. Las muestras de orina se diluyeron con AF que contenía acetonitrilo (20%) para dar una concentración de analito diana dentro del intervalo práctico del ensayo de LC MS/MS. Se pusieron 30 μl de cada muestra diluida en un tubo Eppendorf (1,5 ml) y se añadió un patrón interno de daunorrubicina (20 μl a 0,5 mg/ml) junto con 50 μl de AF que

50 contenía acetonitrilo (20%). Cada muestra se analizó después mediante LC MS/MS.

[0271] Un HPLC Agilent Hop1100 con detector DAD y programa informático Chemstation se acopló a un espectrómetro de masas PE Sciex API 365 con una fuente de ionización por electronebulización. Se realizó la HPLC en una columna de fase inversa TSK-Gel Super ODS, 2 mm, 4,6 x 50 mm (TosoHaas) equipada con un disco de vigilancia HAIGUARD C18 (Higgins Analytical) y frita de acero inoxidable (Upchurch Scientific). La cromatografía se realizó a temperatura ambiente. El caudal era de 0,5 ml/min. El volumen de inyección era de 50 µl. Se realizó la elución en gradiente usando una fase móvil de tampón AF acuoso 20 mM, pH 4,5, con cantidades crecientes de acetonitrilo. El API 365 se hizo funcionar a 365 °C en un modo de control de reacción múltiple, ajustado para controlar parejas de iones precursor-fragmento de analito específicos. La integración de los cromatogramas se realizó mediante el programa informático MacQuant (PE Sciex) y la cuantificación de cada analito se obtuvo por comparación con curvas de calibración obtenidas previamente. Se usó daunorrubicina como patrón interno en todos los casos.

[0272] Como se observa en la **Tabla 13** y en la **FIG. 16**, el Suc-Ile-Ala-Leu-Dox se aclaró de la circulación muy rápidamente, detectándose aproximadamente el 1,1% de la dosis administrada a 1 hora, mientras que a las 4 horas era prácticamente indetectable. Para el cálculo del porcentaje de la dosis administrada, se estimó que el volumen de plasma era el 40% del volumen de sangre, que se calculó como el 7% del peso corporal del animal. A las 2 y 24 horas se detectó el compuesto precursor en orina al 3,9% y 15,0% de la dosis administrada, demostrando que el riñón es un órgano de excreción principal para el profármaco (**FIG. 17**).

**TABLA 13**

	Plasma (% dosis adm.)		Orina (% dosis adm.)	
	1 h	4 h	2 h	24 h
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	1,14	0,00	3,92	15,0
Ala-Leu-Dox	0,00	0,00	0,00	0,00
Leu-Dox	0,02	0,00	1,17	2,25
Dox	0,00	0,00	0,06	0,36

[0273] No se detectó Ala-Leu-Dox en plasma ni orina. El metabolito peptídico principal era Leu-Dox. La doxorubicina era prácticamente indetectable en plasma, pero se encontró en orina a niveles reducidos a las 2 y 24 horas. Los niveles tanto de precursor como de metabolitos eran superiores en orina a las 24 horas que a las 2 horas. Esto es muy probablemente el resultado de la excreción de orina posterior de los ratones, en relación con el tiempo de recogida de orina inicial (2 horas). Los valores de orina representan una acumulación de 0-2 horas y de 2-24 horas, por lo tanto, la excreción urinaria posterior (después de 2 horas) se acumularía en la muestra de 2-24 horas.

[0274] Se produjo un bajo nivel de escisión y activación del profármaco Suc-Ile-Ala-Leu-Dox en la sangre de ratones normales. La mínima toxicidad observada con Suc-Ile-Ala-Leu-Dox al alto nivel de dosis ensayado (Ejemplo 11) confirma que no hay casi producción sistémica del metabolito activo doxorubicina, que, cuando está presente sistémicamente, es tóxico para tejidos normales.

### 35 Ejemplo 18:

#### Metabolismo de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox

[0275] El metabolismo y el aclaramiento de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox se estudió en ratones normales a los que se administró una sola dosis en embolada intravenosa a 117 mg/kg de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox. Se obtuvieron muestras de plasma a las 1 y 4 horas de ratones separados. Se recogió la orina a las 2 y 24 horas post-administración de parejas de ratones en jaulas metabólicas. Las muestras de plasma y orina se prepararon y se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 17.

[0276] El Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox se aclaraba de la circulación muy rápidamente: aproximadamente el 1,0% de la dosis administrada podía detectarse en plasma a 1 hora, mientras que era prácticamente indetectable a las 4 horas (**Tabla 14** y **FIG. 18**). A las 2 y 24 horas la orina contenía el 12,7% y 4,81% de la dosis administrada, indicando que el riñón es un órgano de excreción principal para el profármaco (**FIG. 19**).

**TABLA 14**

	Plasma (% dosis adm.)		Orina (% dosis adm.)	
	1 h	4 h	2 h	24 h
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	1,03	0,00	12,7	4,81
Ala-Leu-Dox	0,00	0,00	0,01	0,00
Leu-Dox	0,04	0,00	4,69	2,29
Dox	0,01	0,00	0,21	0,51

**[0277]** El metabolito Ala-Leu-Dox era prácticamente indetectable en plasma y se encontró a niveles muy reducidos en orina a las 2 horas. El metabolito peptídico principal era Leu-Dox, que podía detectarse a bajos niveles en plasma a 1 hora, así como en orina a las 2 horas y 24 horas. Estaba presente escasa doxorubicina libre en plasma, sin embargo, se detectaron niveles comparativamente elevados en orina, demostrando que se está produciendo un metabolismo bastante completo.

**[0278]** En estas muestras, los niveles tanto del precursor como de los metabolitos eran superiores en orina a las 2 horas que a las 24 horas. La suma de la cantidad de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y metabolitos recogidos a las 0-2 horas y a las 2-24 horas es similar a la de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox (véase el Ejemplo 17). Por lo tanto, no hay una diferencia fisiológicamente significativa entre el aclaramiento de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

#### Ejemplo 19:

#### Ventajas de los profármacos sobre el agente terapéutico no conjugado

**[0279]** Los profármacos de la invención proporcionan ventajas de tratamiento sobre el agente terapéutico en su forma no conjugada.

**[0280]** En los estudios de dosis máxima tolerada (MTD) de dosis única, a grupos de ratones normales se les administraron dosis en embolada intravenosas del profármaco. Los ratones se observaron diariamente durante 28 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Se estimó que la MTD era igual a la dosis mayor que no producía muertes en ratones después de 28 días. Como se muestra en la **Tabla 15**, la SD-MTD de dosis única de los profármacos que contienen isoleucina varía de 1,6 veces a 2,5 veces mayor que la de doxorubicina en solitario.

**[0281]** En estudios de dosis de repetición en ratones que llevan tumores, a grupos de diez ratones se les administraron diversas cantidades de profármaco por un total de cinco dosis a intervalos de cinco días o 1 semana. Después de una observación frecuente a lo largo de 60 días, se identificó la dosis que demostró estar dentro de límites de toxicidad aceptables como la dosis de repetición máxima tolerada. Como se observa en la **Tabla 15**, la RD-MTD de los profármacos era aproximadamente 6,5 veces superior a la de la doxorubicina en solitario. La dosificación de repetición de los profármacos a o por debajo de su RD-MTD prolonga significativamente la supervivencia de ratones que llevan tumores LS174t, mientras que la de la doxorubicina es completamente ineficaz. Por lo tanto, la conclusión continúa siendo la misma en el sentido de que los profármacos permiten que se administre una cantidad mucho mayor de agente terapéutico al cuerpo en su totalidad y en las proximidades de la célula diana.

**Tabla 15**

Compuesto	SD MTD (mg/kg)*	MTD de dosis de repetición (mg/kg)*	Frecuencia de dosis de repetición	Metabolito principal en plasma
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	75 (42)	53 (30)	Q 5Dx5	Leu-Dox
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	94 (56)	n.d.	n.d.	Leu-Dox
SucβAla-Leu-Ala-Leu-Dox	50 (28)	57 (32)	Q 7Dx5	Ala-Leu-Dox
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	59 (35)	52 (31)	Q 5Dx5	Leu-Dox
Doxorubicina	16 (16)	4 (4)	Q 7Dx5	n.a.

n.d. = no determinada; n.a. = no aplicable  
\*: los valores entre paréntesis son la dosis equivalente de doxorubicina

#### Ejemplo 20:

#### 40 El Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox es bien tolerado en ratones que llevan tumores

**[0282]** El agente terapéutico profarmacológico Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox es significativamente mejor tolerado que la doxorubicina en condiciones de dosis de repetición. Como se esperaría, cuando se administra una dosis similar a la MTD de dosis única (75 mg/kg) (véase el Ejemplo 16) como una dosis de repetición, era peor tolerada. En estudios de dosis de repetición en ratones que llevan tumores, a tres grupos de diez ratones se les administraron 0, 53 ó 68 mg/kg de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox (equivalentes a 0, 30 y 38 mg de doxorubicina/kg) por un total de cinco dosis idénticas (Q5DX5), y se observaron frecuentemente durante 60 días. Todos los animales tratados perdían

peso progresivamente durante todo el estudio, mientras que el grupo de control con vehículo ganó hasta un 12% del peso corporal inicial medio (**FIG. 20**). Dos animales tratados en el grupo de alta dosis se sacrificaron debido a signos de toxicidad, con pérdida de peso corporal superior al 20% de su peso inicial. Los signos de toxicidad eran similares a los observados después de una sola dosis elevada (véase el Ejemplo 16), y concordaban con el perfil de toxicidad conocido de doxorubicina en roedores. Por lo tanto, la toxicidad acumulada era el resultado de una dosificación de repetición a estos niveles de dosis relativamente elevados. Sin embargo, las exposiciones globales máximas a doxorubicina de los animales en los dos grupos de dosis después de 5 dosis eran de 150 y 190 mg/kg, respectivamente, que es significativamente superior (8 a 10 veces) que el nivel de dosis de repetición tolerado de doxorubicina (4 mg/kg o 20 mg/kg de exposición total después de 5 dosis). Sin embargo, la RD-MTD de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox era aproximadamente equivalente a 150 mg/kg de doxorubicina, que era al menos 6-5 veces superior que el nivel de dosis solicitado tolerado de doxorubicina (dosis eficaz RD segura convencional de 20 mg/kg de exposición total después de 5 dosis de 4 mg/kg).

#### Ejemplo 21:

15

#### El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox es mejor tolerado *in vivo* que la doxorubicina

**[0283]** El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, un profármaco tetrapeptídico ejemplar de la invención, es bien tolerado en ratones. En un segundo estudio de dosis máxima tolerada de dosis única (SD-MTD), a grupos de cinco ratones ICR normales se les administraron dosis en embolada intravenosas de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. Los ratones se observaron diariamente durante 49 días y los pesos corporales se midieron dos veces por semana. Los niveles de dosis ensayados eran de 0, 50, 75 ó 100 mg/kg, equivalentes a 0, 28, 42 ó 56 mg/kg de doxorubicina, respectivamente. No hubo toxicidad aguda en las 24 horas siguientes a ningún nivel de dosis. Se observaron los signos de toxicidad dependientes de la dosis y del tiempo durante el estudio. Se observó toxicidad, incluyendo parálisis parcial de la parte inferior de la extremidad y pérdida de peso corporal significativa (>20% de su peso inicial) en los grupos de dosis de 75 y 100 mg/kg. A Día 35 se observó mortalidad en el 40% del grupo de dosis de 75 mg/kg. Basándose en la supervivencia y en la ausencia de signos de toxicidad a Día 49, se determinó que la SD-MTD para Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox era de 50 mg/kg (equivalente a 28 mg/kg de doxorubicina). Esta dosis era muy bien tolerada y no se observaron efectos adversos. Por lo tanto, la SD-MTD era aproximadamente 1,8 veces superior en base molar que la SD-MTD para doxorubicina en solitario (16 mg/kg). Véase la **Tabla 16**. Esta es una determinación de SD-MTD aproximada basándose en un intervalo de dosis a incrementos equivalentes a 14 mg/kg de doxorubicina a lo largo del intervalo ensayado.

**TABLA 16**

Compuesto	SD-MTD (mg/kg)	SD-MTD (mg/kg Dox equiv.)	SD-MTD Proporción Molar (Dox equiv.)
Doxorubicina	16	16	1
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	50	28	1,8

35

#### Ejemplo 22:

#### El Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox es eficaz en ratones que llevan tumores

**[0284]** El agente terapéutico Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox ha demostrado ser eficaz en la prolongación de la supervivencia de ratones y la inhibición del crecimiento de tumores humanos en un modelo de xenoinjerto de ratón que utiliza el carcinoma colorrectal resistente a doxorubicina LS174t. Por ejemplo, grupos de diez ratones atómicos a los que se implantó subcutáneamente trozos de LS174t que se dejó que crecieran hasta aproximadamente 50 mg, se trataron por vía intravenosa con 0, 53 ó 68 mg/kg de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox (equivalente a 0, 30 ó 38 mg/kg de doxorubicina) a intervalos de cinco días durante un total de cinco dosis idénticas (Q5DX5). Los tumores y los pesos corporales se midieron dos veces por semana durante hasta 60 días. Como se observa en la **FIG. 21**, ambas dosis eran eficaces en la reducción del crecimiento de tumores en comparación con animales de control con vehículo. Hubo 4 y 2 supervivientes a largo plazo en los grupos de baja y alta dosis, respectivamente, en comparación con 0 en el grupo de control con vehículo. El día de supervivencia medio (MDS) en animales cuyos tumores alcanzaron 1,5 g antes del Día 60 era significativamente mejor en los grupos de dosis reducida (29,7 días) y elevada (23,4 días) que en el grupo de control con vehículo (18,2 días). Por lo tanto, el Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox era eficaz en este modelo tumoral humano agresivo, en el que la doxorubicina en solitario a su dosis tolerada (3 mg/kg) en este régimen de dosificación es históricamente ineficaz.

#### Ejemplo 23:

#### Eficacia de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox contra tumores LNCaP en ratones atómicos

- [0285]** Se ha demostrado que el agente terapéutico Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox es eficaz en la inhibición del crecimiento de tumores humanos en un modelo de xenoinjerto de ratón que utiliza el carcinoma de próstata LNCaP. Grupos de seis o siete ratones atímicos a los que se inyectó subcutáneamente 4 millones de células LNCaP se trataron por vía intravenosa con solución salina, 5 mg/kg de doxorubicina o 59 mg/kg de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox (equivalente a 33 mg/kg de doxorubicina) a intervalos de siete días por un total de cinco dosis idénticas (Q7DX5). Los ratones se pesaron y los tumores se midieron (mediante un calibrador) al menos una vez por semana antes del inicio de la dosificación (Día 0), después dos veces por semana durante el estudio. Inmediatamente antes del inicio de la dosificación (Día de estudio -2 a Día 0), los ratones se aleatorizaron en diversos grupos basándose en el peso de los tumores. El peso tumoral medio era de aproximadamente 250 mg a Día 0. Los ratones se eutanasiaron después de que los tumores alcanzaran un peso límite de 1,5 g (punto final del cáncer), o cuando los ratones experimentaron una pérdida de peso superior al 25% (punto final tóxico). Los estudios se terminaron a Día 60. Un ratón al que se le administró doxorubicina se excluyó de la evaluación porque el tumor se ulceró.
- [0286]** En ratones atímicos, los tumores del grupo de control con vehículo crecieron relativamente lentamente (**FIG. 22**) y el tumor mostraba características de crecimiento heterogéneas, variando el sacrificio al punto final de peso tumoral del Día 29 al Día 60 (no se muestran los datos). Se produjo una pérdida progresiva de peso corporal en los ratones de control, que perdieron el 15% de peso medio a lo largo del estudio (**FIG. 23**). Dicha pérdida de peso caquéctica es posiblemente debida a los xenoinjertos de LNCaP y se ha descrito por otros grupos (DeFeo-Jones et al., "A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo", *Nature Medicine* 6(11): 1248-1252 (2000)). Los ratones que no llevaban tumores de los mismos envíos mantuvieron el peso y los ratones centinela eran normales por vigilancia de la salud de la colonia. Los ratones que recibieron Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox y doxorubicina tenían una pérdida de peso media superior al 20% (**FIG. 23**). Los efectos combinados de la pérdida de peso basal en ratones que llevaban tumores debida a los tumores, y la pérdida de peso debida a los compuestos de ensayo dio como resultado que tanto el Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox como la doxorubicina superasen la pérdida de peso permitida, siendo inaceptablemente tóxicos a los regímenes de dosificación relativamente elevados ensayados, sacrificándose 7 de 7 y 4 de 5 ratones, respectivamente, por pérdida de peso excesiva en estos grupos de tratamiento (**Tabla 17**).

**30 TABLA 17. Eficacia contra tumores LNCaP en ratones atímicos**

Compuesto	Peso tumoral	% Inhibición del crecimiento tumoral	Supervivientes (día 60)	Punto final del cáncer	Punto final tóxico
Solución salina	D14: 840 $\pm$ 112 D21: 941 $\pm$ 137	-	2	4	0
Doxorubicina <sup>a</sup>	D14: 567 $\pm$ 77	D14: 32 $\pm$ 16 D21: N/A	1	0	4
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	D14: 391 $\pm$ 70 D21: 318 $\pm$ 67	D14: 53 $\pm$ 15* D21: 66 $\pm$ 11*	0	0	7

\*: Estadísticamente diferente del control al nivel de p de 0,01 (prueba *t* bilateral para datos no relacionados)

- [0287]** El Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox inhibía completamente el crecimiento de tumores LNCaP (**FIG. 22; Tabla 17**). No se determinó el punto final de supervivencia en este estudio debido a las características de crecimiento lento de los tumores, continuando los animales en el grupo de control hasta la fecha de fin de estudio designada (Día 60). El peso tumoral medio de todos los ratones cuando se sacrificaron en el grupo de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox era significativamente inferior que el del grupo de doxorubicina en solitario (232 mg y 967 mg, respectivamente; calculado, no se muestra). En su conjunto, el Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox era superior a la doxorubicina en la inhibición del crecimiento tumoral.

40

#### Ejemplo 24:

#### Eficacia contra tumores LNCaP en ratones SCID

45

- [0288]** El estudio de xenoinjerto de LNCaP se repitió después con modificaciones de la forma siguiente: se usaron ratones SCID con dosis inferiores adicionales tanto de doxorubicina como de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox ensayadas para obtener una respuesta a la dosis bien tolerada y limitar la dosificación a dos dosis, separadas por seis días, para minimizar los efectos aditivos del compuesto sobre la pérdida de peso basal relacionada con el tumor. Por consiguiente, a grupos de diez ratones CB17.SCID a los que se inyectó subcutáneamente 2,5 millones de células LNCaP se trataron por vía intravenosa con solución salina, 3 ó 4 mg/kg de doxorubicina o 40, 50 ó 62 mg/kg de

50

- Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox (equivalentes a 22, 28 y 35 mg/kg de doxorrubicina, respectivamente) a intervalos de seis días durante un total de dos dosis idénticas (Q6DX2). Los ratones se pesaron y los tumores se midieron (mediante un calibrador) al menos una vez por semana antes del inicio de la dosificación (Día 0), después dos veces por semana durante el estudio. Inmediatamente antes del inicio de la dosificación (Día de estudio -2 a Día 0), los ratones se aleatorizaron en diversos grupos basándose en el peso de los tumores. El peso tumoral medio era de aproximadamente 200 mg a Día 0. Los ratones se eutanasiaron después de que los tumores alcanzaran un peso límite de 1,5 g (punto final del cáncer), o cuando los ratones experimentaron una pérdida de peso superior al 25% (punto final tóxico). Los estudios se terminaron a Día 60.
- 10 **[0289]** Los ratones del grupo de control con vehículo a los que se implantó el tumor LNCaP disminuyeron de nuevo gradualmente en peso desde el momento del implante, y a Día 22 tenían una pérdida de peso media de aproximadamente el 19% (**FIG. 24**). Una meseta en la pérdida de peso corporal en todos los ratones en el estudio a aproximadamente el Día 12 coincidía con un cambio de dieta de pienso de roedor convencional a un pienso de roedor de alto contenido en grasa, realizado para controlar la caquexia relacionada con el tumor observada.
- 15 **[0290]** El Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox a los tres niveles de dosis inhibía significativamente el crecimiento tumoral a Día 12, el último día de medición en el que estaban vivos todos los ratones. Se observó una tendencia de aumento de la eficacia relacionado con la dosis, aunque la eficacia era máxima a 50 mg/kg. El Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox (40 mg/kg) inhibía el crecimiento tumoral en mayor medida que la doxorrubicina a 3 ó 4 mg/kg, ninguna de las cuales consiguió una significación estadística (**FIG. 25 y Tabla 18**).
- 20 **[0291]** Los ratones que recibieron 40 mg/kg de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox tenían aproximadamente el mismo porcentaje de pérdida de peso media desde el inicio de la dosificación que el control, y menos que ambos grupos con doxorrubicina (**FIG. 24**). Varios ratones que recibieron 50 y 62 mg/kg de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox tuvieron un nivel inaceptable de pérdida de peso superior al 20% a Día 22 (**FIG. 24 y Tabla 18**).
- 25

**TABLA 18. Eficacia contra tumores LNCaP en ratones SCID**

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral	% Inhibición de crecimiento tumoral	Supervivientes (día 22)	Punto final tóxico
Solución salina	-	416 $\pm$ 36	-	9	1
Doxorrubicina	4	310 $\pm$ 25	26 $\pm$ 6	8	2
Doxorrubicina	3	328 $\pm$ 35	21 $\pm$ 8	9	1
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	62	196 $\pm$ 22	53 $\pm$ 5*	4	6
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	50	168 $\pm$ 29	60 $\pm$ 7*	5	5
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	40	244 $\pm$ 25	41 $\pm$ 6*	10	0

En su conjunto, el Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox era eficaz y superior a la doxorrubicina en la inhibición del crecimiento tumoral de LNCaP después de 2 tratamientos semanales.

**Ejemplo 25:****Eficacia de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox y Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox sobre xenoinjertos de LNCaP**

- 35 **[0292]** Las células de carcinoma de próstata humano LNCaP expresan altos niveles de CD10 en la superficie. Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Gly-Dox se ensayaron a un solo nivel de dosis Q7Dx5. Grupos de ocho ratones atímicos NCr macho a los que se inyectó por vía subcutánea 4 millones de células LNCaP, se trataron por vía intravenosa con solución salina, 5 mg/kg de doxorrubicina, 59 mg/kg de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox (equivalentes a 33 mg/kg de doxorrubicina) o 73 mg/kg de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox (equivalentes a 47 mg/kg de doxorrubicina; u 81 mg/kg de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox) a intervalos de siete días por un total de cinco dosis idénticas (Q7DX5) (**Tabla 19**). Los ratones se pesaron y los tumores se midieron (mediante un calibrador) al menos una vez por semana antes del inicio de la dosificación (Día 0), después dos veces por semana durante el estudio. Inmediatamente antes del inicio de la dosificación (Día de estudio -2 a Día 0), los ratones se aleatorizaron en diversos grupos basándose en el peso de los tumores. El peso tumoral medio era de aproximadamente 250 mg a Día 0. Los ratones se eutanasiaron después de que los tumores alcanzaran un peso límite de 1,5 g (punto final del cáncer), o cuando los ratones experimentaron una pérdida de peso superior al 25% (punto final tóxico). Los estudios se terminaron a Día 60. Un
- 45

ratón al que se le administró doxorubicina se excluyó de la evaluación porque el tumor se ulceró.

**TABLA 19**

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral (mg)	Inhibición del crecimiento tumoral (% sobre el control)	Toxicidad (Pérdida de peso >25%)
Solución salina	-	D12: 806 ± 135 (n = 6) D14: 840 ± 112 (n = 6) D21: 941 ± 137(n = 6)	0	0/6
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	75	D14: 391 ± 70(n = 7) D21: 318 ± 67 (n = 7)	D14: 53** D21: 66,2**	7/7
Doxorrubicina	5	D14: 567 ± 77 (n = 6)	32,5	4/6
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	110	D12: 795 ± 177 (n = 7)	1,4	1/7

\*\* : Estadísticamente diferente del control (p < 0,01, bilateral)

5 **[0293]** El SucβAla-Leu-Ala-Leu-Dox interrumpió completamente el crecimiento del tumor LNCaP, indujo la regresión del tumor de todos los ratones tratados y era más eficaz que la doxorubicina (Tabla 19). Curiosamente, el Suc-Leu-Ala-Gly-Dox administrado a una concentración molar un 37% mayor que el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox no era eficaz en absoluto. En este estudio, el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se administró a aproximadamente su RD-MTD en otros modelos de tumores (LS174T y MX-1). Sin embargo, esta dosis demostró ser demasiado elevada en  
10 ratones que llevan tumores LNCaP, ya que incluso los ratones de control con vehículo con tumores LNCaP experimentaron una pérdida de peso corporal de aproximadamente el 15% de promedio. Dicha pérdida de peso caquéctica (desgaste físico general y malnutrición habitualmente asociadas con enfermedad crónica) es posiblemente debida a los xenoinjertos de LNCaP y se ha descrito por otros grupos (DeFeo-Jones et al., Nature Medicine 6(11): 1248-1252 (2000)). Sorprendentemente, el Suc-Leu-Ala-Gly-Dox administrado a una dosis un 10%  
15 mayor que la dosis eficaz ensayada en el modelo de HT-29 (Ejemplo 26) no era eficaz pero todavía se toleraba en el modelo de LNCaP. No obstante, la ausencia relativa de eficacia y la toxicidad a dosis relativamente elevadas de Suc-Leu-Ala-Gly concuerda con la idea de que CD10 desempeña un papel importante para la escisión *in vivo* de profármacos activados por tumores.

## 20 **Ejemplo 26:** EJEMPLO DE REFERENCIA

### **Eficacia de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox contra HT-29, una línea celular CD10<sup>neg</sup>**

**[0294]** Un estudio de xenoinjerto de ratón demostró la eficacia de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox sobre el crecimiento de  
25 carcinoma de colon humano (HT-29) y el resultado en términos de supervivencia a largo plazo. Ratones atímicos macho jóvenes sanos se inyectaron por vía subcutánea con 5 millones de células HT-29. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mg de peso, se inició un tratamiento cada 7 días por 5 dosis de grupos de 8, 10 ó 12 ratones con vehículo, doxorubicina 4 mg/kg, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox 40 ó 67 mg/kg. Se midió el tamaño del tumor y los pesos corporales dos veces por semana durante hasta 60 días.

30 **[0295]** Se observó un aumento de la supervivencia de los ratones dependiente de la dosis. El Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, administrado a 40 mg/kg y 67 mg/kg (concentración equivalente a 42 mg/kg y 70 mg/kg de doxorubicina) se toleraba muy bien y prolongaba enormemente la supervivencia de los ratones que llevaban tumores. Los ratones tratados con doxorubicina tenían una MDS de 30 días. El día de supervivencia medio se aumentó a 39 y 41 días en  
35 los grupos tratados con Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, en comparación con 26 días en el grupo de control con vehículo. (**Tabla 20**). Las altas dosis de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox disminuían la velocidad de crecimiento del tumor significativamente sobre el grupo de control con vehículo (**Tabla 20**). El compuesto se toleraba muy bien, sugiriendo que las dosis administradas estaban ambas por debajo de la MTD de dosis de repetición.

40 **[0296]** Por lo tanto, se estableció una respuesta a la dosis y se identificó una gran ventana terapéutica para Suc-Leu-Ala-Gly-Dox en el modelo de HT-29. Las células HT-29 no expresan CD10 *in vitro* y otras enzimas, tales como la oligopeptidasa thimet, podrían ser responsables de la escisión de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox en xenoinjertos de HT-29.

TABLA 20

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral medio a Día 14 (mg)	%TGI (Día 14, media)	Peso Tumoral medio a Día 25 (mg)	%TGI (Día 25, mediana)	Día de supervivencia medio calculado (día)	Prolongación del día de supervivencia medio sobre los controles	Número de supervivientes a largo plazo	Toxicidad (Pérdida de peso >20%)
Solución salina	-	733 ± 72 (n = 12)	0%	1515	0%	25,7 ± 2,6 (n = 11)	0%	0/11	0/11
Doxorrubicina	4,0	665 ± 103 (n = 10)	9,3%	1046	30,9%	30,0 ± 3,7 (n = 9)	16,7%	0/10	1/10
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	40	704 ± 92 (n = 8)	4,0%	952	37,2%	38,8 ± 6,6 (n = 7)	51,0%	1/7	0/7
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	67	490 ± 124 (n = 7)	33,2%*	857	43,5%	41,3 ± 7,2 (n = 7)	60,7%*	3/7	0/7

\*: Estadísticamente diferente del control al nivel de p de 0,10 (bilateral).  
#: Algunos ratones se excluyeron de los análisis de crecimiento tumoral/supervivencia debido a la ulceración de los tumores.  
TGI: Inhibición del crecimiento tumoral sobre el control.

## Ejemplo 27:

5

## Susceptibilidad a la escisión por oligopeptidasa thimet y CD10 en comparación con la eficacia

[0297] Para evaluar adicionalmente el papel *in vivo* de CD10 en la escisión de compuestos de profármaco activados por tumores, se ensayaron compuestos de profármaco que contenían doxorrubicina con perfiles de escisión distintos para oligopeptidasa thimet y CD10 en xenoinjertos de LNCaP desarrollados en ratones C.B-17.SCID. Se evaluaron Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Gly-Dox. Todos los compuestos excepto el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox (tres niveles) se administraron a dos niveles con el objetivo de obtener una respuesta a la dosis para todos los compuestos. Los perfiles de escisión para cada uno de los compuestos de ensayo se muestran en la **Tabla 21**.

15

TABLA 21

Compuesto	Escindido por CD10	Escisión por oligopeptidasa thimet
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	+	+
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	+	-
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	+	+
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	+	-
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	-	+

[0298] Sabiendo que los ratones atímicos que llevan tumores LNCaP tienen pérdida de peso, se seleccionaron niveles de dosis muy conservativos para cada compuesto que se estimó que eran dosis equitóxicas bien toleradas basándose en estudios anteriores y en los resultados de SD-MTD. El nivel de alta dosis para dosificación de repetición es habitualmente el 80% de su SD-MTD, y el nivel de dosis reducida es el 80% del nivel de alta dosis. Por consiguiente, a grupos de diez ratones CD17.SCID macho a los que se inyectó por vía subcutánea 2,5 millones de células LNCaP, se trataron por vía intravenosa con los compuestos a los niveles descritos en la **Tabla 22** a intervalos de seis días durante un total de dos dosis idénticas (Q6DX2).

25

TABLA 22. Niveles de dosis

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Dosis de doxorrubicina equivalente (mg/kg)
Vehículo	-	-
Doxorrubicina	4	4
Doxorrubicina	3	3
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	62	35

Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	50	28
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	40	22
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	62	35
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	50	28
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	71	43
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	58	35
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	94	57
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	75	45
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	132	84
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	110	70

**[0299]** Los tumores LNCaP crecían bien en ratones SCID, pero los ratones SCID con xenoinjertos de tumores LNCaP experimentaban una pérdida de peso grave, ya que el 80% de los ratones de control tenían más del 25% de pérdida de peso al final del estudio. No obstante, la eficacia de diferentes tratamientos a niveles aproximadamente equitóxicos se compararon basándose en el tiempo que llevó al 50% de los ratones alcanzar una pérdida de peso tóxica y en el número total de ratones con pérdida de peso tóxica al final del estudio. Los resultados de esta comparación se muestran en la **Tabla 23**.

**TABLA 23**

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo: Pérdida de peso del 50% (Día)	Tiempo: Pérdida de peso del 100% (Día)	% de pérdida de peso al final del estudio	Inhibición del crecimiento
Control		47		80%	
Doxorrubicina	4	33		80%	29%
Doxorrubicina	3	36		60%	29%
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	62	15	33		65%
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	50	19	40		67%
Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	40	33	54		47%
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	62	12	33		80%
Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox	50	33		80%	60%
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	70,5	26	47		53%
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	58,3	33	61		56%
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	94	19	36		80%
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	75	26	43		73%
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	132	29		80%	40%
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	110	33		80%	40%

10

**[0300]** La clasificación de estos compuestos, de más eficaz a menos eficaz es: Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. El Suc-Leu-Ala-Gly-Dox es más eficaz que la doxorrubicina y menos eficaz que el Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox. Como se esperaba en vista de la incapacidad de CD10 para escindir el Suc-Leu-Ala-Gly-Dox (véase el Ejemplo 2) y de la ausencia de eficacia *in vivo* (véase el Ejemplo 25), el Suc-Leu-Ala-Gly-Dox no era muy activo sobre tumores LNCaP.

15

**Ejemplo 28:****Estudio de farmacocinética/metabolismo**

- 5 **[0301]** A seis grupos de ratones hembra normales ICR se les administró una sola dosis en embolada IV con aproximadamente 100  $\mu\text{mol/kg}$  de Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Leu-Dox, Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, Suc-Leu-Ala-Gly-Dox o 10  $\mu\text{mol/kg}$  de doxorubicina (Dox). Se obtuvo plasma de tres animales individuales en cada grupo a los 5 minutos, 1, 2, 4 ó 6 h. Se analizaron las concentraciones de precursor, dipeptidil-doxorrubicina (Ala-Leu-Dox, Ala-Gly-Dox),  $\alpha$ -aminoacil-doxorrubicina (Leu-Dox o Gly-Dox) y doxorubicina en
- 10 extractos de las muestras de plasma usando un método de HPLC en gradiente de fase inversa con detección de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 560$ ). El tiempo de permanencia máximo del Ala-Gly-Dox no se confirmó porque no había disponible un patrón. Se determinaron las cantidades usando un ajuste de curva convencional lineal a mediciones de 10 a 2000 ng/ml de soluciones de doxorubicina en plasma de ratón.
- 15 **[0302]** Los cursos de concentración-tiempo (**FIG. 26**) indican que los patrones metabólicos eran similares para todos los compuestos con la excepción del Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, que no se escinde por CD10. En particular, excepto por Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, el Leu-Dox era el metabolito principal durante las primeras dos horas, mientras que el conjugado con dipeptidilo Ala-Leu-Dox era un producto más minoritario que se formaba aproximadamente al mismo tiempo que el Leu-Dox. Esto concuerda con el patrón de escisión para CD10. La doxorubicina aparecía
- 20 posteriormente, disminuyendo su concentración plasmática más lentamente con el tiempo que la de los otros metabolitos, como se esperaba a partir de la farmacocinética de la doxorubicina actual y medida anteriormente (Van der Vijgh, "Comparative metabolism and pharmacokinetics of doxorubicin and 4'-epidoxorubicin in plasma, heart and tumor of tumor bearing mice", Cancer Chem-other Pharmacol 26(1) 9-12 (1990); y Tabrizi-Fard, et al., "Evaluation of the Pharmacokinetic Properties of a Doxorubicin Prodrug in Female ICR(CD1®) Mice Following Intravenous
- 25 Administration", Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 42: 324 (2001)) y por el grupo de control con doxorubicina. Las áreas bajo las curvas de concentración plasmática-tiempo (**Tabla 24**) indican que la dosificación con Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, el único conjugado con peptidilo que no se esperaba que se escindiera por CD10, daba como resultado una exposición a Dox considerablemente menor que para los cuatro compuestos de peptidilo-doxorrubicina escindibles por CD10. Entre los compuestos escindibles por CD10, los que también pueden escindirse por
- 30 oligopeptidasa thimet (Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Leu-Dox) producían una exposición a doxorubicina aproximadamente dos veces mayor (AUC) que el no compuesto correspondiente con isoleucina sustituyendo a la leucina en la posición P1 (Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox, respectivamente). Estos compuestos sustituidos con isoleucina se escinden muy poco o nada por TOP. La disminución de dos veces en la AUC de la exposición a Dox también se observa con tripéptidos en comparación con su homólogo tetrapeptídico
- 35 correspondiente (Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox frente a Suc-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox frente a Suc-Ile-Ala-Leu-Dox). Debería señalarse que la exposición a doxorubicina relativa después de la dosificación de estos compuestos se parece a la seguridad relativa expresada como dosis máxima tolerada en un estudio de seguridad en ratones. Por lo tanto, se consigue un mejor perfil de exposición a doxorubicina.

40 **TABLA 24. Exposición plasmática expresada como AUC<sub>0-6h</sub> de precursor y metabolitos peptolíticos**

Compuesto administrado	Precursor	AL-Dox o AG-Dox*	L-Dox o G-Dox* (M•h)	Dox
Suc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox	806	3,2	40	3,4
Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox	326	0,5	8,5	1,5
Suc-Leu-Ala-Leu-Dox	634	1,6	5,1	1,6
Suc-Ile-Ala-Leu-Dox	452	1,0	6,2	0,9
Suc-Leu-Ala-Gly-Dox*	310	2,1	0,9	0,3
Doxorrubicina (Dox)	N/A	N/A	N/A	3,3

\* Los productos metabólicos para Suc-Leu-Ala-Gly-Dox son Ala-Gly-Dox (identidad no confirmada por patrón), Gly-Dox y Dox.

- [0303]** Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la TOP que aparece normalmente en el cuerpo es un mecanismo de activación no tumoral para compuestos particulares que también son sustratos de CD10. Para compuestos que van a activarse por CD10 relacionada con tumores puede ser preferible diseñar el oligopéptido para
- 45 limitar su digestión por TOP, ya que los datos indican aproximadamente dos veces menos exposición a Dox cuando el compuesto no es un sustrato de TOP. Son ejemplos de dichos compuestos Suc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Ile-Ala-Leu-Dox.

[0304]

Ejemplo 29:

**Análisis de líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con CD10**

5

[0305] Para proporcionar pruebas directas de que CD10 puede escindir prefármacos peptídicos, se analizaron líneas celulares transfectantes con CD10.

10 [0306] Se clonó el ADNc de CD10 a partir de una genoteca de ADNc fetal humano mediante PCR usando tres conjuntos de cebadores solapantes:

```

a5HindCD10  AAGCTTGCCGCCACCATGGGCAAGTCAGAAAGTCAGATG
a3XbaCD10   TCTAGAAGGGAGGCCAAGTCGAGGTTGGTC
b5XbaCD10   TCTAGAGATTACTATGAATGCACTGGAATC
b3XhoCD10   CTCGAGGTACTCATTATTCAGTTTGTATC
c5XhoCD10   CTCGAGTTGAACTACAAAGAAGATGAATAC
c3PacCD10   TTAATTAATCACCAAACCCGGCACTTCTTTTC
    
```

15 [0307] La región codificante completamente ensamblada se subclonó en un vector de expresión de mamífero, cadena abajo del promotor hCMV-MIE. El análisis de la secuencia del ADN confirmó la identidad de secuencia con la secuencia codificante de CD10 humana (número de acceso Genbank Y00811). El plásmido de expresión se linealizó y se transfectó de forma estable en células CHO-S. Se seleccionaron clones de transfectantes que expresaban CD10 en 500 µg/ml de higromicina y se exploraron por citometría de flujo para determinar la expresión de CD10 en superficie celular usando un anticuerpo anti-CD10-FITC disponible en el mercado. La **FIG. 29** muestra la intensidad fluorescente media geométrica (Geo MFI) de clones de células CHO transfectantes.

20

[0308] Los clones se ensayaron posteriormente en un ensayo de proliferación con <sup>3</sup>H-timidina en presencia de doxorubicina (Dox), Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox o Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. Las células CHO parecen ser menos sensibles a doxorubicina ya que el valor de CI<sub>50</sub> promedio para Dox era de 570 nM, en comparación con 130 y 10 nM para células LnCAP y Ramos, respectivamente (**Tabla 25**). La **Tabla 26** compara la actividad de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox con Dox. Mientras que la CI<sub>50</sub> para Dox y Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox sobre LnCAP (CD10 positivas) difiere en un factor de 3, se observó una diferencia de 49 con células CHO parentales. Este número se redujo hasta ~16 veces con células CHO transfectadas con CD10.

25

**TABLA 25. Ensayo de proliferación con 3H-timidina con CHO transfectadas con CD10, CHO parentales, LnCAP y Ramos**

30

	CI <sub>50</sub> (mM)		
	Doxorrubicina	Suc-β-Ala-Leu-Ala-Leu	Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu
<b>LnCap</b>	0,13	0,51	0,39
<b>Ramos</b>	0,01	0,84	0,44
<b>CHO parentales</b>	0,51	17,00	49,00
<b>DB4</b>	0,31	5,40	4,20
<b>Clon Nº 3</b>	0,55	19,00	19,00
<b>Clon Nº 5</b>	0,81	24,00	19,00
<b>Clon Nº 7</b>	0,64	13,00	11,00
<b>Clon Nº 8</b>	0,57	10,00	8,40

**TABLA 26. Ensayo de proliferación con 3H-timidina con células LnCAP, CHO parentales y CHO transfectadas con CD10: comparación de SucbAIAL y Dox CI50**

	CI <sub>50</sub> (mM)		Proporción
	Doxorrubicina	Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu	
<b>LnCap</b>	0,13	0,39	3
<b>CHO parentales</b>	0,51	49,00	96

	CI <sub>50</sub> (mM)		Proporción
	Doxorrubicina	Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu	Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu/Dox
<b>Clon Nº 7</b>	0,64	11,00	17
<b>DB4</b>	0,31	4,20	14
<b>Clon Nº 8</b>	0,57	8,40	15

**[0309]** Para preguntarse directamente la cuestión de si las células que expresan CD10 son capaces de escindir el profármaco, se recogieron sobrenadantes de células CHO parentales o transfectadas con CD10 tratadas con los compuestos. Se incubaron CHO parentales y transfectadas con CD10 (clon 8) a 37 °C con Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox 10 μM (un sustrato para CD10) o Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, que no es un sustrato para CD10. Después de la incubación durante 1, 4 y 24 horas, se transfirió una alícuota de cada sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se congeló a -20 °C. Las muestras se descongelaron posteriormente y se analizaron mediante HPLC de fase inversa (columna TSK Super-ODS de 4,6 x 50 mm 2 μm) con detección de fluorescencia después de la dilución con 3 volúmenes de acetonitrilo, eliminación del precipitado por centrifugación y dilución adicional en 3 volúmenes de agua. Cuando se incubó con Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, no se observó ningún metabolismo detectable a Leu-Dox con la línea celular parental, mientras que el clon 8 (transfectado con CD10) generaba niveles significativos de Leu-Dox a partir de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox (**Tabla 27**). Las células CHO transfectadas con CD10 no proporcionaban velocidades de escisión de Suc-Leu-Ala-Gly-Dox significativamente aumentadas en comparación con células CHO no transfectadas, lo que concuerda con la sugerencia de que este profármaco peptídico es un mal sustrato para CD10.

**Tabla 27. Velocidades de conversión a Leu-Dox o Gly-Dox**

Sustrato	Suc-βAla-Leu-Ala-Leu Dox		Suc-Leu-Ala-Gly-Dox	
	Parentales	Clon 8	Parentales	Clon 8
Porcentaje conversión/hora	0	3,00	0,57	0,61
mM/hora	0	0,30	0,06	0,06

**[0310]** Para confirmar que las células CHO que expresan CD 10 eran capaces de escindir Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, se recogieron sobrenadantes 24 horas después de la exposición a cada uno de los compuestos siguientes: Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Gly-Dox. Los sobrenadantes se transfirieron a células HL60 sensibles a Dox (CD10 negativas) y se midió la proliferación celular 24 horas después. Los datos de proliferación con <sup>3</sup>H-timidina muestran que mientras que los sobrenadantes de células CHO parentales o células CHO negativas para CD10 no inhibían la proliferación en presencia de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, dos células CHO positivas para CD10 representativas sí lo hacían (**Tabla 28**). Como control adicional, se añadió Dox, Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Gly-Dox recién preparados a HL60 y se realizaron mediciones de la CI<sub>50</sub> 24 horas después. Cuando los compuestos se añaden recién preparados a células HL60 (CD10 negativas), la escisión de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox no se produce, indicando de nuevo que CD10 es necesaria para la escisión. La confirmación de los datos se muestra cuando el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se comparó con Suc-Leu-Ala-Gly-Dox y los resultados concuerdan con el hecho de que Suc-βAla-Leu-Ala-Leu se escinde por células transfectadas con CD10 y no por las líneas celulares parentales.

**[0311]**

**TABLA 28. Proliferación de células HL60 en presencia de sobrenadante recogido de células CHO parentales y células CHO positivas para CD10 tratadas con compuestos**

	CI <sub>50</sub> (μM)		
	Dox	Suc-βAla-Ile-Ala-Leu	Leu-Ala-Gly-Dox
CHO parentales	0,279	>25	>25
Clon 10 (CD10 neg.)	0,417	>25	>25
Clon DB4 (CD10 pos.)	0,491	5,4	>25

	CI <sub>50</sub> (μM)		
	Dox	Suc-βAla-Ile-Ala-Leu	Leu-Ala-Gly-Dox
Clon 8 (CD10 pos.)	0,488	2,7	>25
HL60 con compuesto recién preparado	0,164	>50	>50

**[0312]** En resumen, los datos muestran que CD10 puede escindir el profármaco Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox o Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox para liberar Leu-Dox.

### 5 Ejemplo 30:

#### Comparación de la inhibición del crecimiento tumoral por Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y doxorubicina en el modelo de carcinoma de próstata LNCaP sensible a doxorubicina

10 **[0313]** Se realizó una comparación de la eficacia relativa de la inhibición tumoral de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox frente a la doxorubicina en una línea celular tumoral positiva para CD10 (LNCaP) para establecer una respuesta a la dosis y un índice terapéutico comparables.

**[0314]** En este modelo, 7,5 millones de células LNCaP resuspendidas en 0,1 ml de solución salina tamponada con fosfato y 0,1 ml de Matrigel (Becton Dickinson) se inyectaron en el lateral de ratones atímicos macho alimentados con dieta de alto contenido en grasa. La dosificación se inició cuando el peso tumoral medio alcanzó aproximadamente 200 mg y los regímenes de dosificación se resumen en la **Tabla 29**.

#### Eficacia

20

**[0315]** El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox a los tres niveles de dosis (equivalentes molares de 18, 22 y 28 mg de doxorubicina/kg) inhibía significativamente el crecimiento de tumores a Día 22, el último día de medición en el que estaban vivos todos los ratones (**FIG. 30** y **Tabla 29**). No se observó ninguna tendencia de aumento de la eficacia de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox relacionado con la dosis, ya que la eficacia era máxima mediante el equivalente a 18 mg/kg de Dox (**FIG. 30**). Además, las tres dosis de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox inhibían significativamente el crecimiento de tumores en mayor medida que la doxorubicina administrada a 4 mg/kg. La doxorubicina a esta dosificación no consiguió una significación estadística desde el control (**Tabla 29**). Ningún tumor alcanzó el punto final del cáncer predeterminado de >1 g en los tres grupos de dosis de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox (**FIG. 31**). Por lo tanto, el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, pero no la doxorubicina, prolongaba significativamente la supervivencia a ratones que llevaban tumores en comparación con el grupo de control (**Tabla 29**).

#### Toxicidad

35 **[0316]** Además, las tres dosis de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se toleraban muy bien sin puntos finales tóxicos cuando se terminó el estudio a Día 36, y con una pérdida máxima del 3% de peso corporal ajustado a la media de grupo (restado el peso del tumor) (**FIG. 32**). Los ratones que recibieron 4 mg/kg de doxorubicina tenían un punto final tóxico (pérdida de peso >20%) el Día 22 y una pérdida de aproximadamente el 7% de peso corporal ajustado a la media de grupo el Día 22. Los ratones del grupo de control también tenían una pérdida de peso ligera (pérdida de hasta el 5% de peso corporal ajustado a la media de grupo) y dos puntos finales tóxicos que podían ser el resultado del crecimiento del tumor (**Tabla 29**).

**Tabla 29. Inhibición del crecimiento tumoral e índices de supervivencia en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata LNCaP**

Grupo	Compuesto	Dosis# (mg/kg)	N	Peso tumoral (mg)	TGI	Supervivencia	Punto final del cáncer	Punto final tóxico
A	Solución salina	-	8	D22: 677,4 ± 185,2	-	D36: 2	4	2
C	Doxorubicina	4	8	D22: 323,8 ± 60,8	D22: 52,2 ± 28,8%	D36: 3	4	1

Grupo	Compuesto	Dosis# (mg/kg)	N	Peso tumoral (mg)	TGI	Supervivencia	Punto final del cáncer	Punto final tóxico
D	Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	50 (equiv. a 28*Dox)	8	D22: 143,4 ± 19,0	D22: 78,8 ± 27,5%*	D36: 8**	0	0
E	Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	40 (equiv. a 22*Dox)	8	D22: 180,1 ± 19,7	D22: 73,4 ± 27,5%*	D36: 8**	0	0
F	Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox	32 (equiv. a 18*Dox)	8	D22: 116,3 ± 30,2	D22: 82,8 ± 27,7%*	D36: 8**	0	0

#: Todos los compuestos se administraron Q7Dx3

Estadísticamente diferente del grupo de control y del grupo con doxorubicina (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

Los parámetros evaluados incluyen (1) peso tumoral medio a Día 22, el último punto temporal antes de que el primer ratón alcance el punto final del cáncer y/o tóxico; (2) TGI (inhibición del crecimiento tumoral a Día 22, porcentaje de inhibición del peso tumoral medio sobre el control); (3) supervivientes a Día 36, (4) tumores que alcanzan el tamaño límite predeterminado de 1000 mg (punto final del cáncer) y (5) tolerabilidad del régimen de dosificación, por número de ratones que muestran un punto final tóxico (pérdida de peso corporal >20%).

[0317] En resumen, en este modelo de LNCaP sensible a doxorubicina de crecimiento lento, las tres dosis de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox inhibían significativamente el crecimiento tumoral, prolongaban la supervivencia de los ratones y se toleraban muy bien (FIG. 30-32). El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox es significativamente mejor que dosis aproximadamente equitoxicas de doxorubicina en la inhibición del crecimiento de un tumor de próstata relativamente sensible a doxorubicina de crecimiento lento. La doxorubicina administrada a aproximadamente su dosis máxima tolerada (uno de ocho ratones perdieron peso y alcanzaron el punto final tóxico el Día 22) era eficaz sobre el tumor pero no consiguió una significación estadística desde el control en la inhibición del crecimiento tumoral o la prolongación de la supervivencia. Por lo tanto, el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox a los tres niveles inhibía significativamente el crecimiento de tumores LNCaP mejor que la doxorubicina, y se identificó una ventana terapéutica relativamente amplia para Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox en el modelo de tumor de próstata humano LNCaP. Además, debido a su sensibilidad a la doxorubicina, el modelo descrito en este ejemplo sirve como buen indicador de la liberación de doxorubicina del resto de la molécula de profármaco.

20

#### Ejemplo 31:

**Comparación de la inhibición del crecimiento tumoral por Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y tripéptidos Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox y Suc-Leu-Ala-Gly-Dox en el modelo de carcinoma de próstata LNCaP sensible a doxorubicina**

25

[0318] Para evaluar adicionalmente los papeles *in vivo* de la CD10 extracelular frente a TOP (oligopeptidasa thimet) en la escisión de un compuesto de profármaco activado por tumor, se ensayaron compuestos de profármaco que contenían doxorubicina con perfiles de escisión distintos para CD10 en xenoinjertos de LNCaP CD10<sup>positivos</sup> que crecían en ratones atómicos.

30

[0319] El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, un sustrato para tanto TOP como CD10, y el Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, un sustrato para CD10, pero un sustrato más débil para TOP, se administraron de forma equimolar al equivalente a 22 mg/kg de Dox Q7Dx3. El Suc-Leu-Ala-Gly-Dox, un sustrato para TOP solamente, aunque un sustrato comparativamente más débil que el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, se administró al equivalente a 70 mg/kg de Dox Q7Dx3 (un nivel que es tres veces superior a la dosificación de concentración molar de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox). El Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y el Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox inhibían enormemente el crecimiento tumoral (FIG. 33) y conseguían una TGI superior al 70% (inhibición del crecimiento tumoral) el Día 22 en comparación con el grupo de control (Tabla 30), un aumento estadísticamente significativo de la inhibición. El Suc-Leu-Ala-Gly-Dox administrado a tres veces la concentración molar de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox, inhibía el crecimiento tumoral en menor medida que el Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox (TGI D22: 39,7 ± 29,5% frente a 77,5 ± 27,5%) y no conseguía una significación estadística desde el control (Tabla 30). Además, ningún tumor alcanzó el punto final del cáncer predeterminado de >1 g en ninguno de los grupos con el Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y el Suc-Leu-Ala-Gly-Dox (FIG. 34). Los tres compuestos se toleraban muy bien sin puntos finales tóxicos cuando se terminó el estudio a Día 36 (FIG. 35).

45

**Tabla 30. Inhibición del crecimiento tumoral e índices de supervivencia en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata LNCaP**

Grupo	Compuesto	Dosis# (mg/kg)	N	Peso tumoral (mg)	TGI	Supervivencia	Punto final del cáncer	Punto final tóxico
A	Solución salina	-	8	D22: 677,4 ± 185,2	-	D36: 2	4	2
E	Suc-βAla-Leu- Ala-Leu-Dox	40 (equiv. a 22* Dox )	8	D22: 180,1 ± 19,7	D22: 73,4 ± 27,5%*	D36: 8**	0	0
G	Suc-βAla-Ile-Ala- Leu-Dox	40 (equiv. a 22* Dox)	8	D22: 152,1 ± 19,3	D22: 77,5 ± 27,5%*	D36: 8**	0	0
J	Suc-Leu-Ala- Gly-Dox	110 (equiv. a 70* Dox)	8	D22: 408,8,1 ± 75,7	D22: 39,7 ± 29,5%	D36: 6*	2	0

#: Todos los compuestos se administraron Q7Dx3  
Estadísticamente diferente del control y del grupo con doxorubicina (\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01)

5

Los parámetros evaluados incluyen (1) peso tumoral medio a Día 22, el último punto temporal antes de que el primer ratón alcance el punto final del cáncer y/o tóxico; (2) TGI (inhibición del crecimiento tumoral a Día 22, porcentaje de inhibición del peso tumoral medio sobre el control); (3) supervivientes a Día 36, (4) tumores que alcanzan el tamaño límite predeterminado de 1000 mg (punto final del cáncer) y (5) tolerabilidad del régimen de dosificación, por número de ratones que muestran un punto final tóxico (pérdida de peso corporal >20%).

10

**[0320]** La diferenciación de respuesta de eficacia a la dosis de Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox frente a Suc-Leu-Ala-Gly-Dox confirma claramente el papel crítico *in vivo* de CD10 en la escisión de compuestos de profármaco activados por tumores en tumores LNCaP CD10<sup>+</sup>. El que Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox y Suc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox tengan una eficacia similar sobre xenoinjertos de LNCaP sugiere que CD10 desempeña un papel más dominante que TOP en la escisión de compuestos de profármaco activados por tumores en tumores LNCaP CD10<sup>+</sup>.

15

#### Métodos analíticos para los ejemplos restantes

**[0321]** Las secuencias peptídicas, sintetizadas usando estrategias de fase sólida o de solución, se usaron sin una purificación adicional si la HPLC analítica (métodos A, B y D) mostraba que el producto bruto tenía una pureza superior al 80%. Si el producto bruto no tenía una pureza superior al 80%, el producto se purificó adicionalmente usando el método C de HPLC preparativa.

#### 25 Método A de HPLC

**[0322]** Se realizaron análisis de HPLC analítica en un Waters 2690 usando una columna C-18 (4 μm, 3,9 x 150 mm DI, caudal 1 ml/min) que se eluía con un gradiente de disolvente A (TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O) y disolvente B (TFA al 0,1%/ACN), y los datos se procesaron a λ 254 nm usando el sistema Waters Millennium. El gradiente de HPLC analítica comenzaba con el 90% de disolvente A y terminaba con el 100% de disolvente B durante un periodo de 14 minutos (lineal). La pureza de los compuestos para este método y los siguientes se evaluó como el porcentaje relativo del área bajo la curva de los picos.

30

#### Método B de HPLC

35

**[0323]** Se realizaron análisis de HPLC analítica en un Waters 2690 usando una columna C-8 (3,5 μm, 4,6 x 150 mm DI, caudal 1 ml/min) que se eluía con un gradiente de disolvente A (formiato de amonio 20 mM al 80% y acetonitrilo al 20%) y disolvente B (formiato de amonio 20 mM al 20% y acetonitrilo al 80%), y los datos se procesaron a λ 254 nm usando el sistema Waters Millennium. El gradiente de HPLC analítica comenzaba con el 100% de disolvente A al 100% de disolvente B durante un periodo de 30 minutos (lineal).

40

#### Método C de HPLC

**[0324]** Se consiguió la purificación preparativa de productos brutos usando un sistema Waters Delta Prep 4000 usando una columna C-4 (15 μm, 40 x 100 mm DI, caudal 30 ml/min) que se eluía con un gradiente de disolvente A (H<sub>2</sub>O) y disolvente B (MeOH). El gradiente de HPLC preparativa comenzaba con el 80% de disolvente A y va hasta el 100% de disolvente B durante un periodo de 70 minutos (lineal). La detección con UV era a λ 254 nm.

45

**Método D de HPLC**

5 **[0325]** Se efectuó una HPLC analítica en un instrumento Hewlett Packard usando una columna TSK superODS (Toso-Haas); disolvente A (TFA al 0,1% en agua); disolvente B (TFA al 0,1% en acetonitrilo); gradiente: del 30 al 36% de B en 2 minutos, del 36 al 41% de B en 10 minutos, del 41 al 90% de B en 3 minutos, 5 minutos al 90% de B, detección a longitud de onda  $\lambda$  254 nm.

**10 NMR y MS**

**[0326]** Se realizaron determinaciones estructurales adicionales mediante técnicas de NMR y MS y los resultados confirmaron los compuestos reivindicados.

**15 Método de TLC**

**[0327]** Se llevó a cabo un análisis de TLC en placas 60F-254 nm-0,25 mm de gel de sílice (Merck) con DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O/Ácido fórmico al 88% 85/15/1/2 para su elución.

**20 Test de ninhidrina**

**[0328]** Se introdujeron unos pocos miligramos de producto en un tubo de ensayo y se añadieron dos gotas de Solución A (ninhidrina 50 mg/ml en etanol), dos gotas de Solución B (4 mg/ml de fenol en etanol), después dos gotas de Solución C (2 ml de KSCN 0,01 M, acuoso en 100 ml de piridina). La mezcla se dejó en un baño de agua en ebullición durante cinco minutos. En presencia de una amina libre la solución se vuelve morada.

**Ejemplos de síntesis de oligopéptidos específicos****Fuentes de reactivos disponibles en el mercado**

30

**[0329]** La doxorubicina y la daunorubicina se suministraron por Meiji (Japón), el Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> por Strem chem (Newburyport, MA), PEG por Shearwater (Huntsville, Alabama), disolventes, HATU por Aldrich (Milwaukee, WI); todas las resinas y aminoácidos se suministraron por ABI (Foster City, CA), Novabiochem (San Diego, CA), Advanced ChemTech (Louisville, KY), Peptide International (Louisville, KY) o SynPep (Dublin, CA).

35

**Ejemplo 32:****Síntesis de Fmoc-Ile-Ala-Leu-OH**

40 **[0330]** Se sintetizó un tripéptido (Fmoc-Ile-Ala-Leu-OH) usando la estrategia en fase sólida con química de Fmoc convencional. Una síntesis típica usaba resina alcoxi de Wang (carga 0,60 mmol/g). Se usaron aminoácidos protegidos con Fmoc para la síntesis peptídica en fase sólida.

45 **[0331]** Para una escala de péptido 1 mM en resina, se preactivaron 3 equivalentes de aminoácidos con HBTU como agente activante durante 5 minutos antes de añadirse a la resina junto con 2 equivalentes de DIEA. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 2 h y después se lavó con DMF (25 ml x 3) y DCM (25 ml x 3). La reacción de acoplamiento se repitió usando 2 equivalentes de aminoácidos usando condiciones similares. El desarrollo de la reacción se controló usando ensayo de ninhidrina y si el ensayo de ninhidrina indicaba una reacción incompleta después de 2 h, entonces se repetía la etapa de acoplamiento una tercera vez. La desprotección se efectuó usando piperidina al 20% en DMF durante 15-20 minutos. La etapa de acoplamiento se repitió con el siguiente aminoácido hasta que se ensambló el péptido deseado en la resina. La escisión final del péptido de la resina se efectuó por tratamiento de la resina con una solución de TFA al 95% y agua al 5%. Después de agitar la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente, la resina se filtró a presión reducida y se lavó dos veces con TFA. Los filtrados se combinaron y el péptido se precipitó por adición de 400 ml de éter frío. El péptido se filtró a presión reducida y se secó para dar Fmoc-Ile-Ala-Leu-OH (pureza por HPLC del 92% por el método A). El péptido  
55 bruto se caracterizó mediante LC/MS y se usó para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

**Ejemplo 33:****60 Síntesis de Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-OH**

**[0332]** Se sintetizó un tetrapéptido (Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-OH) usando la estrategia en fase sólida con química de Fmoc convencional. Una síntesis típica usaba resina alcoxi de Wang (carga 0,60 mmol/g). Se usaron aminoácidos protegidos con Fmoc para la síntesis peptídica en fase sólida. Para una escala de péptido 1 mM en

resina, se preactivaron 3 equivalentes de aminoácidos con HBTU como agente activante durante 5 minutos antes de añadirse a la resina junto con 2 equivalentes de DIEA. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 2 h y después se lavó con DMF (25 ml x 3) y DCM (25 ml x 3). La reacción de acoplamiento se repitió usando 2 equivalentes de aminoácidos usando condiciones similares. El desarrollo de la reacción se controló usando un ensayo de ninhidrina y, si el ensayo de ninhidrina indicaba una reacción incompleta después de 2 h, entonces se repetía la etapa de acoplamiento una tercera vez. La desprotección se efectuó usando piperidina al 20% en DMF durante 15-20 minutos. La etapa de acoplamiento se repitió con el aminoácido siguiente hasta que se ensambló el péptido deseado en la resina. La escisión final del péptido de la resina se efectuó por tratamiento de la resina con una solución de TFA al 95% y agua al 5%. Después de agitar la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente, la resina se filtró a presión reducida y se lavó dos veces con TFA. Los filtrados se combinaron y el péptido se precipitó por adición de 400 ml de éter frío. El péptido se filtró a presión reducida y se secó para dar Fmoc-Ile-Ala-Leu-OH (pureza por HPLC del 92% por el método A). El péptido bruto se caracterizó por MS y se usó para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

#### 15 Ejemplo 34:

##### Síntesis de Fmoc-Ile-Ala-Leu-Dox

[0333] Se disolvió doxorubicina HCl (2,34 g, 4,03 mmol) y Fmoc-Ile-Ala-Leu-OH (2,4 g, 4,48 mmol) a temperatura ambiente en DMF anhidro (150 ml). A esta solución agitada rápidamente, se añadió DIEA (1,56 ml, 8,96 mmol) en una parte y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C usando un baño de hielo y se añadieron 1,87 g (4,92 mmol) de HATU lentamente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante otros 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadió agua helada (200 ml) a la mezcla de reacción, lo que dio como resultado la formación de un precipitado rojo. El precipitado se recogió sobre una frita gruesa, se lavó con 3 x 50 ml de agua y 3 x 50 de éter dietílico, y se secó a presión reducida para dar Fmoc-Ile-Ala-Leu-Dox (rendimiento del 89%, pureza por HPLC del 94% por el método A). Este producto se caracterizó por MS y se usó para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

#### Ejemplo 35:

30

##### Síntesis de Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox

[0334] Se disolvió doxorubicina HCl (1,43 g, 2,5 mmol) y produjo Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-OH (1,6 g, 2,6 mmol) a temperatura ambiente en DMF anhidro (150 ml). A esta solución agitada rápidamente, se añadió DIEA (1 ml, 5,7 mmol) en una parte y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C usando un baño de hielo, y se añadieron 1,07 g (2,8 mmol) de HATU lentamente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante otros 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadió agua helada (200 ml) a la mezcla de reacción, lo que dio como resultado la formación de un precipitado rojo. El precipitado se recogió sobre una frita gruesa, se lavó con 3 x 50 ml de agua y 3 x 50 de éter dietílico, y se secó a presión reducida para dar Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox (rendimiento del 88%, pureza por HPLC del 92% por el método A). Este producto se caracterizó por MS y se usó para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

#### Ejemplo 36:

##### 45 Síntesis de Suc-Ile-Ala-Leu-Dox a partir de Fmoc-Ile-Ala-Leu-Dox

[0335] A una solución de Fmoc-Ile-Ala-Leu-Dox (4,4 g, 4,13 mmol) en 20 ml de DMF seco, se añadió piperidina (20,4 ml, 206 mmol) en una parte, dando como resultado un cambio de color de rojo a morado. La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se enfrió a -20 °C usando un baño de nieve carbónica/acetona. Después se añadieron 21,2 g (210 mmol) de anhídrido succínico a la mezcla de reacción enfriada en una parte. La reacción se agitó rápidamente a -5 °C durante 5 minutos, después a temperatura ambiente durante otros 90 minutos. Se añadieron 750 ml de éter dietílico anhidro a la mezcla de reacción, lo que dio como resultado la formación de un precipitado rojo. Este precipitado se aisló en una frita de vidrio medio, se lavó con 2 x 50 ml de éter dietílico y se secó a presión reducida para dar Suc-Ile-Ala-Leu-Dox (rendimiento del 80%, pureza por HPLC del 88% por el método B). El producto final se purificó usando el método C de HPLC preparativa y se caracterizó por LC/MS, que dio un peso molecular del 939 (peso molecular esperado de 940).

#### Ejemplo 37:

##### 60 Síntesis de Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox a partir de Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox

[0336] A una solución de Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox (4 g, 3,53 mmol) en 40 ml de DMF seco, se añadió piperidina (17,4 ml, 176 mmol) en una parte, dando como resultado un cambio de color de rojo a morado. La mezcla

de reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se enfrió a -20 °C usando un baño de nieve carbónica/acetona. Después se añadieron 18 g (180 mmol) de anhídrido succínico a la mezcla de reacción enfriada en una parte. La reacción se agitó rápidamente a -5 °C durante 5 minutos, después a temperatura ambiente durante otros 90 minutos. Se añadieron 750 ml de éter dietílico anhidro a la mezcla de reacción, lo que dio como resultado la formación de un precipitado rojo. Este precipitado se aisló en una frita de vidrio medio, se lavó con 2 x 50 ml de éter dietílico y se secó a presión reducida para dar Suc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox (rendimiento del 78%, pureza por HPLC del 86% por el método B). El producto final se purificó usando el método C de HPLC preparativa y se caracterizó por LC/MS, que dio un peso molecular de 1011 (peso molecular esperado de 1012).

#### 10 Ejemplo 38:

##### Síntesis de Fmoc-βAla-Ile-Ala-Leu-OBn

15 **[0337]** El Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu (24,34 g, 0,04 mol) se añade a un matraz de fondo redondo con DMF (350 ml) y un agitador magnético. Después de disolverse el tetrapéptido, se añade bromuro de bencilo (4,76 ml, 0,04 mol), seguido de carbonato de cesio (13,04 g, 0,04 mol) a la solución con agitación. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1,5 h. Después, la mezcla de reacción se vierte lentamente a un matraz con 450 ml de agua helada. Precipita una gran cantidad de sólido blanco, que se recoge por filtración con succión. El producto se lava con agua (2 x 200 ml) y se pone en un desecador al vacío.

20

#### Ejemplo 39:

##### Síntesis de β-Ala-Ile-Ala-Leu-OBn

25 **[0338]** En un matraz de fondo redondo (25 ml), se disuelve Fmoc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-OBn (0,7 g, 1,0 mmol) en 5 ml de DMF anhidro. Se añade piperidina (1,2 ml, 12,1 mmol) a la solución y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 25 minutos. La reacción se inactiva con agua (6 ml) y se extrae con acetato de etilo (2 x 10 ml). La fase orgánica combinada se lava adicionalmente mediante agua (2 x 5 ml), salmuera (5 ml) y se seca sobre sulfato sódico. Se obtiene un sólido blanco (0,8 g) después de la eliminación del disolvente.

30

#### Ejemplo 40:

##### Síntesis de MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-OBn

35 **[0339]** En un matraz de fondo redondo (250 ml), se disuelve metil hemisuccinato (3,19 g, 24,2 mmol) en DMF anhidro (50 ml). Se añade DIEA (4,22 ml, 24,2 mmol) seguido de HBTU (9,17 g, 24,2 mmol) a la solución. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 45 minutos. A esta mezcla se añade una solución de βAla-Ile-Ala-Leu-OBn (bruto, que contenía 10,14 g, 21,3 mmol) en DMF anhidro (150 ml). La mezcla se agita continuamente a temperatura ambiente durante 2,5 h. Después, la mezcla de reacción se vierte lentamente en un matraz con 200 ml de agua helada mientras se agita. Precipita una gran cantidad de sólido blanco, que se extrae mediante acetato de etilo (3 x 40 200 ml). La fase orgánica combinada se lava adicionalmente mediante agua (2 x 200 ml), salmuera (200 ml) y se seca sobre sulfato sódico.

#### Ejemplo 41:

45

##### Síntesis de MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu

**[0340]** Se añade MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-OBn (1,0 g; 1,46 mmol) en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de metanol. Se añaden 50 ml de metanol. La solución se transfiere a un recipiente de reacción de hidrogenación. A este 50 recipiente, se añade Pd-C (90 mg, húmedo al 10%, agua al 50%; 0,042 mmol). Después de la hidrogenación durante 2 horas a temperatura ambiente, la reacción se detiene y se filtra el catalizador.

#### Ejemplo 42:

#### 55 Acoplamiento de MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu y doxorubicina usando el “método de urea”

**[0341]** En una atmósfera de nitrógeno seco, se suspenden/disuelven 26,04 g (52,0 mmol) de MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu y 23,26 g (40,2 mmol) de clorhidrato de doxorubicina en 800 ml de DMF seco saturado con urea (~30% p/v) y 19,948 ml de DIEA. Esta mezcla se enfría a 0-3 °C durante ~25 minutos. En este punto, se añaden 21,2 g (56,0 60 mmol) como una solución en ~100 ml de DMF saturado con urea durante 10 minutos (el volumen de esta solución debería mantenerse al mínimo). La mezcla de reacción se agita durante 10 minutos a de -2 a 2 °C y se vierte en 4000 ml de salmuera helada, que contiene ácido acético al 2% v/v durante aproximadamente cinco minutos con agitación enérgica. El producto se elimina por filtración en un filtro de vidrio fritado de porosidad media, se lava

generosamente con agua y se seca a presión reducida.

#### Ejemplo 43:

#### 5 Síntesis de agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox

[0342] En un matraz de fondo redondo (50 ml), se disuelve MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu (0,25 g, 0,5 mmol) y doxorubicina (0,29 g, 0,5 mmol) en DMF anhidro (20 ml). Después, la mezcla se agita durante 5 minutos, se añade DIEA (0,17 ml, 1,0 mmol) seguido de HBTU (0,19 g, 0,5 mmol) a la solución. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Se elimina el DMF mediante un evaporador rotatorio, y el residuo se recoge en 4,0 ml de cloruro de metileno:metanol 1:1. A esta solución se añade lentamente 40 ml de éter mientras se agita. Se forma un precipitado y se recoge por filtración con succión. El sólido se lava con éter (2 x 10 ml) y se seca en un desecador al vacío.

#### 15 Ejemplo 44:

#### Eliminación de doxorubicina libre de MeOSuc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox

[0343] Se pone MeOSuc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox (200 mg, 0,194 mmol), DIEA (0,068 ml, 0,388 mmol) y DMF anhidro (10 ml) en un matraz de 50 ml equipado con una barra de agitación magnética. Cuando el MeOSuc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox se había disuelto completamente, se añade resina de isocianato (390 mg, 0,582, preinchada en 5 ml de diclorometano durante 5 minutos) y la solución resultante se agita durante 2 h a temperatura ambiente con control por HPLC periódico. La mezcla de reacción se filtra después a través de una frita para eliminar la resina cuando las trazas de HPLC indican que la Dox se ha eliminado completamente. La resina se lava con 10 ml de DMF y los lavados con DMF se combinan con la mezcla de reacción filtrada. Los lavados de la mezcla de reacción filtrada se concentran después en un evaporador rotatorio equipado con una bomba de alto vacío y un baño de agua a 30 °C. El residuo se suspende en 5 ml de DMF y la solución se añade después lentamente a una solución de éter dietílico anhidro agitada rápidamente. El producto se filtra después sobre una frita y se lava con éter dietílico y se seca a presión reducida para dar MeOSuc-β-Ala-Ile-Ala-Leu-Dox.

#### 30 Ejemplo 45:

#### Hidrólisis del agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox mediante el uso de enzima entrecruzada

[0344] El agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox (1,0 g, 0,975 mmol) y 100 ml de DMF se ponen en un matraz de 500 ml. La suspensión se agita enérgicamente con un agitador magnético. Cuando el agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox se ha disuelto completamente, se añaden 400 ml de agua desionizada y la solución resultante se agita a 35 °C. Una suspensión de 1 g de la enzima inmovilizada CLEC-PC lavada (Altus Biologics) se aclara en tres alícuotas de agua desionizada, después se resuspende en 10 ml de DMF acuoso al 20% antes del uso. La suspensión resultante se agita a 35 °C con control por HPLC periódico. Cuando todo el agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox se ha consumido, la mezcla de reacción se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm para eliminar la enzima CLEC-PC. La torta de CLEC-PC se lava con 3 x 10 ml de metanol y los lavados con metanol se combinan con la mezcla de reacción filtrada. Los lavados de la mezcla de reacción filtrada más metanol se concentran después hasta una goma roja en un evaporador rotatorio equipado con una bomba de alto vacío y un baño de agua a 30 °C. La goma roja se suspende después en 50 ml de agua desionizada a temperatura ambiente y se agita rápidamente mediante un agitador mecánico. A esta suspensión se añade una solución de 77,8 mg de bicarbonato sódico (0,926 mmol, 0,95 eq.) en 100 ml de agua desionizada durante 2 minutos. La suspensión se agita a temperatura ambiente 20 minutos. La mezcla de reacción se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm y se liofiliza.

50

#### Ejemplo 46:

#### Hidrólisis del agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox mediante el uso de enzima soluble

[0345] Se suspenden 11,0 g (10,72 mmol) de agente terapéutico MeOSuc-βAla-Ile-Ala-Leu-Dox en 800 ml de agua de calidad de HPLC y se homogeneizan durante 60 minutos con un homogeneizador Ultraturax T8 para dar una suspensión finamente dividida. Esta suspensión se agita (500 rpm) a 35 °C y se ajusta a pH = 6,05 con NaHCO<sub>3</sub> acuoso 76 mM. Después se añade 1,0 g de lipasa de *C. antarctica* "B" (Altus Biologics) y la mezcla de reacción se agita a 35 °C durante 48 horas. Durante el tiempo de reacción de 48 h, el pH se mantiene entre 5,3 y 6,2 por adición periódica de NaHCO<sub>3</sub> 76 mM, y la reacción se controla periódicamente por HPLC. Después de que la reacción esté casi completa, la mezcla de reacción se ajusta entonces a pH = 7 con NaHCO<sub>3</sub> acuoso 76 mM y se filtra a través de una almohadilla de Celite 521. La mezcla de reacción aclarada se acidifica después hasta aproximadamente pH 3 con 5 ml de ácido acético glacial. El precipitado se aísla por filtración con Celite 521, aclarando posteriormente la

60

almohadilla de Celite con metanol. La solución de metanol se filtra a través de un filtro de vidrio fritado de 10-20  $\mu\text{m}$  y se seca mediante evaporación rotatoria. Este producto se convierte en la sal de sodio por disolución en 70 ml de  $\text{NaHCO}_3$  76 mM (0,95 eq.) y se liofiliza. El producto es idéntico al del Ejemplo 45.

#### 5 Ejemplo 47:

##### Hidrólisis por lipasa de *Candida antarctica* "B" inmovilizada del agente terapéutico MeOSuc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox

- 10 **[0346]** Se disuelven 30,0 g de lipasa de *Candida antarctica* "B" (Altus Biologics) en 300 ml de agua y se dializa contra 3 x 4 l de  $\text{NaHCO}_3$  acuoso 50 mM (pH = 6,4). Se ponen 360 ml de Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS de Pharmacia en un embudo fritado de vidrio grueso y se aclaran con 5 x 450 ml de HCl acuoso 1 mM helado. La Sepharose activada con NHS aclarada se combina después con la solución de enzima dializada. La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) durante 2,0 horas. El conjugado de
- 15 Sepharose/enzima se aísla después sobre un filtro de vidrio fritado grueso, y después se agita en 1000 ml de TRIS acuoso 100 mM (pH = 7,45) durante 15 minutos. Esta suspensión se filtra y se incuba con otros 1000 ml de tampón TRIS acuoso 100 mM (pH = 7,45) a 4 °C durante una noche. Por la mañana, la enzima inmovilizada se elimina por filtración y, después de lavarse con agua, se pone en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 2000 ml. Se añaden 43 g de agente terapéutico MeOSuc- $\beta$ Ala-Ile-Ala-Leu-Dox y los sólidos se suspenden en 800 ml de agua
- 20 desionizada. El matraz está equipado con un agitador por encima de la cabeza y un pH-stato ajustado para mantener el pH de la mezcla de reacción entre 5,9-6,2 por control de una bomba de jeringa. La bomba de jeringa está cargada con  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. El desarrollo de la reacción se sigue mediante HPLC. Después de que la reacción esté casi completa, la enzima inmovilizada se elimina por filtración y la fase líquida se liofiliza. Los sólidos secos se suspenden después en aproximadamente 11 ml de THF seco y se eliminan por filtración.

25

#### Ejemplo 48:

##### Síntesis a gran escala de la forma con protección N-terminal metil succinilo del agente terapéutico $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox

30

- [0347]** Se disolvieron 69,6 g de doxorrubicina HCl (120 mmol) y 100 g de MeOSuc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu (199 mmol) en DMF anhidro (10 l) en nitrógeno. Se añadió 76 ml de DIEA (434 mmol) a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente en nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió después hasta 0 °C durante 10 minutos. En un matraz separado se preparó una solución de 864 g de HATU (220 mmol) en
- 35 DMF (500 ml). La solución de HATU se añadió lentamente durante 20 minutos a la mezcla de reacción mientras que la mezcla de reacción se mantuvo a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos.

- [0348]** Se preparó una solución de NaCl (7,5 kg, al menos 30% p/v) en agua (25 l) y se enfrió a 0 °C. La mezcla de reacción se añadió después lentamente a la solución de salmuera enfriada con agitación energética durante 120
- 40 minutos. El color de la solución permaneció rojo, una solución azul hubiera indicado que el pH necesitaba de ajuste inmediato a entre 5,8-6,0 por adición de ácido acético. La temperatura se mantuvo a aproximadamente 5 °C. El precipitado rojo se eliminó por filtración sobre un filtro de vidrio fritado de porosidad media, se lavó con agua y se secó a presión de vacío sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  para dar 115 g de MeOSuc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox.

#### 45 Ejemplo 49:

##### Tratamiento de MeOSuc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox con perlas de Ps-isocianato para eliminar trazas de doxorrubicina

- 50 **[0349]** Se disolvieron 146,4 g de perlas de PS-isocianato (240 mmol; suministrado por Argonaut Lab, San Carlos, CA) en 1,5 litros de DMF anhidro y se dejó que se hincharan durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Las perlas hinchadas se filtraron a través de un embudo fritado de vidrio y se lavaron con 500 ml adicionales de DMF anhidro. Se disolvieron 115 g de MeOSuc- $\beta$ Ala-Leu-Ala-Leu-Dox (112 mmol) en 1000 ml de DMF anhidro y se añadieron 2,1 ml de DIEA (12 mmol) seguido de las perlas de PS-isocianato hinchadas. La mezcla de reacción se
- 55 agitó a temperatura ambiente y se controló usando HPLC hasta que la cantidad del pico de doxorrubicina era inferior al 0,1%. Esto lleva de 2 a 12 h dependiendo del tamaño del lote. Se realizaron análisis de HPLC analítica usando una Columna Water 2690: Waters Symmetry Shield  $\text{C}_8$  3,5  $\mu\text{m}$  M 4,6 x 150 mm (n° cat. WAT094269), disolvente: A-formiato de amonio acuoso 20 mM al 80% (pH = 4,5) acetonitrilo al 20%, disolvente: B-formiato de amonio acuoso 20 mM al 20% (pH = 4,5). Temperatura de columna: temperatura ambiente controlada, temperatura de muestra: 4
- 60 °C, tiempo de procesamiento: 37,5 minutos, detector: 254 nm, caudal: 1,0 ml/min, cantidad de inyección 10  $\mu\text{g}$  (0,5 mg/ml x 0,02 ml), fase móvil A y B. Gradiente: gradiente lineal de 37,5 minutos de fase móvil A al 100% a fase móvil B al 100% con un retraso de equilibrado de 7,5 minutos.

- [0350]** A las seis horas la cantidad del pico de doxorrubicina era inferior al 0,1%, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado grueso para eliminar las perlas. Se preparó una solución de salmuera (al menos 30% p/v) de 1,1 kg de NaCl en 3,5 l de agua y se enfrió a 0 °C. La mezcla de reacción filtrada se añadió después lentamente a la solución de salmuera enfriada con agitación enérgica durante 45 minutos. El color de la solución permaneció rojo, una solución azul hubiera indicado que el pH necesitaba de ajuste inmediato a entre 5,8-6,0 por adición de ácido acético. El precipitado rojo se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado medio, se lavó con agua y se secó a presión de vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para dar MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox libre de cualquier doxorrubicina residual.
- 10 **[0351]** El MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox se disolvió en 1 l de MeOH y la solución de metanol se añadió después lentamente a 14 l de éter etílico enfriado con agitación enérgica durante 60 minutos. El precipitado rojo se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado medio, se lavó con éter (1 l) y se secó a presión de vacío para dar 110 g de MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. Se determinó que la pureza era del 96,5% por HPLC, como se ha descrito en el Ejemplo 37. MS *m/z* calc. para C<sub>50</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub> 1025, encontrada 1048 (M<sup>+</sup>+Na).

15 **Ejemplo 50:**

#### Hidrólisis enzimática de MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox para dar Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox

- 20 **[0352]** La enzima CLEC-CAB (Lipasa de *Candida antartica* "B") se adquirió (en Altus Biologics., Boston, MA) en forma de solución, en la que la concentración de la enzima está definida por el peso de enzima seca por mililitro de solución. La suspensión de enzima bruta se agitó durante unos pocos minutos para obtener una solución homogénea. 504 ml (328 mmol) de esta solución homogénea se dividieron en alícuotas en un matraz. Se añadieron 2,5 l de agua desionizada y la suspensión se agitó durante 10 minutos usando un agitador magnético. La solución de enzima se filtró usando un embudo fritado de vidrio grueso sin llevar la enzima a sequedad. La enzima se transfirió de nuevo a un matraz. La enzima se suspendió en agua y se filtró tres veces más.

- 25 **[0353]** La torta de enzima se resuspendió en 550 ml de agua desionizada y se transfirió a un matraz RB. A esta suspensión se añadieron 109 g de MeOSuc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox (106 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (25 °C). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo entre 5,8 y 6,1 mediante un pH-stato equipado con una bomba de jeringa cargada con una solución de NaHCO<sub>3</sub> 1 N. El desarrollo de la reacción se siguió con control por HPLC periódico, como se ha descrito en el Ejemplo 49. Después de 24 horas, la reacción parece estar completa al 94%, según se determinó por HPLC.

- 35 **[0354]** Para acelerar la reacción, era necesaria enzima CLEC después de 24 horas. 168 ml de la enzima CLEC (solución homogénea) se lavaron en un formato de columna como se ha descrito anteriormente. La torta de enzima se resuspendió en 1,1 l de agua desionizada y se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente con control por HPLC periódico y el pH se mantuvo entre 5,8 y 6,1. Después de 60 horas, la reacción era completa al 99,9%, según se controló por HPLC.

- 40 **[0355]** La enzima CLEC se eliminó de la mezcla de reacción por filtración a través de un filtro de 0,2 μM y se aclaró con 500 ml de agua desionizada. Después, el filtrado se liofilizó para dar 95,2 g de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox.Na, rendimiento físico del 87 %, MS *m/z* calc. para C<sub>49</sub>H<sub>65</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub> 1011, encontrada 1034 (M<sup>+</sup>+Na).

- 45 **[0356]** El compuesto de profármaco, Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox, se caracterizó completamente mediante análisis del espectro de masas, FTIR, NMR.

- 50 **[0357]** El análisis del espectro de masas de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox muestra claramente la presencia del pico de ión molecular (*m/z*) a 1034 (M<sup>+</sup> +Na) que coincide con el *m/z* calculado para Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox (C<sub>49</sub>H<sub>65</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub>Na) a 1033.

**[0358]** La muestra de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox también se analizó por FITR. El espectro coincidía con el de un patrón de referencia del material anterior. Las asignaciones para las absorciones principales eran las siguientes:

Hidroxilo	3379 cm <sup>-1</sup>
C-H	3000-2700
Carbonilos	1650-1725

- 55 **[0359]** Finalmente, la muestra se analizó por NMR. Los desplazamientos químicos y asignaciones se enumeran en la **Tabla 31** y se ilustran en la **FIG. 28**. Hay tres carbonos en la región de cetona, a 215,2, 187,7, 187,4 ppm, que concuerdan con la estructura de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu-Dox. Los dos últimos tienen desplazamientos químicos similares, así que se asignan a (2) y (3), a 187,7 y 187,4 ppm. La cetona restante es por lo tanto (1). Surgen pruebas adicionales de estas asignaciones de los espectros HMQC y HMBC; ninguno de estos tres muestra ningún pico de

HMQC, así que no están protonados, y sólo (1) tiene un acoplamiento C-H de largo alcance (HMBC), con el protón a 4,77 ppm, que es un singlete de dos protones, que es por lo tanto (4). A partir del espectro de HMQC, el carbono a 65,7 ppm está unido a estos protones.

- 5 **[0360]** La señal de  $^1\text{H}$  NMR a 3,96 ppm tiene el desplazamiento químico y el área de un grupo metoxi; estos protones están acoplados con el carbono a 57,2 ppm y se asignan al único metoxi en la estructura (5). El desplazamiento químico  $^{13}\text{C}$  también concuerda con un metoxi. El acoplamiento C-H de largo alcance de los protones es con el carbono a 162,3 ppm, que debe ser (6).
- 10 **[0361]** El espectro de HMQC muestra que hay tres carbonos aromáticos protonados a 120,5, 120,3 y 137,2 ppm; los protones aromáticos no mostraban ningún acoplamiento C-H de largo alcance ni ningún acoplamiento entre protones adyacentes. Las señales de protones aromáticos son muy amplias, indicando un tiempo de relajación  $T_2$  corto, que explica la ausencia de cualquier acoplamiento observado. Dada esta ausencia de acoplamiento, no es posible asignar estos tres sitios de forma única, y se asignan en conjunto a (7), (8) y (9).
- 15 **[0362]** Los dos carbonos aromáticos no protonados a 157,2 y 156,1 ppm tienen desplazamientos químicos que concuerdan con (10) y (11), es decir, carbonos aromáticos unidos a oxígeno. No se observa ningún acoplamiento de largo alcance.
- 20 **[0363]** Las señales de  $^{13}\text{C}$  NMR a 112,3 y 112,0 ppm concuerdan con carbonos aromáticos orto respecto a la sustitución de oxígeno, y se asignan a (12) y (13). La señal de  $^{13}\text{C}$  NMR a 121,3 también muestra este efecto, así que se asigna a (14). Los tres carbonos aromáticos no protonados restantes se asignan a los últimos tres carbonos en la región, (15), (16) y (17).
- 25 **[0364]** La ausencia de cualquier acoplamiento C-H de largo alcance con cualquiera de los carbonos aromáticos es inesperada, e indica que el acoplamiento es muy pequeño o inexistente debido a tiempos de relajación  $T_2$  cortos o a una configuración planar.
- [0365]** Hay seis carbonos de carbonilo a de 181 a 174 ppm; de estos, el que está a 180,6 ppm es el único con un desplazamiento químico que concuerda con una sal de sodio, así que se asigna a (18). El pico muestra acoplamiento C-H de largo alcance con los protones a 2,4 ppm, que no están resueltos. Los cinco carbonos de carbonilo restantes están todos dentro de un intervalo de desplazamiento químico de una ppm y no son posibles (19), (20), (21), (22), (23).
- 30 **[0366]** El carbono a 102,3 ppm tiene un desplazamiento químico que concuerda con un carbono unido a dos oxígenos separados, así que debe ser (24). Este tiene un acoplamiento C-H de largo alcance con el protón 1,74 ppm, que se asigna a (25). Este protón está acoplado con el carbono a 30,6 ppm. De los carbonos en la región C-O (de 80 a 60 ppm), sólo uno está protonado, a 77,4 ppm, así que debe ser (26). Este no tiene un acoplamiento C-H de largo alcance ni con el protón ni con el carbono.
- 35 **[0367]** Hay tres carbonos no asignados todavía en la región de 80 a 60 ppm, todos metinas unidas a oxígeno. Tienen desplazamientos químicos similares (71,2, 69,9 y 68,8 ppm), pero parece claro que el carbono a 68,8 ppm muestra un acoplamiento de largo alcance con el metilo en (28). El carbono a 69,9 también muestra un acoplamiento de largo alcance con el metilo en (28), así que debe ser adyacente a (27), y se asigna a (29). La metina restante es por lo tanto (30).
- 40 **[0368]** El protón a 3,6 ppm (29) muestra un acoplamiento C-H de largo alcance con un solo carbono a 47,3 ppm. El único carbono no asignado adyacente debe ser (31). Los protones de (31) se superponen con otros protones y no son posibles correlaciones de largo alcance.
- 45 **[0369]** Los cuatro metilos restantes están en la región de isopropilo, y uno está a 1,25/1,34 ppm y debe corresponder al último metilo restante, (32). Los protones de este metilo muestran un acoplamiento de largo alcance con un solo carbono, a 51,3 ppm, que debe ser (33). Los protones de (33) se superponen gravemente con otros protones y no pueden usarse para ninguna correlación de largo alcance.
- 50 **[0370]** Los cuatro metilos restantes deben surgir de los isopropil metilos, en su conjunto etiquetados (34). Los protones de (34) muestran un acoplamiento de largo alcance entre los metilos emparejados y con los carbonos a 25,9/25,8 y 41,6/41,7 ppm; las metinas se asignan (35)/(36) y los metilenos (37)/(38). Todos estos protones se superponen a de 1,5 a 1,8 ppm, pero muestran un acoplamiento de largo alcance con las metinas a 54,7/53,5 ppm, que deben ser las adyacentes a las amidas y están asignadas (39)/(40).
- 55 **[0371]** Los cinco carbonos restantes, todos metilenos, muestran un acoplamiento de largo alcance con carbonilos, así que deben ser adyacentes a los mismos y están asignados (41), (42) y (43); los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  NMR se superponen todos a 2,4 ppm y se corresponden con los carbonos a 37,2, 34,4 y 33,8 ppm. Puesto que el
- 60

carbono a 37,2 es la mayor diferencia, se asigna al carbonilo de la sal de sodio (41), y los otros dos a los carbonilos de amida (42), (43). Los dos metileno restantes son demasiado similares para una asignación específica (44), (45).

**[0372]** Hay un sitio sin asignar. Hay treinta protones en la región de 5,5 a 1,5 ppm, lo que concuerda con la estructura, incluyendo este sitio asignado. Por lo tanto, es probable que la señal del carbono esté oculta bajo la señal de disolvente a aproximadamente 50 ppm, lo que concordaría con metileno adyacente a un nitrógeno.

**TABLA 31**  
Desplazamientos químicos  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  HMOC para  $^1\text{H}$  Asignación

215,2		1
187,7		2/3
187,4		2/3
180,6		18
176,1		19-23
175,8		19-23
175,4		19-23
175,2		19-23
174,1		19-23
162,3		6
157,2		10/11
156,1		10/11
137,2	7,68	7/8/9
136,1		15/16/17
135,6		15/16/17
135		15/16/17
121,3		14
120,5	7,68	7/8/9
120,3	7,42	7/8/9
112,3		12/13
112		12/13
102,3	5,34	24
77,4		26
71,2	4,97	30
69,9	3,6	29
68,8	4,24	27
65,7	4,77	4
57,2	3,96	5
54,7	4,24	39/40
53,5	4,32	39/40
51,3	4,24	33
47,3	4,15/4,12	31
41,6	1,6	35/36
41,5	1,6	35/36
37,2	2,4	41
37	3,45	44/45
34,4	2,4	42/43
34	3-2,7	44/45
33,8	2,4	42/43
30,6	1,75	25
25,9	1,6	37/38
25,8	1,6	37/38
23,5	0,9	34
23,3	0,9	34

Desplazamientos químicos <sup>13</sup> C y <sup>1</sup> H	HMOc para <sup>1</sup> H	Asignación
22,1	0,9	34
21,7	0,9	34
17,4	1,35/1,34	32
17,5	1,29/1,27	28

LISTA DE SECUENCIAS

[0373]

- 5 <110> MEDAREX, INC.
- <120> Compuestos de profármacos activados por CD10
- 10 <130> AHB/FP6196349
- <140> EP 02746852.9
- <141> 11-06-2002
- 15 <150> PCT/US02/21135
- <151> 11-06-2002
- <150> US 60/297.596
- <151> 11-06-2001
- 20 <160> 126
- <170> PatentIn versión 3.1
- 25 <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Sintetizada químicamente
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 35 <222> (1)..(1)
- <223> Beta-alanina
- <400> 1
- 40 Xaa Ile Ala Phe
- 1
- <210> 2
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
- <223> Sintetizada químicamente
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 50 <222> (1)..(1)
- <223> Beta-alanina
- <400> 2

**Xaa Ile Ala Ile**  
**1**

5 <210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico

15 <400> 3

**Xaa Ile Ala Leu**  
**1**

20 <210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> 2-Tienilalanina

30 <400> 4

**Xaa Ile Ala Leu**  
**1**

35 <210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> 2-Naftilalanina

45 <400> 5

**Xaa Ile Ala Leu**  
**1**

50 <210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido 4-(aminometil)benzoico

10 <400> 6

**Xaa Ile Ala Leu  
 1**

<210> 7  
 <211> 4  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

25

<400> 7

**Xaa Ile Ala Leu  
 1**

<210> 8  
 <211> 4  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina

40

<400> 8

**Xaa Ile Ala Leu  
 1**

<210> 9  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 2-Tienilalanina

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico  
 5  
 <400> 9  
  
 Xaa Ile Xaa Leu  
 1  
  
 <210> 10  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 2-Naftilalanina  
 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico  
 25  
  
 <400> 10  
  
 Xaa Ile Xaa Leu  
 1  
  
 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina  
 40  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico  
 45  
  
 <400> 11  
  
 Xaa Ile Xaa Leu  
 1  
  
 <210> 12  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 55

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Ácido 4-(aminometil)benzoico

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

<400> 12

**Xaa Ile Xaa Leu  
 1**

15 <210> 13  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

<400> 13

**Xaa Ile Xaa Leu  
 1**

35 <210> 14  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina

<400> 14

**Xaa Ile Gly Phe  
 1**

50  
 55 <210> 15  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Beta-alanina  
  
 <400> 15  
  
 Xaa Ile Gly Ile  
 1  
  
 10 <210> 16  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico  
  
 <400> 16  
  
 Xaa Ile Gly Leu  
 1  
  
 25 <210> 17  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> 2-Tienilalanina  
  
 <400> 17  
  
 Xaa Ile Gly Leu  
 1  
  
 40 <210> 18  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 2-Naftilalanina  
  
 55 <400> 18

Xaa Ile Gly Leu  
1

5 <210> 19  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Beta-alanina

15 <400> 19

Xaa Ile Gly Leu  
1

20 <210> 20  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Ácido 4-(aminometil)benzoico

<400> 20

Xaa Ile Gly Leu  
1

35 <210> 21  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Ácido aminoisobutírico

<400> 21

Xaa Ile Gly Leu  
1

50 <210> 22  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

55

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Beta-alanina

<400> 22

**Xaa Ile Thr Ile**  
**1**

10

<210> 23  
<211> 4  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Beta-alanina

25 <400> 23

**Xaa Ile Tyr Ile**  
**1**

<210> 24  
<211> 4  
30 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

35

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Beta-alanina

40

<400> 24

**Xaa Ile Ala Gly**  
**1**

<210> 25  
45 <211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

50

<400> 25

**Ile Ala Leu**  
**1**

55 <210> 26

<211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (2)..(2)  
 <223> N-metil-alanina

<400> 26

**Ile Xaa Leu**  
1

15 <210> 27  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 27

**Ile Ala Phe**  
1

25 <210> 28  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

35 <400> 28

**Ile Ala Ile**  
1

<210> 29  
 <211> 3  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

50 <400> 29

**Ile Xaa Leu**  
1

55 <210> 30  
 <211> 3

	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
	<400> 30	
		<b>Ile Gly Phe</b>
		1
10	<210> 31	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
	<400> 31	
		<b>Ile Gly Ile</b>
		1
20	<210> 32	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
	<400> 32	
		<b>Ile Gly Leu</b>
		1
30	<210> 33	
	<211> 3	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
40	<400> 33	
		<b>Ile Thr Ile</b>
		1
	<210> 34	
	<211> 3	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
50	<400> 34	

Ile Ala Gly  
1

5 <210> 35  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Beta-alanina

15 <400> 35

Xaa Ile Tyr Leu  
1

20 <210> 36  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Beta-alanina

30 <400> 36

Xaa Ile Tyr Gly  
1

35 <210> 37  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-beta-alanina

45 <400> 37

Xaa Ile Ala Leu  
1

50 <210> 38  
<211> 4  
<212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Metil-succinil-beta-alanina  
 10  
 <400> 38

**Xaa Ile Ala Leu**  
**1**

<210> 39  
 15 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 25 <223> Succinil-beta-alanina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 30 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 39

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

35 <210> 40  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 40

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

55 <210> 41

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 41

**Xaa Leu Ala Xaa**  
**1**

20 <210> 42  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-isoleucina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 42

**Xaa Ala Xaa**  
**1**

40 <210> 43  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-leucina  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

<400> 43

**Xaa Tyr Xaa**  
**1**

5 <210> 44  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
15 <222> (1)..(1)  
<223> Succinil-beta-alanina

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
20 <222> (4)..(4)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 44

**Xaa Leu Tyr Xaa**  
**1**

25 <210> 45  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
35 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> Succinil-leucina

<220>  
40 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (3).. (3)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 45

**Xaa Ala Xaa**  
**1**

45  
50 <210> 46  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-leucina

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Glicina-doxorrubicina

<400> 46

**Xaa Ala Xaa**  
**1**

10

<210> 47  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

30 <400> 47

**Xaa Leu Ala Xaa**  
**1**

<210> 48  
 <211> 4  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina

45 <400> 48

**Xaa Leu Ala Leu**  
**1**

<210> 49  
 <211> 4  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 55 <223> Sintetizada químicamente

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina  
 5  
 <400> 49  
  
**Xaa Leu Ala Leu**  
**1**  
  
 <210> 50  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 15  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-alanina  
 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina  
 25  
  
 <400> 50  
  
**Xaa Leu Ala Xaa**  
**1**  
  
 <210> 51  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 35  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> p-Glutamato  
 40  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 45  
  
 <400> 51  
  
**Xaa Ala Leu Ala Xaa**  
**1 5**  
  
 <210> 52  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
  
 <220>  
 55

<223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

<400> 52

**Xaa Leu Ala Xaa**  
 1

15 <210> 53  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-Leucina

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

<400> 53

**Xaa Ala Leu Ala Xaa**  
 1 5

35 <210> 54  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-Leucina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-alanina

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

<400> 54

Xaa Xaa Leu Ala Xaa  
1 5

5 <210> 55  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetil-histidina

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Glutamina-doxorrubicina

<400> 55

Xaa Ser Ser Lys Leu Xaa  
1 5

25 <210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Morfolinocarbonil-histidina

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 56

Xaa Ser Ser Lys Leu Gln Xaa  
1 5

45 <210> 57  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)  
 <223> N-(2-hidroxipropil)metacrilamida-glicina  
  
 <220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Glicina-doxorrubicina  
  
 <400> 57  
  
 Xaa Phe Leu Xaa  
 1  
  
 10  
  
 <210> 58  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-glutaril-(4-hidroxiprolil)-alanina  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilglicina  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
  
 35 <400> 58  
  
 Xaa Ser Xaa Gln Ser Xaa  
 1 5  
  
 <210> 59  
 <211> 4  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N-Cbz-Glicina  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
  
 55 <400> 59

**Xaa Phe Ala Xaa**  
**1**

- <210> 60
- <211> 4
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizada químicamente
- 10 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> N-Cbz-Glicina
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> Leucina-PABC-doxorrubicina
- 20 <400> 60

**Xaa Phe Ala Xaa**  
**1**

- <210> 61
- <211> 4
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizada químicamente
- 30 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Succinil-beta-alanina
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> Leucina-daunorrubicina
- 40 <400> 61

**Xaa Leu Ala Xaa**  
**1**

- <210> 62
- 45 <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> Sintetizada químicamente
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- 55 <223> Succinil-beta-alanina
- <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

5 <400> 62

Xaa Ile Ala Xaa  
 1

<210> 63  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <400> 63

15

Phe Phe Gly Phe Leu Ala  
 1 5

<210> 64  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <400> 64

25

Tyr Gly Gly Phe Leu  
 1 5

<210> 65  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <400> 65

35

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido piroglutámico

50

<400> 66

Xaa Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
 1 5 10

5 <210> 67  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <400> 67

Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe  
 1 5

15 <210> 68  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sustrato fluorogénico sintetizado químicamente

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Dansilo-D-alanina

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> pN02-fenilalanina

<400> 68

Xaa Gly Xaa Gly  
 1

35 <210> 69  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-éster bencílico

<400> 69

**Xaa Ile Ala Xaa  
1**

5 <210> 70  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

<400> 70

**Xaa Ile Ala Leu  
1**

20 <210> 71  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Alil-succinil-beta-alanina

<400> 71

**Xaa Ile Ala Leu  
1**

35 <210> 72  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Alil-succinil-beta-alanina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

<400> 72

Xaa Ile Ala Xaa  
1

5 <210> 73  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-metionina

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 73

Xaa Ala Xaa  
1

25 <210> 74  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-fenilalanina

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 74

Xaa Ala Xaa  
1

45 <210> 75  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-beta-alanina

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-pNA  
 <400> 75

Xaa Leu Ala Xaa  
 1

10 <210> 76  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 76

Xaa Leu Ala Xaa  
 1

30 <210> 77  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4).. (4)  
 <223> Fenilalanina-daunorrubicina  
 <400> 77

Xaa Ile Ala Xaa  
 1

50 <210> 78  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Isoleucina-daunorrubicina

<400> 78

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

15 <210> 79  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido succinil-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4).. (4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

35 <400> 79

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

<210> 80  
 <211> 4  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-2-tienilalanina

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

55 <400> 80

**Xaa Ile Ala Xaa**  
1

- 5 <210> 81
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> Sintetizada químicamente
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Succinil-2-naftilalanina
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> Leucina-daunorrubicina
  
- <400> 81

**Xaa Ile Ala Xaa**  
1

- 25 <210> 82
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 30 <220>
- <223> Sintetizada químicamente
  
- 35 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Succinil-beta-alanina
  
- 40 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> Leucina-daunorrubicina
  
- <400> 82

**Xaa Ile Ala Xaa**  
1

- 45 <210> 83
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 50 <220>
- <223> Sintetizada químicamente
  
- 55 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Ácido succinil-4-(aminometil)benzoico

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina  
 <400> 83

Xaa Ile Ala  
 I

10 <210> 84  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido succinil-aminoisobutírico

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina  
 <400> 84

Xaa Ile Ala Xaa  
 I

30 <210> 85  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 85

Xaa Ile Ala Xaa  
 I

50 <210> 86  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-2-tienilalanina

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

<400> 86

**Xaa Ile Xaa Xaa  
 1**

20 <210> 87  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-2-naftilalanina

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

<400> 87

**Xaa Ile Xaa Xaa  
 1**

45 <210> 88  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina

10 <400> 88

**Xaa Ile Xaa Xaa  
1**

<210> 89  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido succinil-4-(aminometil)benzoico

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

35 <400> 89

**Xaa Ile Xaa Xaa  
1**

<210> 90  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Ácido succinil-aminoisobutírico

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ácido aminoisobutírico

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)

<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 90

**Xaa Ile Xaa Xaa  
1**

5

<210> 91

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<220>

15

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Succinil-beta-alanina

<220>

20

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Fenilalanina-daunorrubicina

<400> 91

**Xaa Ile Gly Xaa  
1**

25

<210> 92

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<220>

35

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Succinil-beta-alanina

<220>

40

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Isoleucina-daunorrubicina

<400> 92

**Xaa Ile Gly Xaa  
1**

45

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<220>

55

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Ácido-succinil-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (4)..(4)

<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 93

Xaa Ile Gly Xaa  
1

10

<210> 94

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Succinil-2-tienilalanina

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 94

Xaa Ile Gly Xaa  
1

30

<210> 95

<211> 4

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizada químicamente

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Succinil-2-naftilalanina

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Leucina-daunorrubicina

50

<400> 95

Xaa Ile Gly Xaa  
1

<210> 96

<211> 4

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-beta-alanina

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 96

Xaa Ile Gly Xaa  
1

20 <210> 97  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Ácido succinil-4-(aminometil)benzoico

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 97

Xaa Ile Gly Xaa  
1

40 <210> 98  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sintetizada químicamente

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Ácido succinil-aminoisobutírico

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-daunorrubicina

<400> 98

**Xaa Ile Gly Xaa**  
**1**

5 <210> 99  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Isoleucina-daunorrubicina

<400> 99

**Xaa Ile Thr Xaa**  
**1**

25 <210> 100  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Isoleucina-daunorrubicina

<400> 100

**Xaa Ile Tyr Xaa**  
**1**

45 <210> 101  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)

<223> Succinil-beta-alanina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-daunorrubicina  
 <400> 101

**Xaa Ile Tyr Xaa**  
**1**

10 <210> 102  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-beta-alanina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Glicina-doxorrubicina  
 <400> 102

**Xaa Ile Tyr Xaa**  
**1**

30 <210> 103  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Succinil-isoleucina

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

50 <400> 103

**Xaa Ala Xaa**  
**1**

<210> 104  
 <211> 3  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> N-metil-alanina

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-isoleucina

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Leucina-doxorrubicina

<400> 104

**Xaa Xaa Xaa**  
**1**

20

<210> 105  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

30

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Succinil-isoleucina

35

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> N-metil-alanina

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Leucina-doxorrubicina

45

<400> 105

**Xaa Xaa Xaa**  
**1**

50

<210> 106  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> Sintetizada químicamente

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)

<223> Succinil-leucina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> N-metil-alanina  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 106  
 Xaa Xaa Xaa  
 1  
 15 <210> 107  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 <220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Succinil-isoleucina  
 <220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
 <400> 107  
 Xaa Pro Xaa  
 1  
 35 <210> 108  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Succinil-leucina  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Glicina-doxorrubicina  
 55 <400> 108  
 Xaa Tyr Xaa  
 1

<210> 109  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente  
 <400> 109  
**aagcttgcgg ccaccalggg caagtcagaa agtcagatg 39**  
 10  
 <210> 110  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente  
 <400> 110  
**tctagaaggg aggccaaagtc gaggttggtc 30**  
 20  
 <210> 111  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente  
 30  
 <400> 111  
**lctagagall actatgaatg cactggatc 30**  
 <210> 112  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente  
 40  
 <400> 112  
**ctcgagglac tcatattca gtttllatc 30**  
 45  
 <210> 113  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente  
 <400> 113  
**ctcgagtlga actacaaga agalgaatac 30**  
 55  
 <210> 114  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador sintetizado químicamente

<400> 114  
**tttaattaatc accaaaccocg gcacttcctt tc 32**

5 <210> 115  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 9-flourenilmetiloxicarbonil-isoleucina

<400> 115  
**Xaa Ala Leu  
 1**

20 <210> 116  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 9-Flourenilmetiloxicarbonil-isoleucina

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

<400> 116  
**Xaa Ala Xaa  
 1**

40 <210> 117  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 9-Flourenilmetiloxicarbonil-beta-alanina

<400> 117

**Xaa Ile Ala Leu  
1**

- 5 <210> 118  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Sintetizada químicamente
- 15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-beta-alanina
- 20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-doxorrubicina
- <400> 118

**Xaa Ile Ala Xaa  
1**

- 25 <210> 119  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>  
<223> Sintetizada químicamente
- 35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1).. (1)  
<223> 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-beta-alanina
- 40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-OBn
- <400> 119

**Xaa Ile Ala Xaa  
1**

- 45 <210> 120  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> Sintetizada químicamente
- <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-OBn

10 <400> 120

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

<210> 121  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina

25 <400> 121

**Xaa Ile Ala Leu**  
**1**

<210> 122  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina

45

<400> 122

**Xaa Ile Ala Xaa**  
**1**

<210> 123  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Sintetizada químicamente

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina  
  
 <400> 123  
  
**Xaa Leu Ala Leu**  
**1**  
  
 10 <210> 124  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Metil-hemisuccinil-beta-alanina  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (4)..(4)  
 <223> Leucina-doxorrubicina  
  
 <400> 124  
  
**Xaa Leu Ala Xaa**  
**1**  
  
 30 <210> 125  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Beta-alanina  
  
 <400> 125  
  
**Xaa Leu Ala Leu**  
**1**  
  
 45 <210> 126  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55

<222> (1)..(1)  
<223> Alil-succinil-beta-alanina

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Leucina-doxorrubicina  
  
<400> 126

Xaa Ile Ala Xaa  
1

10

## REIVINDICACIONES

1. Un método de diseño de un profármaco *in vitro*, comprendiendo el método:

5 (1) proporcionar un oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ , en la que:

n y m son números enteros,

$AA^{P2}$  representa cualquier aminoácido,

$AA^{P1}$  representa cualquier aminoácido,

10  $AA^{P1'}$  representa cualquier aminoácido, y

cada AA representa independientemente un aminoácido,

(2) unir el oligopéptido en un primer sitio de unión del oligopéptido a un grupo estabilizante que obstaculice la escisión del oligopéptido por enzimas presentes en sangre completa;

15

en el que el grupo estabilizante se selecciona entre: ácido succínico, ácido adípico, ácido glutárico, ácido ftálico, ácido diglicólico, ácido fumárico, ácido naftaleno dicarboxílico, ácido piroglutámico, ácido acético, ácido 1- o 2-naftilcarboxílico, ácido 1,8-naftildicarboxílico, ácido aconítico, ácido carboxicinámico, ácido triazol dicarboxílico, ácido glucónico, ácido 4-carboxifenil borónico, ácido polietilen glicólico, ácido butano disulfónico, ácido maleico, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, y está unido al extremo N-terminal,

20

o entre:

beta-alanina, ácido tiazolidin-4-carboxílico, 2-tienilalanina, 2-naftilalanina, D-alanina, D-leucina, D-metionina, D-fenilalanina, ácido 3-amino-3-fenilpropiónico, ácido gamma-aminobutírico, ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico,

25

ácido tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico, 4-aminometilbenzoico y ácido aminoisobutírico; y

(3) unir directa o indirectamente el oligopéptido a un agente terapéutico en un segundo sitio de unión del oligopéptido,

30

en el que las etapas (2) y (3) pueden realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo, y en el que además se forma un conjugado por realización de las etapas (1) a (3),

(4) ensayar si el conjugado es escindible por CD 10 y PSA; y

35

(5) seleccionar el conjugado como profármaco si: (i) la escisión del conjugado es superior al 10% por hora tras la incubación del conjugado y la enzima CD10 en condiciones experimentales que sirvan de modelo de las condiciones fisiológicas; y (ii) la velocidad de escisión por PSA no es superior al 15% de la velocidad de escisión de Suc-βAla-Leu-Ala-Leu conjugado por el extremo carboxilo terminal con el mismo agente terapéutico que el conjugado.

40

2. El método de la reivindicación 1, en el que n es de 0 a 3, m es de 0 a 3 y  $m + n$  no es más de 3, del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$ .

3. El método de la reivindicación 1, en el que  $AA^{P1}$  del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  se selecciona entre el grupo que consiste en arginina, alanina, glicina, leucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, glutamina, valina y serina.

45

4. El método de la reivindicación 1, en el que  $AA^{P1'}$  del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  se selecciona entre el grupo que consiste en leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, tirosina y prolina.

50

5. El método de la reivindicación 1, en el que  $AA^{P1}-AA^{P1'}$  del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  se selecciona entre el grupo que consiste en Arg-Leu, Gly-Trp, Arg-Ile, Arg-Phe, Arg-Val, Ala-Phe, Asp-Phe, Ala-Leu, Gly-Phe, Gly-Leu, Leu-Phe, Leu-Tyr, Met-Leu, Pro-Phe, Pro-Tyr, Pro-Leu, Phe-Leu, Phe-Phe, Tyr-Ile, Tyr-Pro, Tyr-Leu, Gln-Phe, Val-Tyr, Val-Phe y Ser-Leu.

55

6. El método de la reivindicación 1, en el que el oligopéptido incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en βAla-Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, βAla-Ile-Ala-Leu, Leu-Ala-Leu, Met-Ala-Leu y Phe-Ala-Leu.

60

7. El método de la reivindicación 1, en el que  $AA^{P1'}$  del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  es un aminoácido hidrófobo.

8. El método de la reivindicación 1, en el que  $AA^{P2}$  del oligopéptido de fórmula  $(AA)_n-AA^{P2}-AA^{P1}-AA^{P1'}-(AA)_m$  es un aminoácido hidrófobo.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en agentes alquilantes, agentes antiproliferativos, agentes de unión a tubulina, alcaloides de la vinca, enediinas, podofilotoxinas, la familia de fármacos de la pteridina, taxanos, antraciclinas, dolastatinas, inhibidores de la topoisomerasa, maitansinoides y agentes quimioterápicos de complejos de platino.

5

10. El método de la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en doxorubicina, daunorrubicina, vinblastina, vincristina, caliqueamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretastatina, fosfato de combretastatina A<sub>4</sub>, dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecán, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, halicondrina B, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, bleomicina, melfalán, cloroquina, ciclosporina A, maitansina, un derivado de cualquiera de los anteriores y un análogo de cualquiera de los anteriores.

15

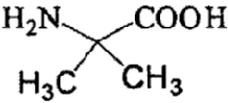
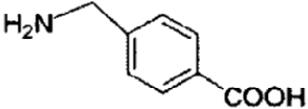
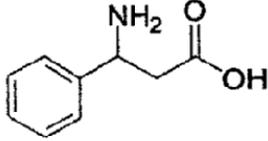
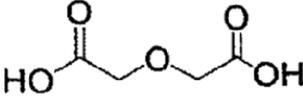
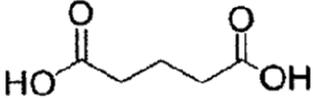
Símbolo	Nombre	Estructura
Aib	Ácido aminoisobutírico	
Amb	Ácido 4-(aminometil)benzoico	
APP	Ácido 3-amino-3-fenilpropiónico	
Dg	Ácido diglicólico	
GI	Ácido glutámico	

FIG. 1A

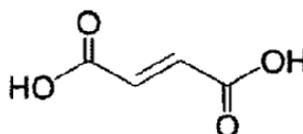
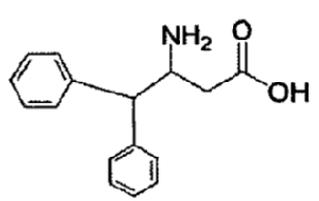
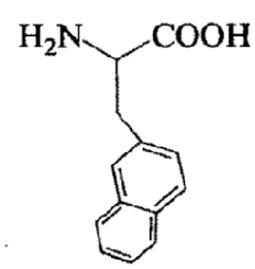
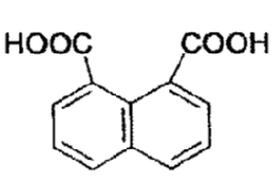
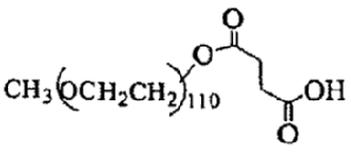
Símbolo	Nombre	Estructura
Mal	Ácido maleico	
NAA	Ácido 3-amino-4,4-difenilbutírico	
Nal	2-naftilamina	
Naph	Ácido 1,8-naftalendicarboxílico	
PEG	Hemisuccinil éster de polietilenglicol5000	

FIG. 1B

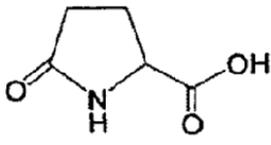
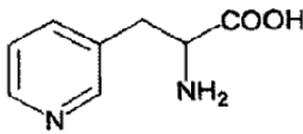
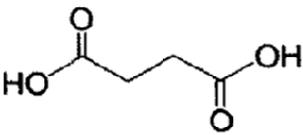
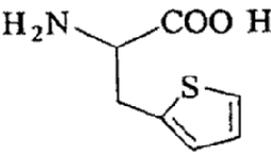
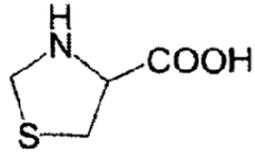
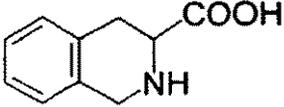
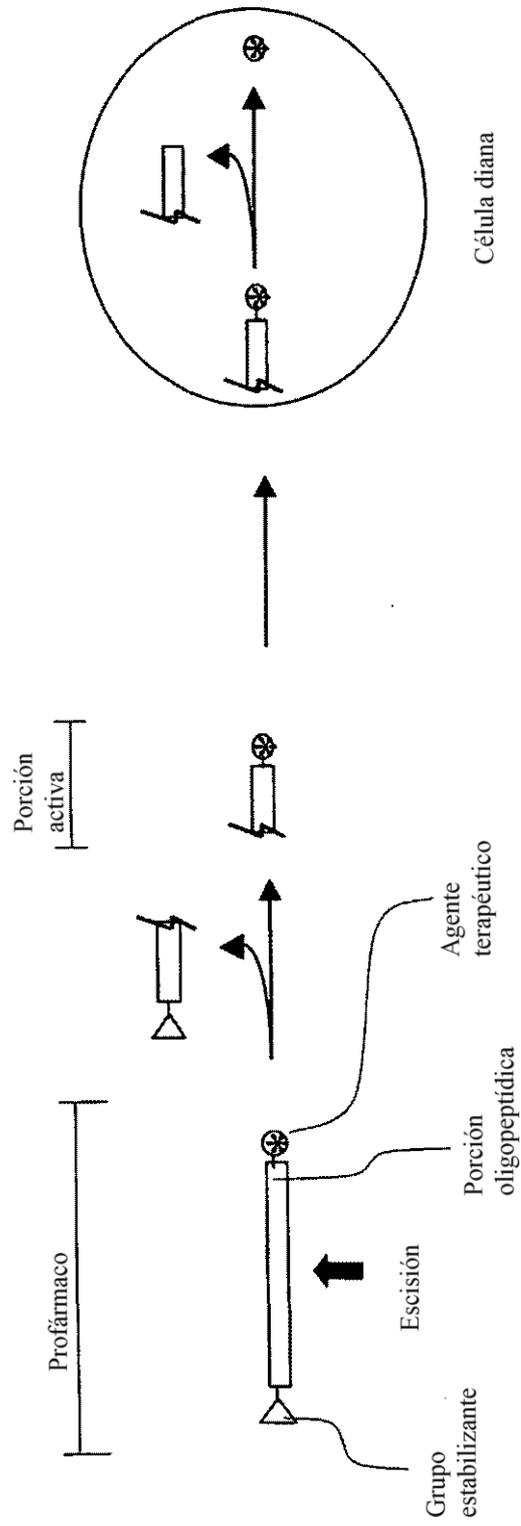
Símbolo	Nombre	Estructura
Pyg	Ácido piroglutámico	
Pyr	3-piridilalanina	
Suc	Ácido succínico	
Thi	2-tienilalanina	
Thz	3-tioprolina o ácido tiazolidin-4-carboxílico	

FIG. 1C

Símbolo	Nombre	Estructura
Tic	Ácido tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico	 <p>The chemical structure shows a benzene ring fused to a six-membered ring containing a nitrogen atom (NH). A carboxylic acid group (COOH) is attached to the carbon atom at the 3-position of the tetrahydroisoquinoline ring.</p>



**FIG. 2**

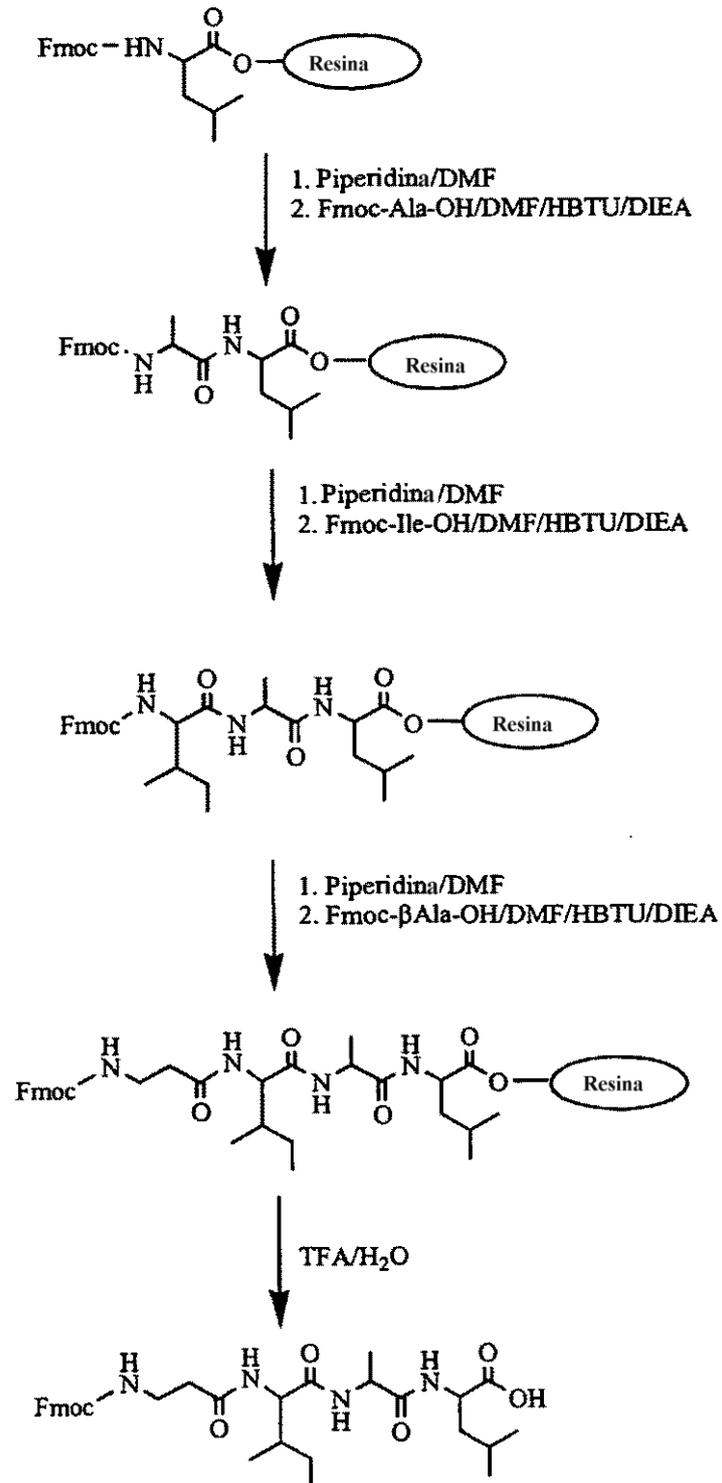


FIG. 3

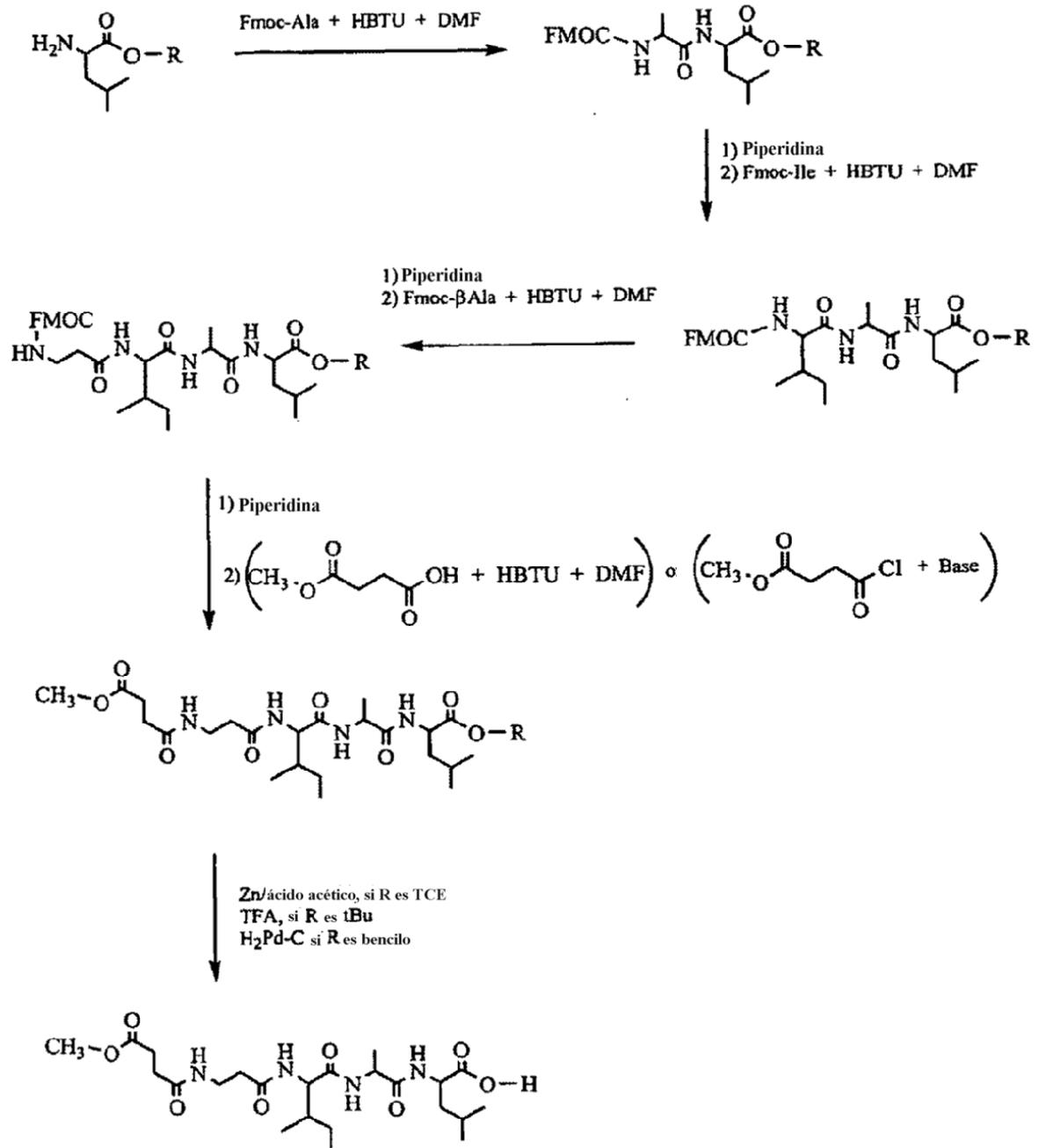


FIG. 4



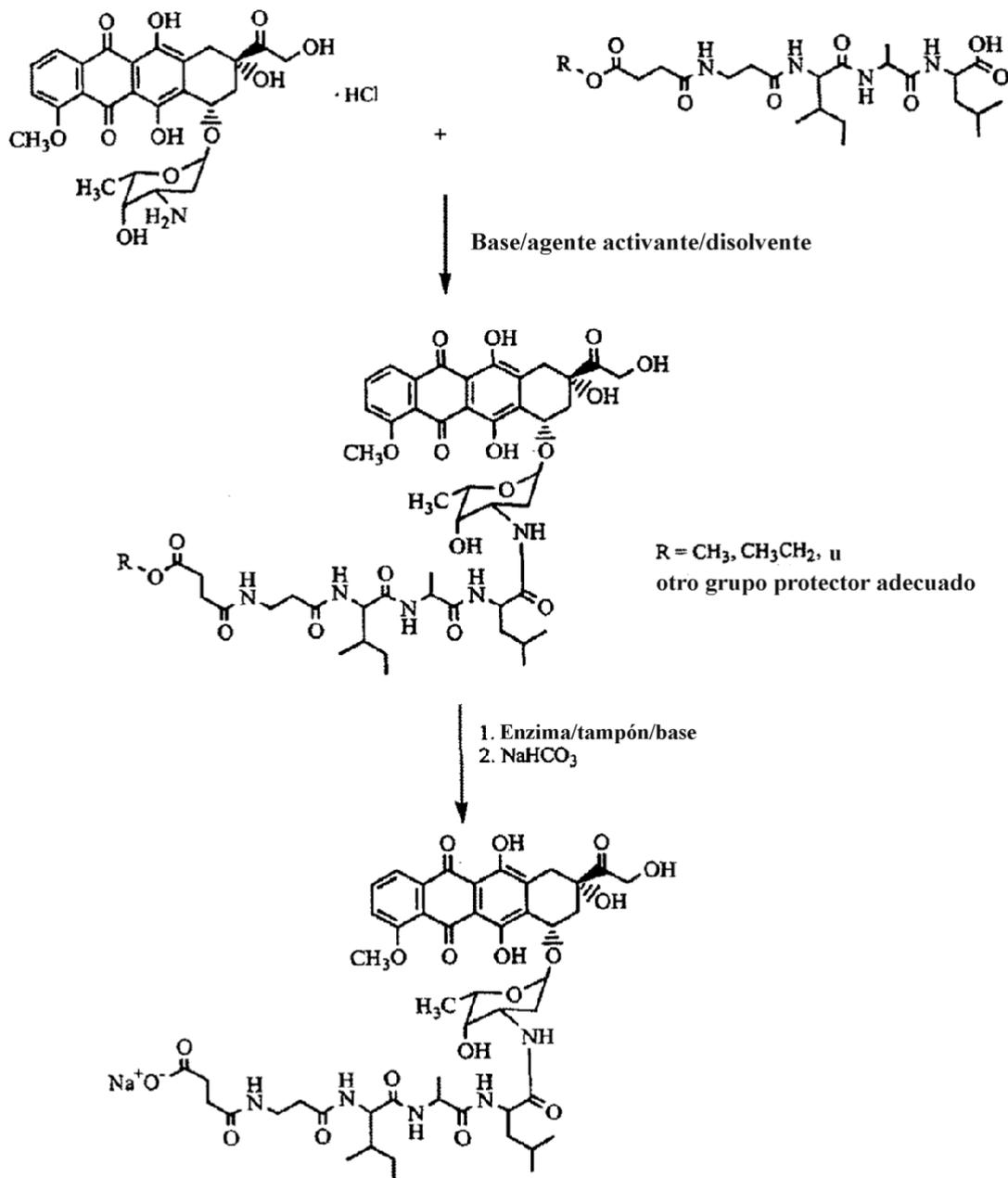


FIG.6

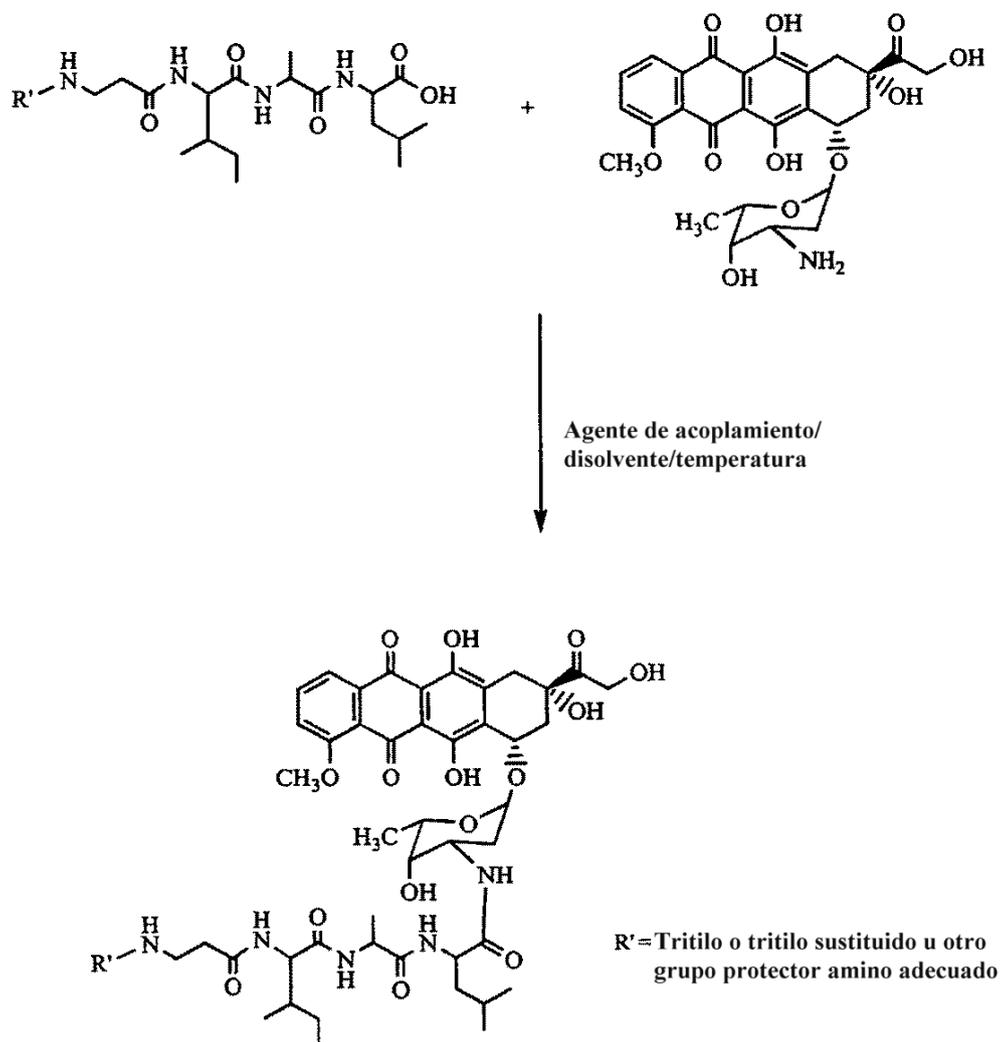


FIG. 7

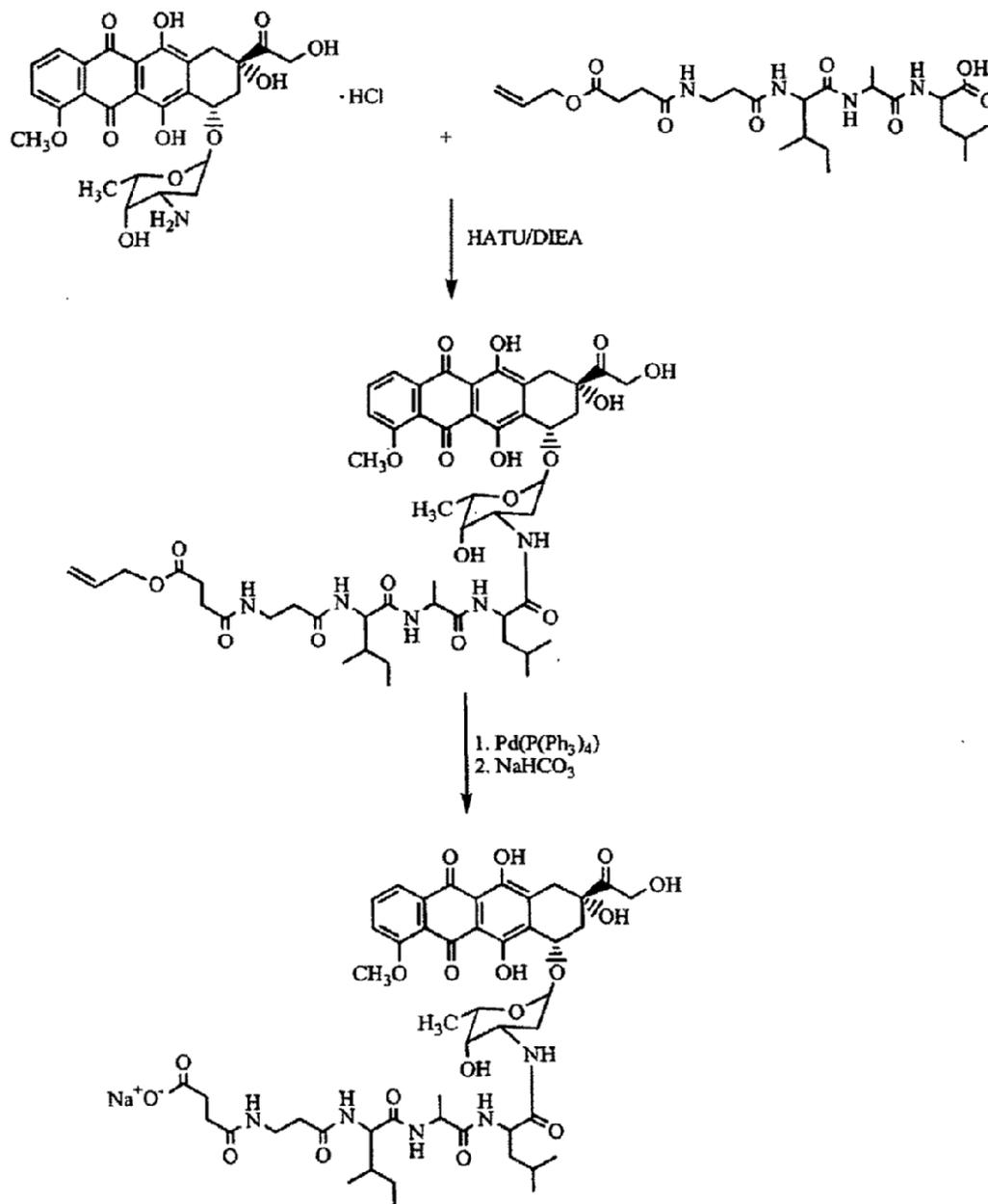


FIG. 8

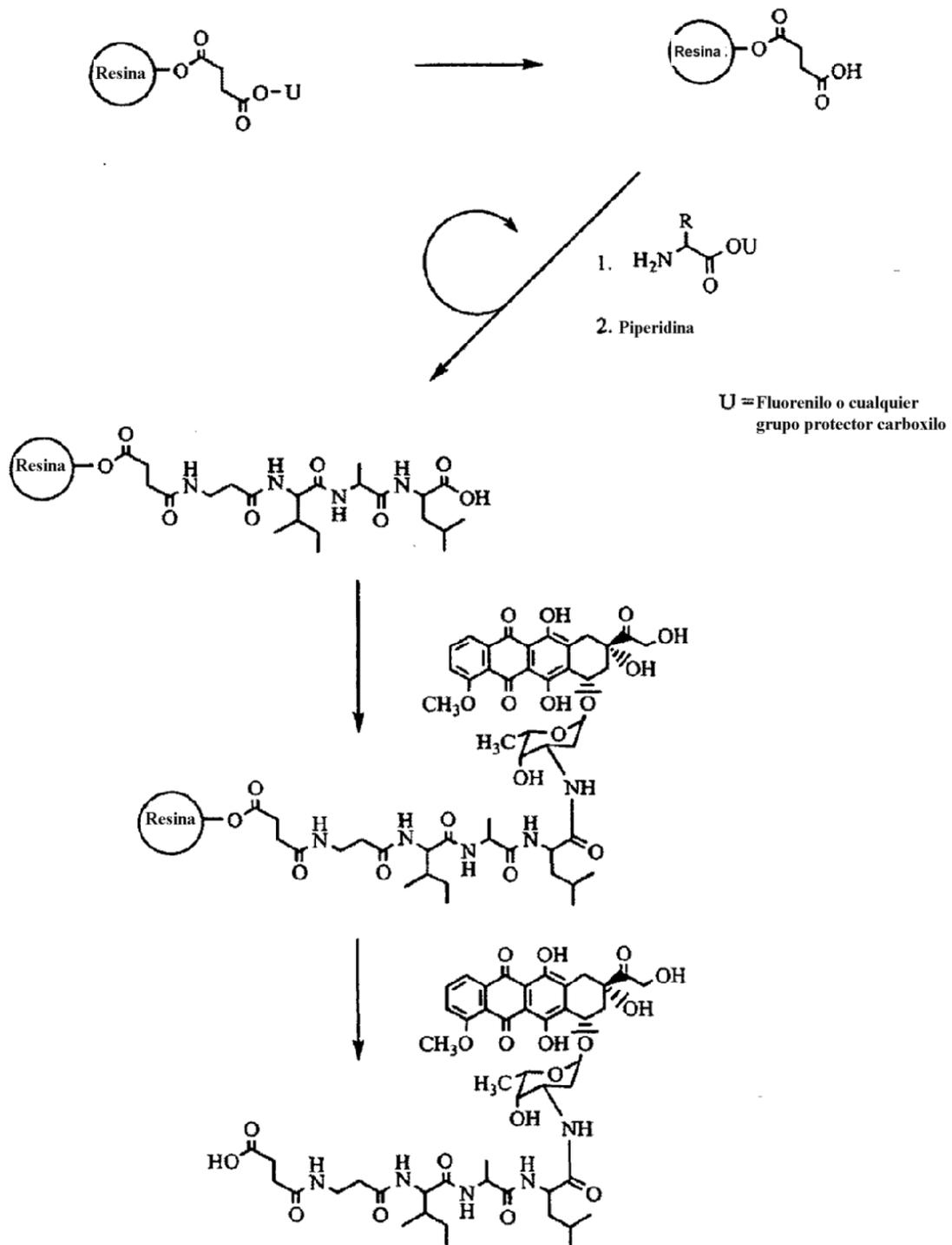
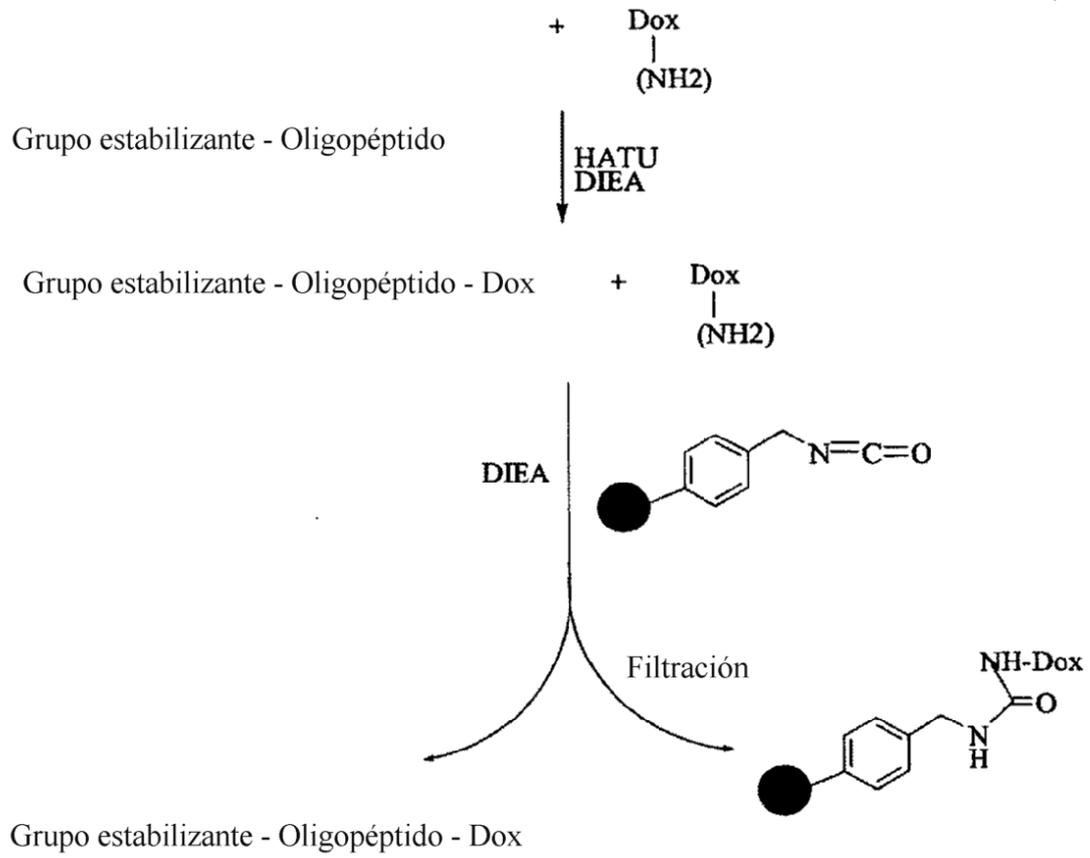


FIG. 9

Nº:	(AA <sub>4</sub> )	(AA <sub>3</sub> )	(AA <sub>2</sub> )	(AA <sub>1</sub> )	SEC ID N°:
1	βAla	Ile	Ala	Phe	SEC ID N°: 1
2	βAla	Ile	Ala	Ile	SEC ID N°: 2
3	Tic	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 3
4	Thi	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 4
5	Nal	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 5
6	Amb	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 6
7	Aib	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 7
8	βAla	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 8
9	Thi	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 9
10	Nal	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 10
11	βAla	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 11
12	Amb	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 12
13	Aib	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 13
14	βAla	Ile	Gly	Phe	SEC ID N°: 14
15	βAla	Ile	Gly	Ile	SEC ID N°: 15
16	Tic	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 16
17	Thi	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 17
18	Nal	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 18
19	βAla	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 19
20	Amb	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 20
21	Aib	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 21
22	βAla	Ile	Thr	Ile	SEC ID N°: 22
23	βAla	Ile	Tyr	Ile	SEC ID N°: 23
24	βAla	Ile	Ala	Gly	SEC ID N°: 24
25	∅	Ile	Ala	Leu	SEC ID N°: 25
26	∅	Ile	N(Me)Ala	Leu	SEC ID N°: 26
27	∅	Ile	Ala	Phe	SEC ID N°: 27
28	∅	Ile	Ala	Ile	SEC ID N°: 28
29	∅	Ile	Aib	Leu	SEC ID N°: 29
30	∅	Ile	Gly	Phe	SEC ID N°: 30
31	∅	Ile	Gly	Ile	SEC ID N°: 31
32	∅	Ile	Gly	Leu	SEC ID N°: 32
33	∅	Ile	Thr	Ile	SEC ID N°: 33
34	∅	Ile	Ala	Gly	SEC ID N°: 34
35	βAla	Ile	Tyr	Leu	SEC ID N°: 35
36	βAla	Ile	Tyr	Gly	SEC ID N°: 36

∅ = no presente

**FIG. 10**



**FIG. 11**

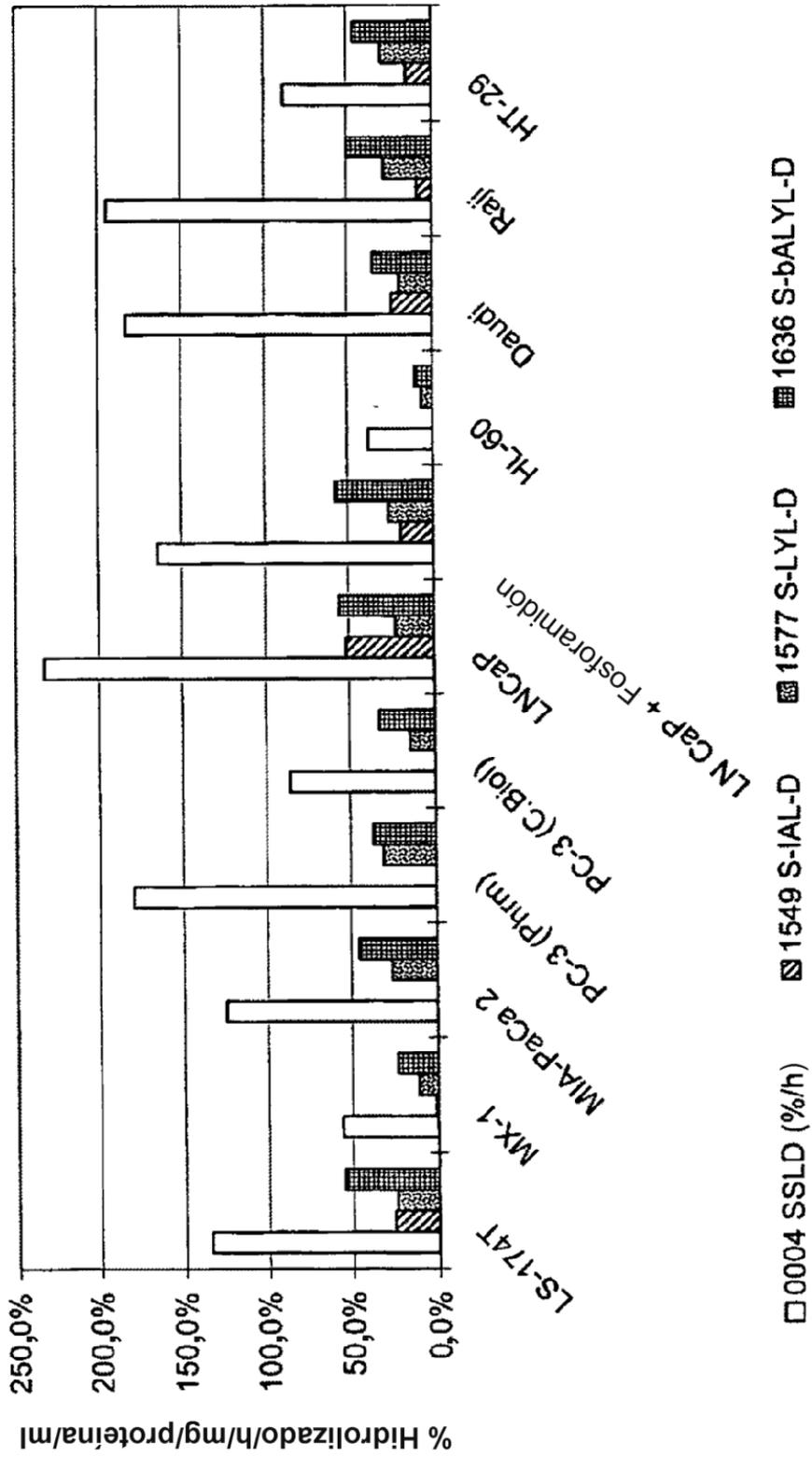


FIG. 12

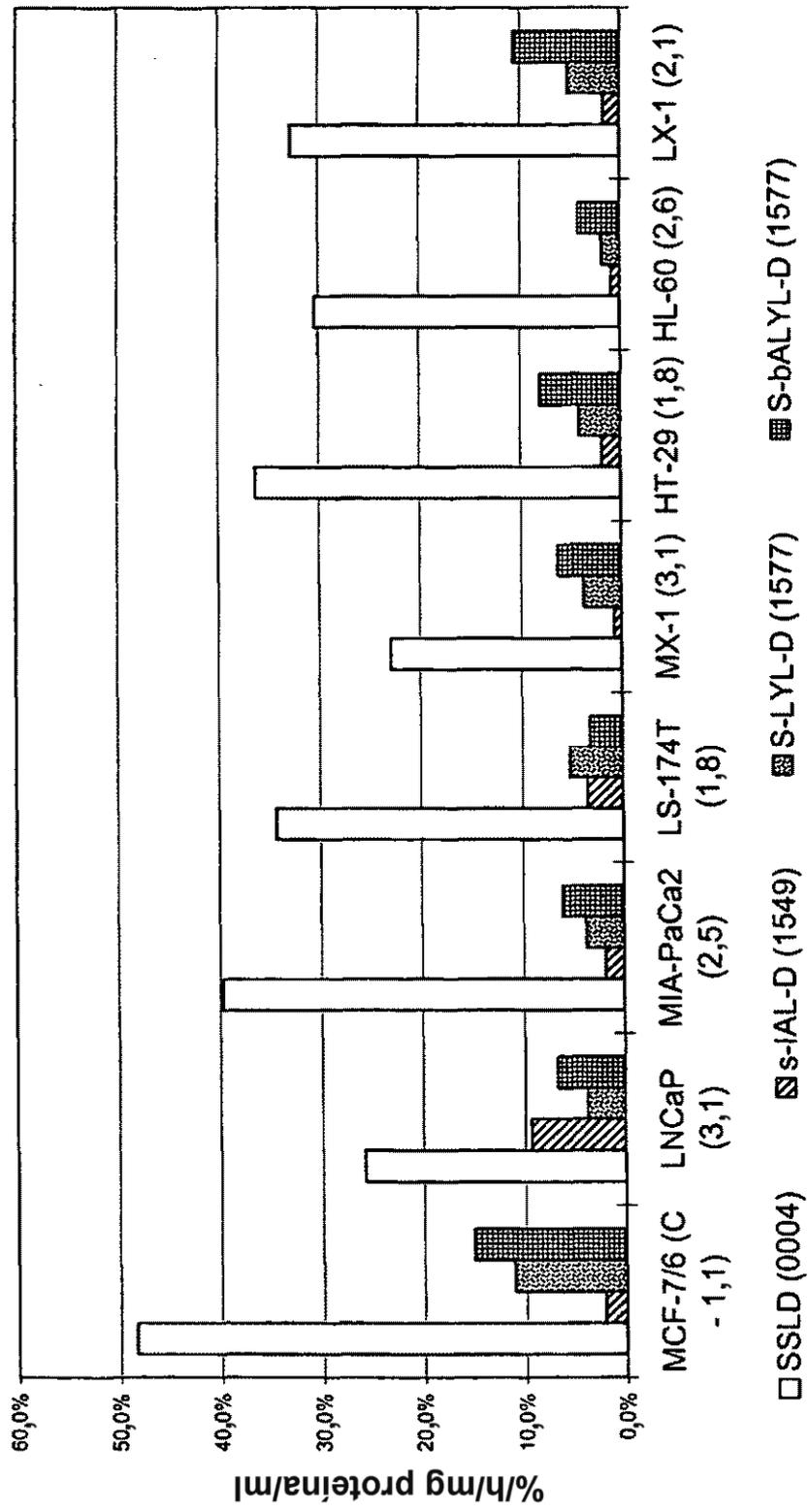


FIG. 13

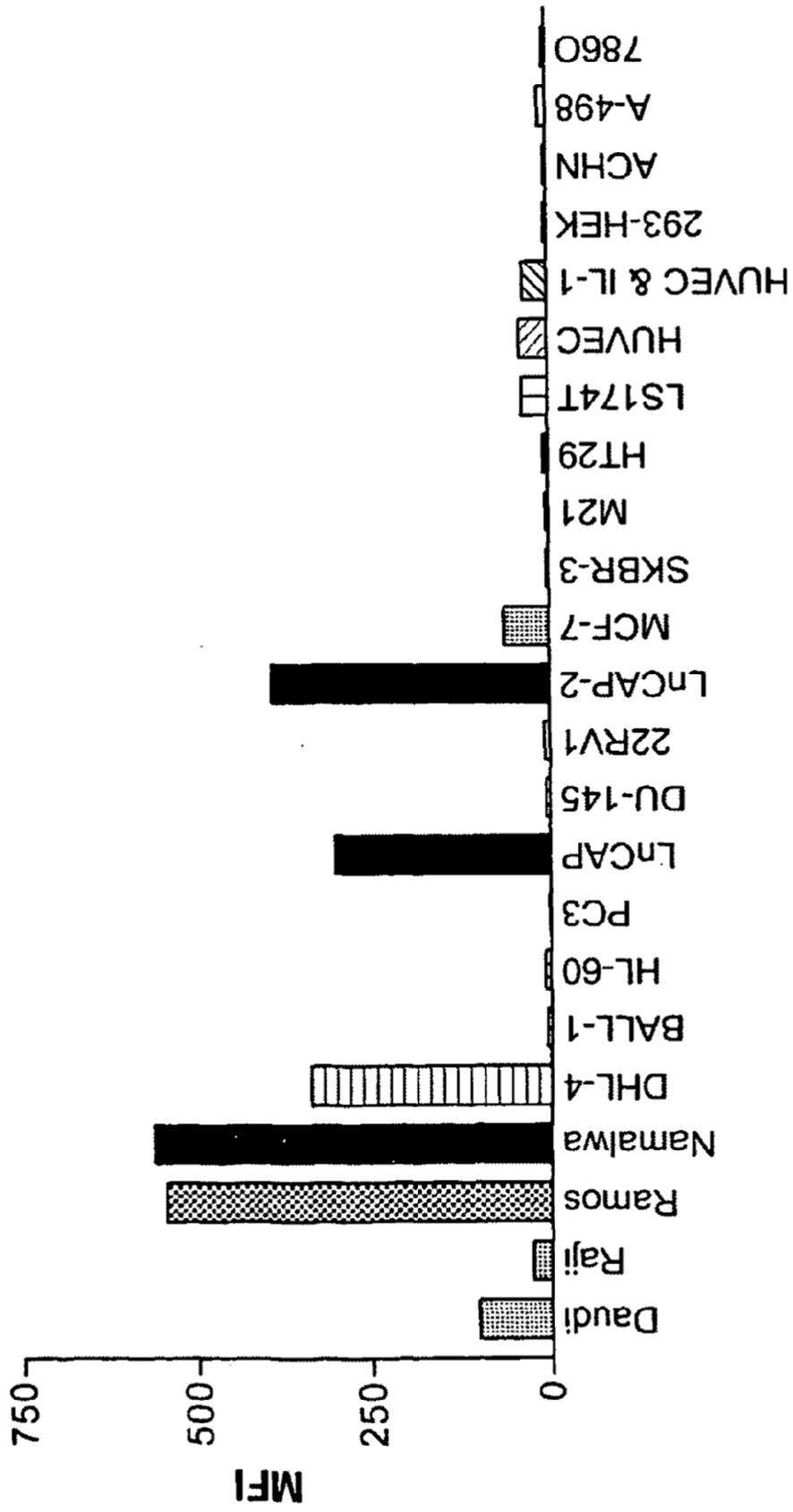
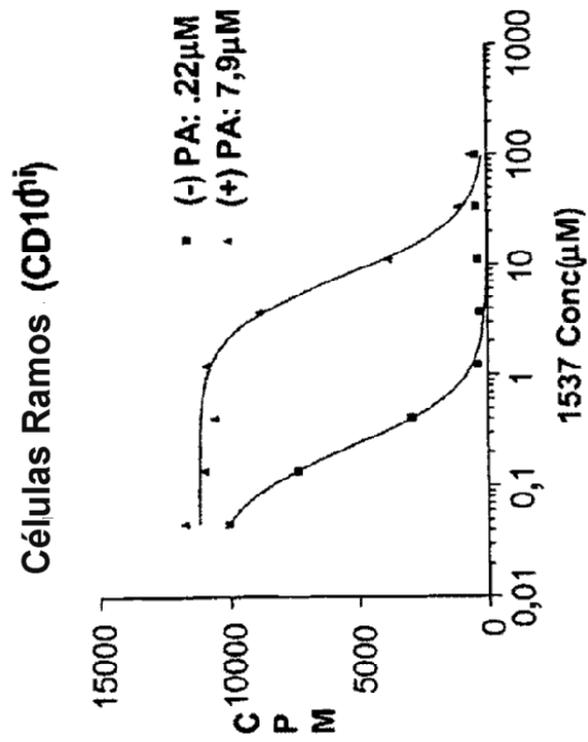
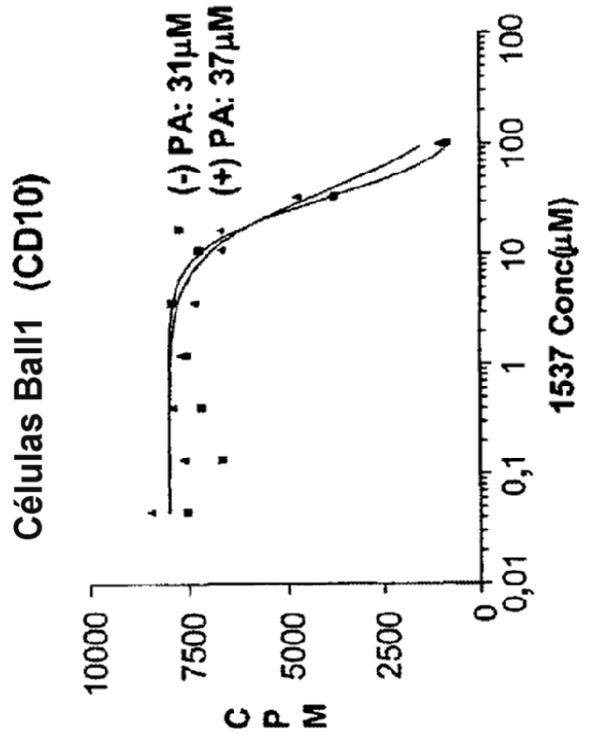


FIG. 14



**FIG. 15**

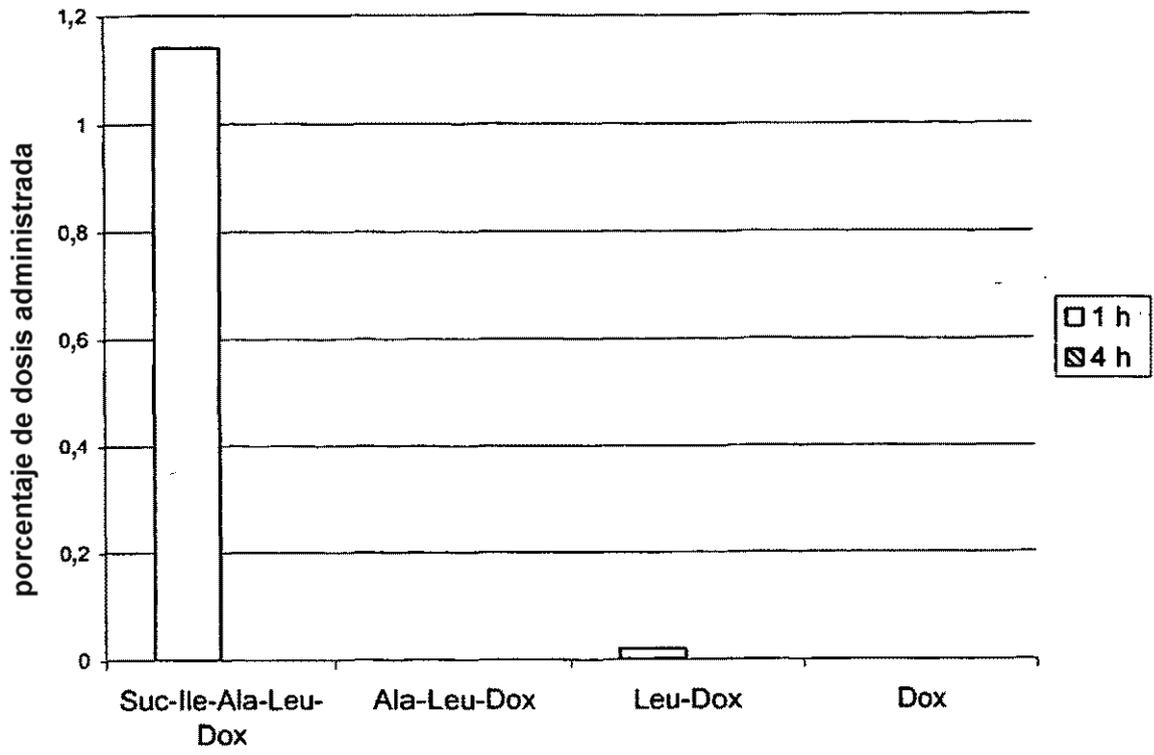


FIG. 16

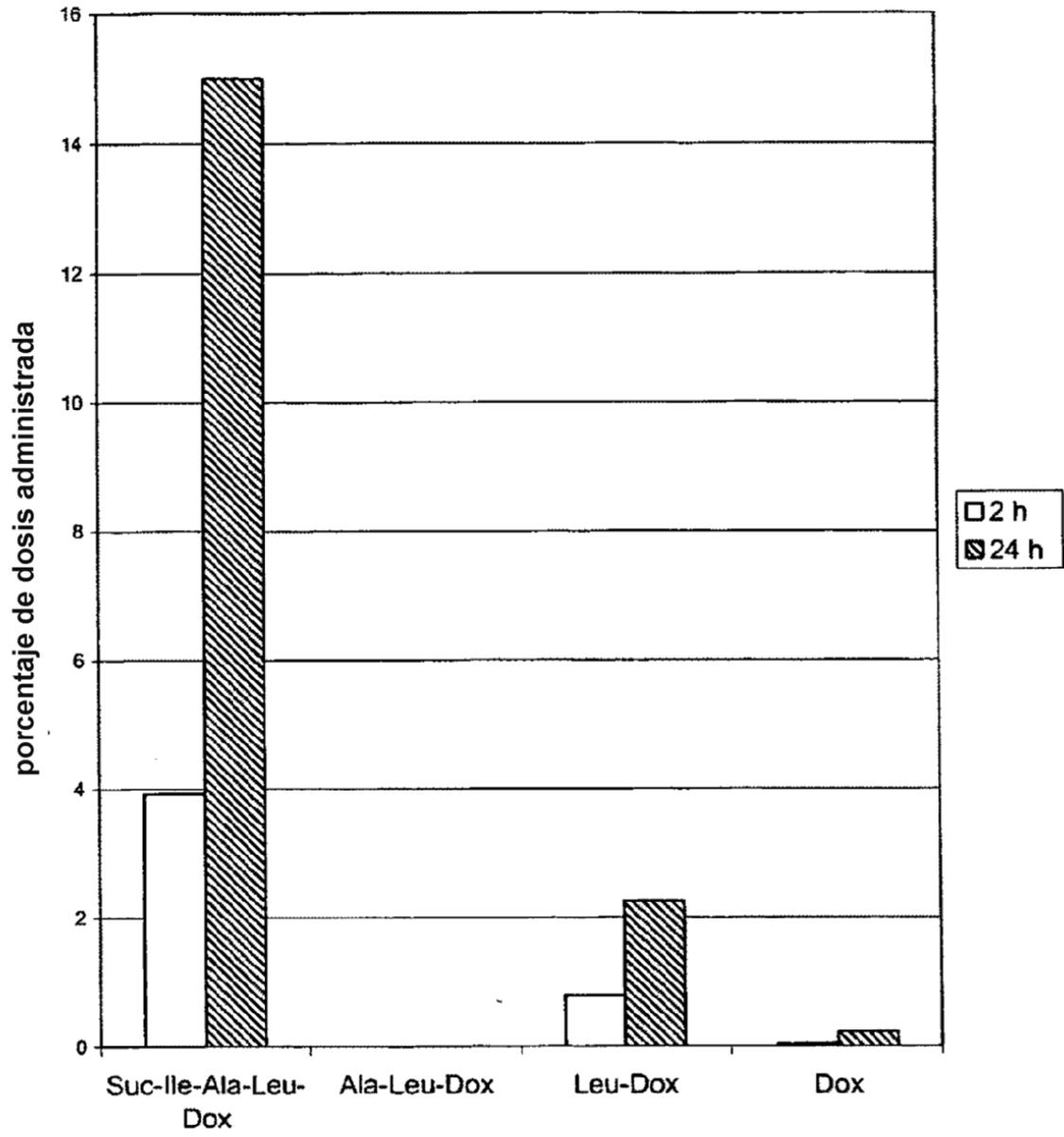


FIG. 17

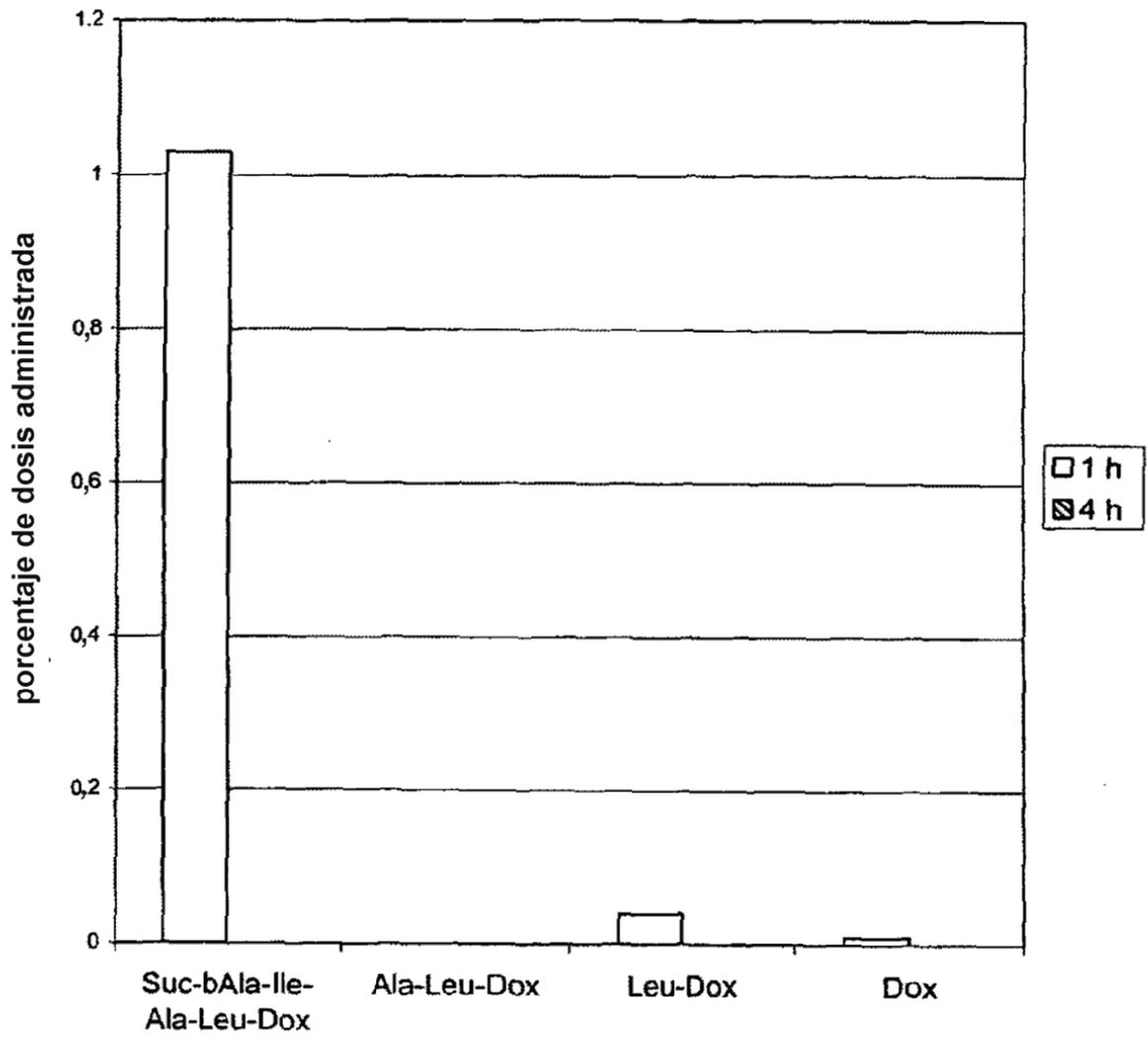


FIG. 18

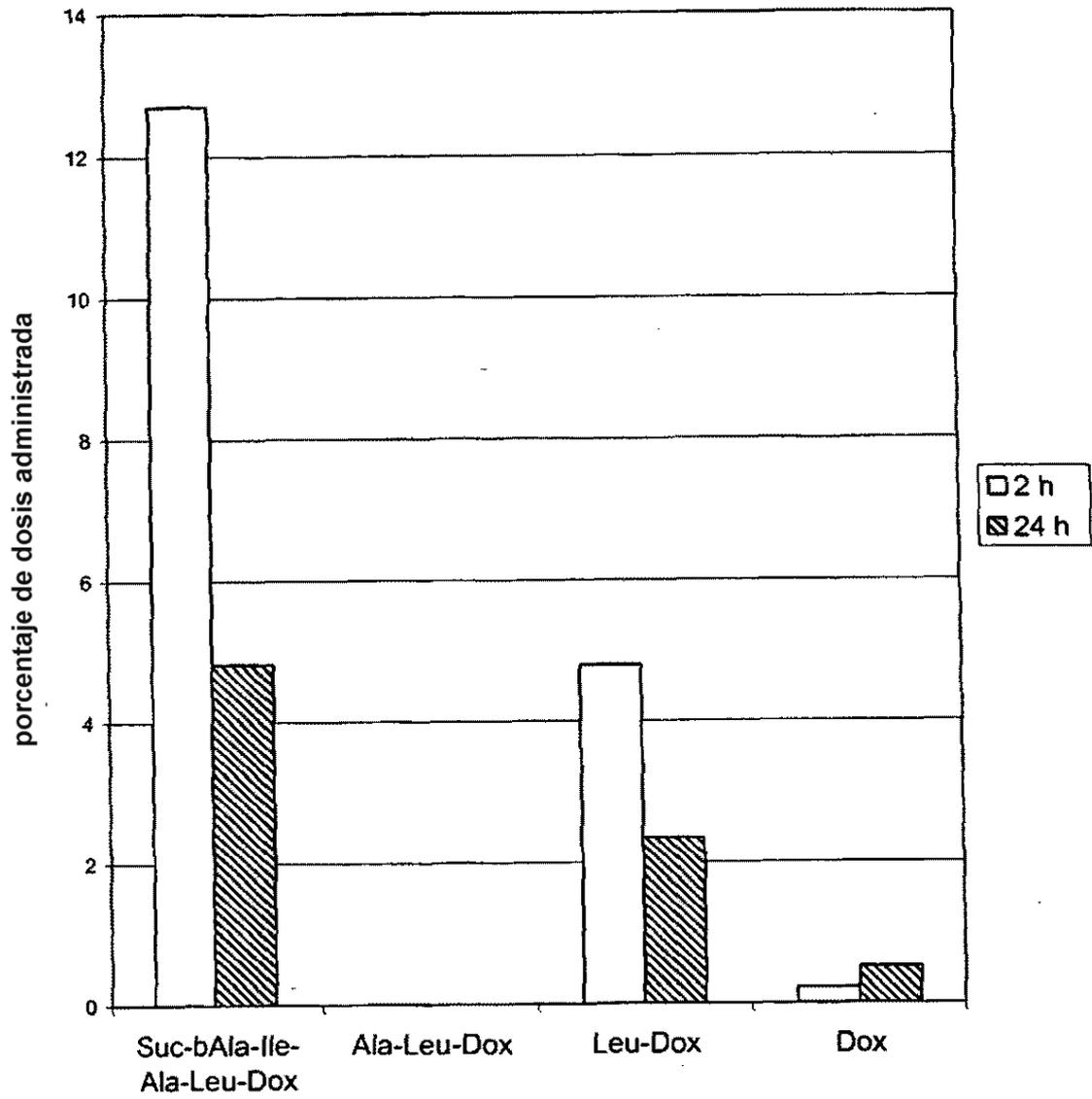


FIG. 19

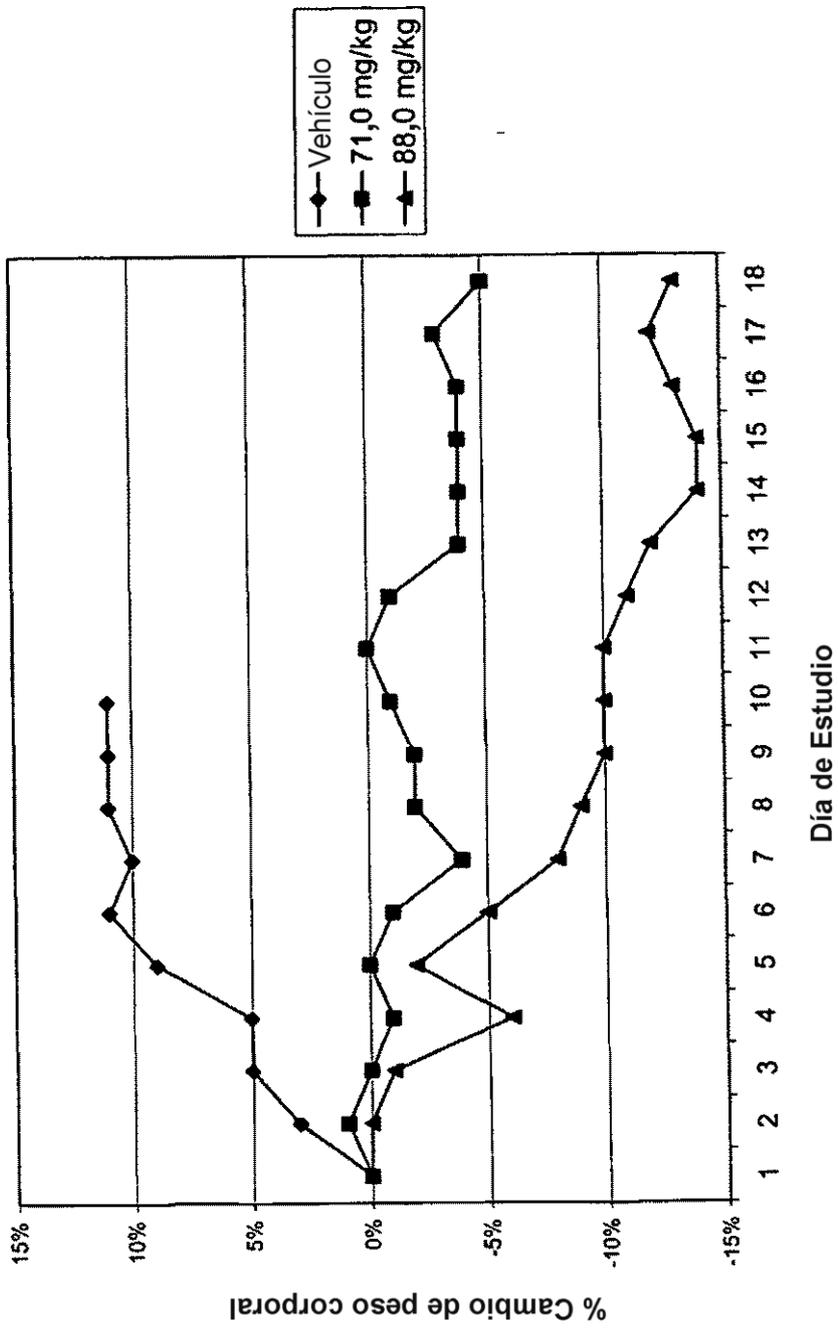


FIG. 20

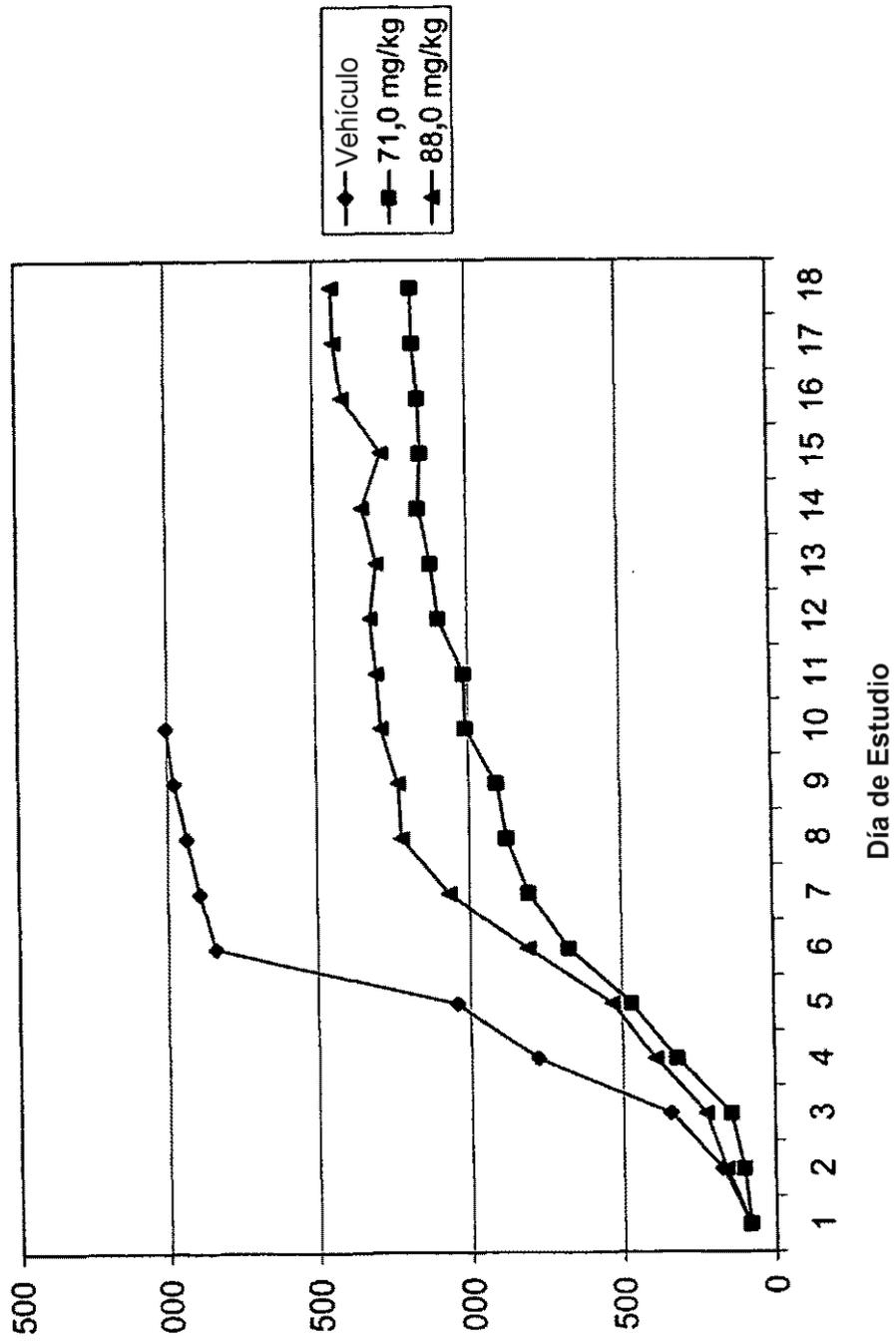


FIG. 21

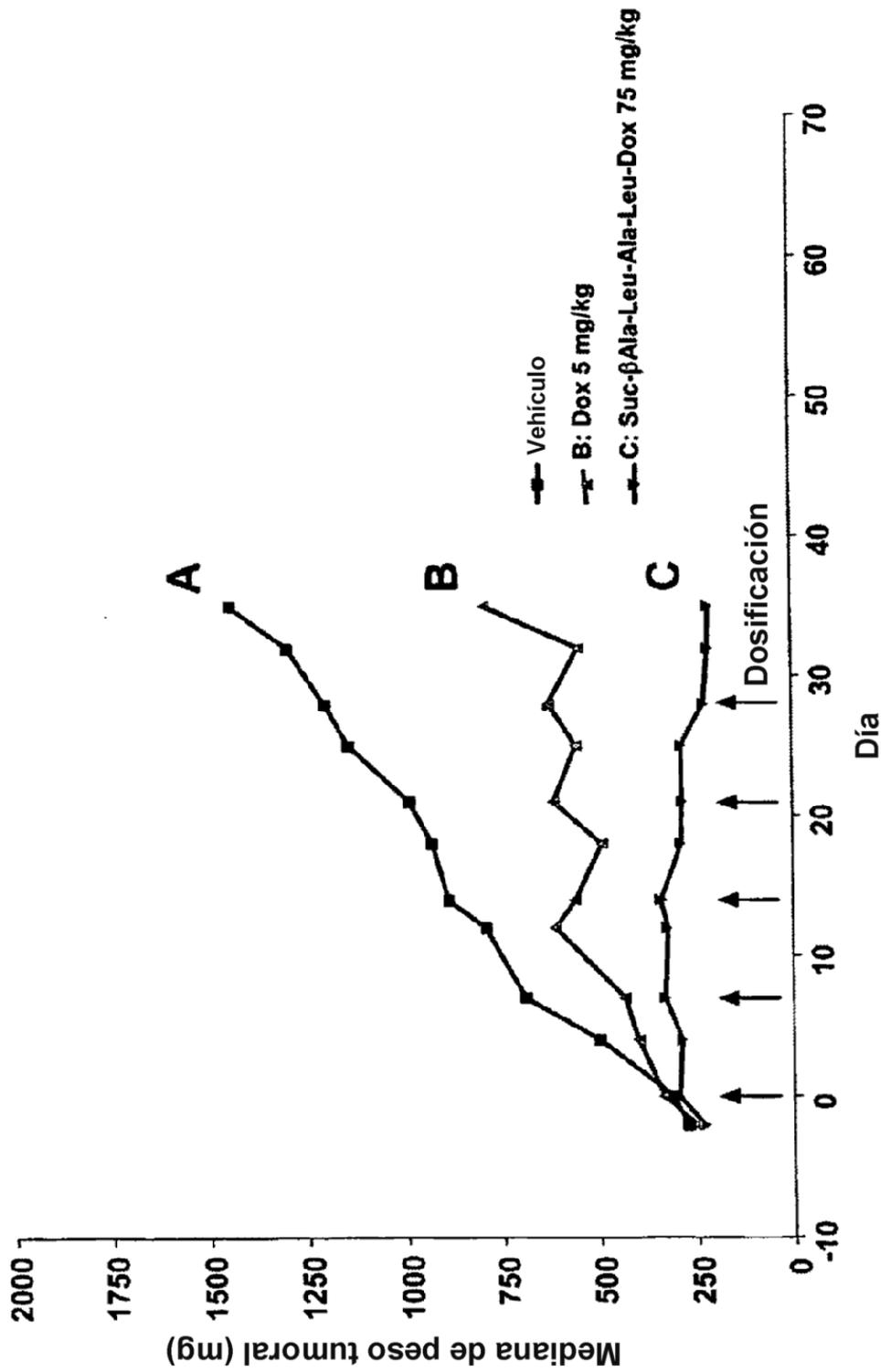


FIG. 22

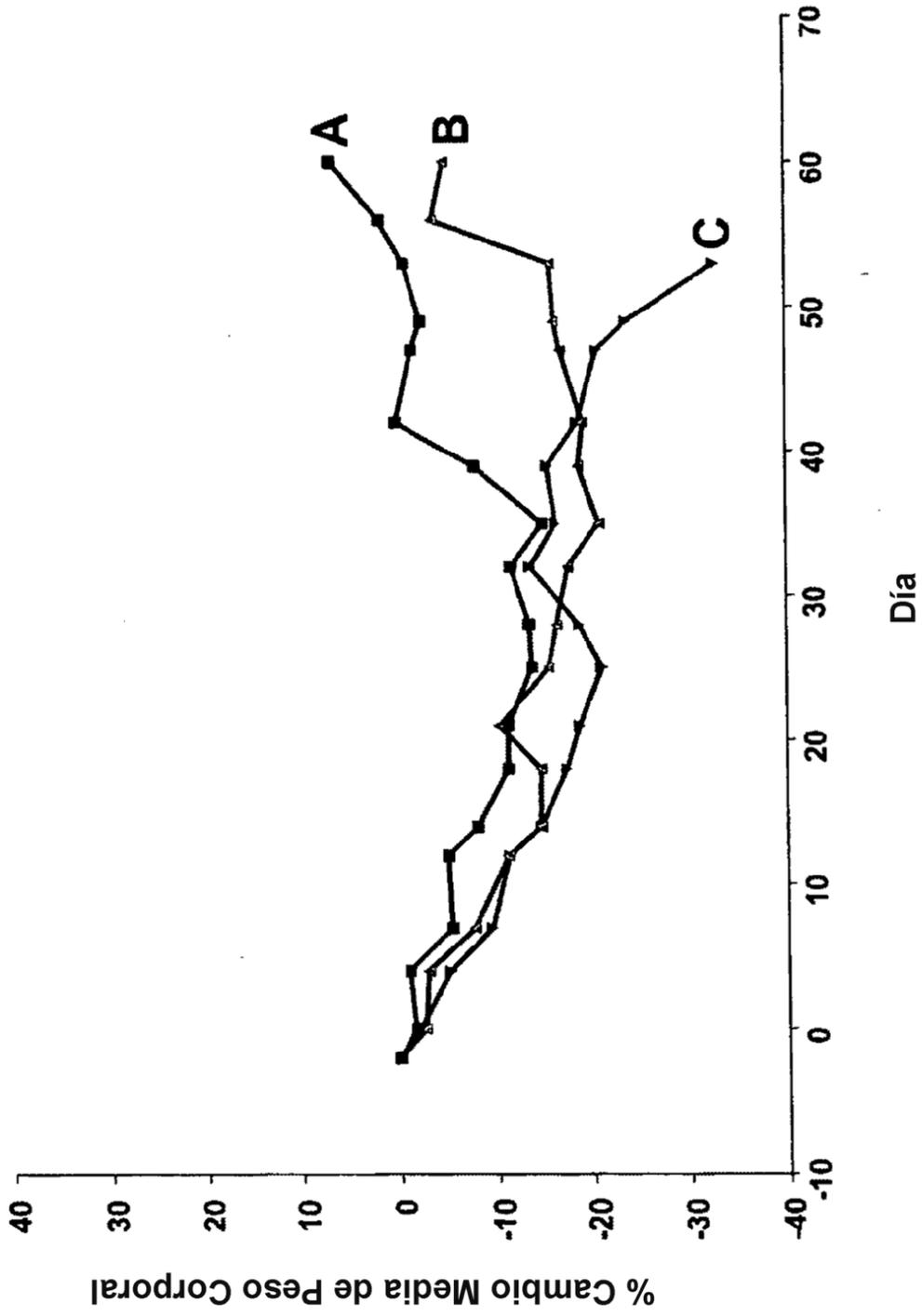


FIG. 23

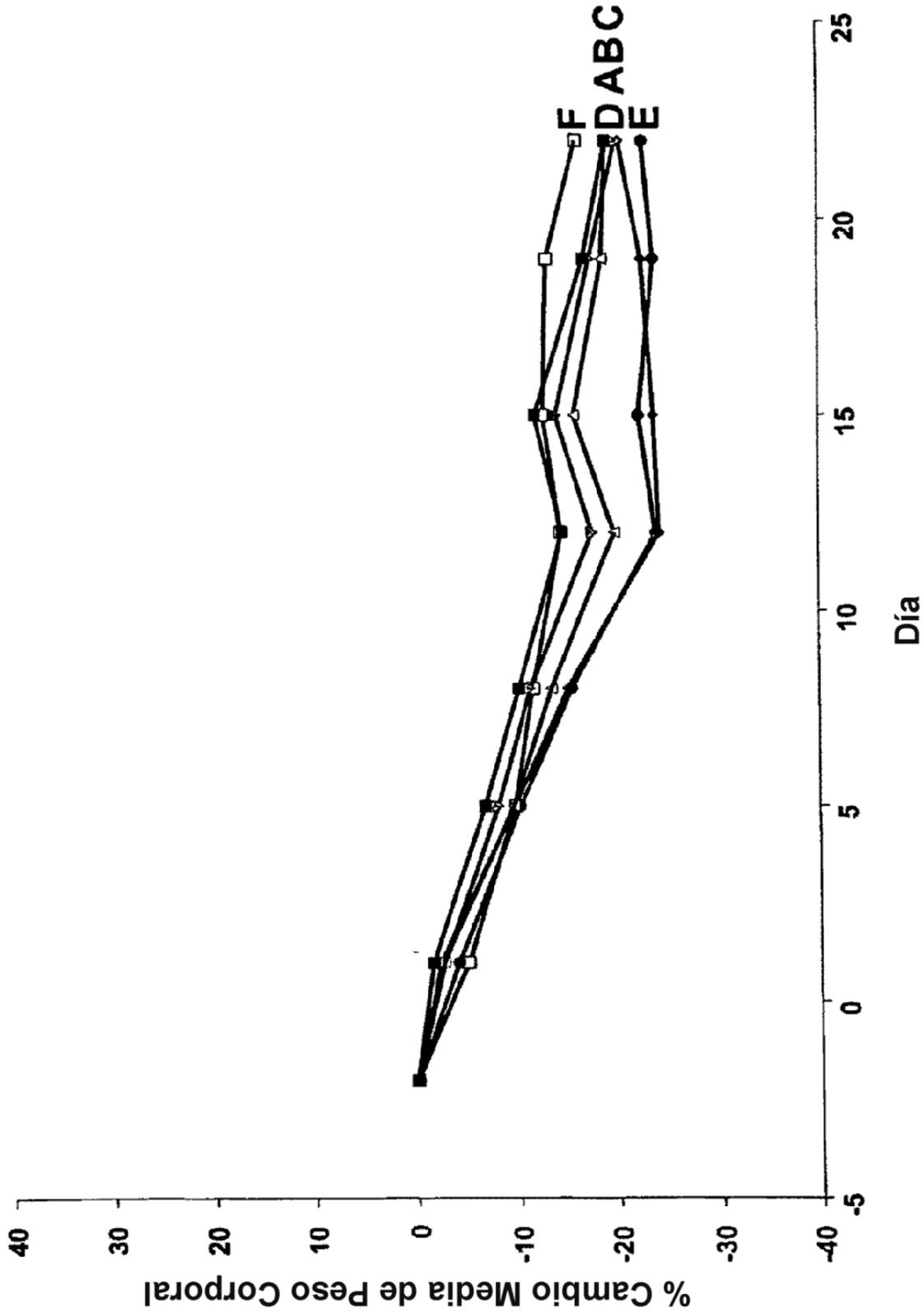


FIG. 24

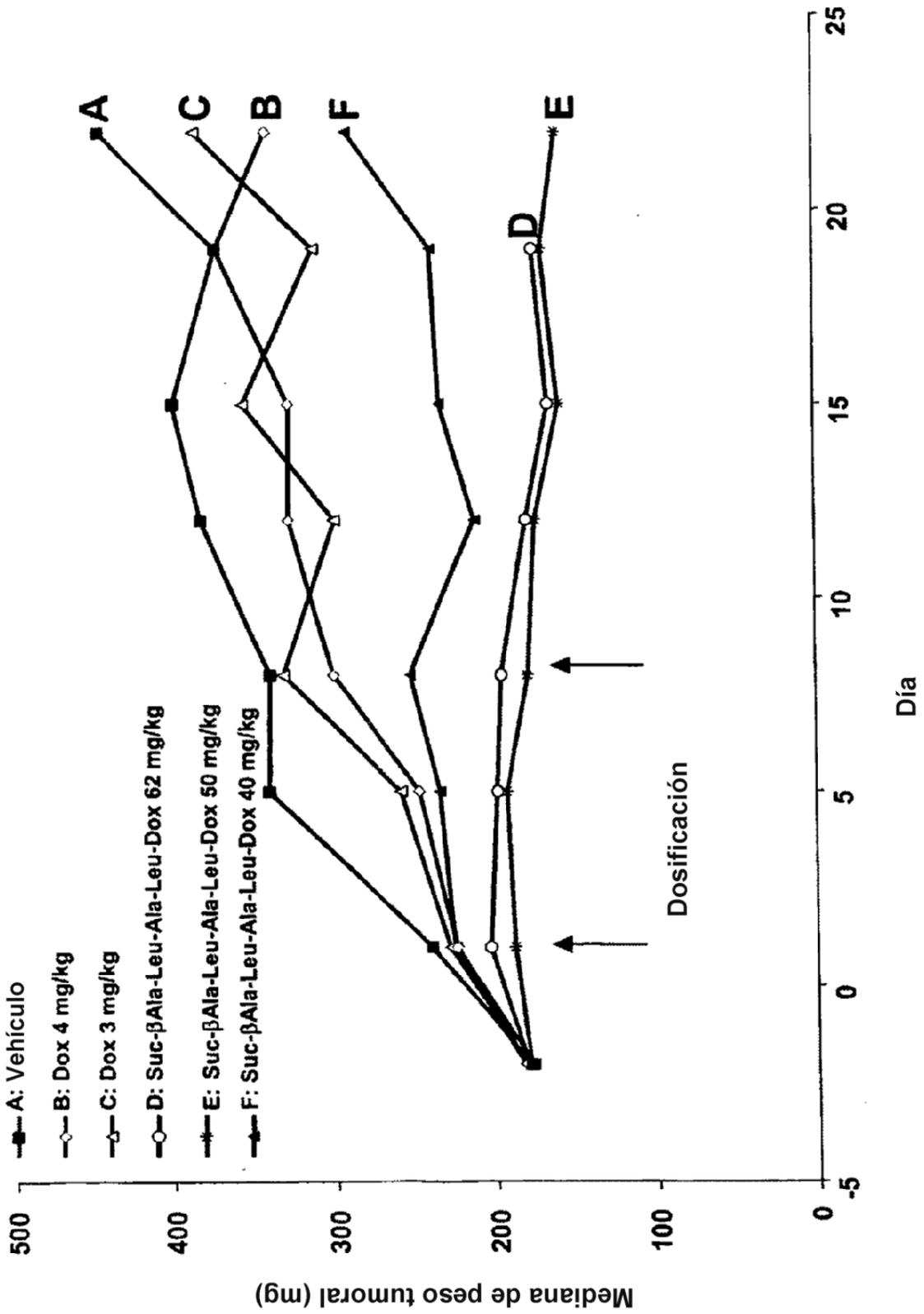


FIG. 25

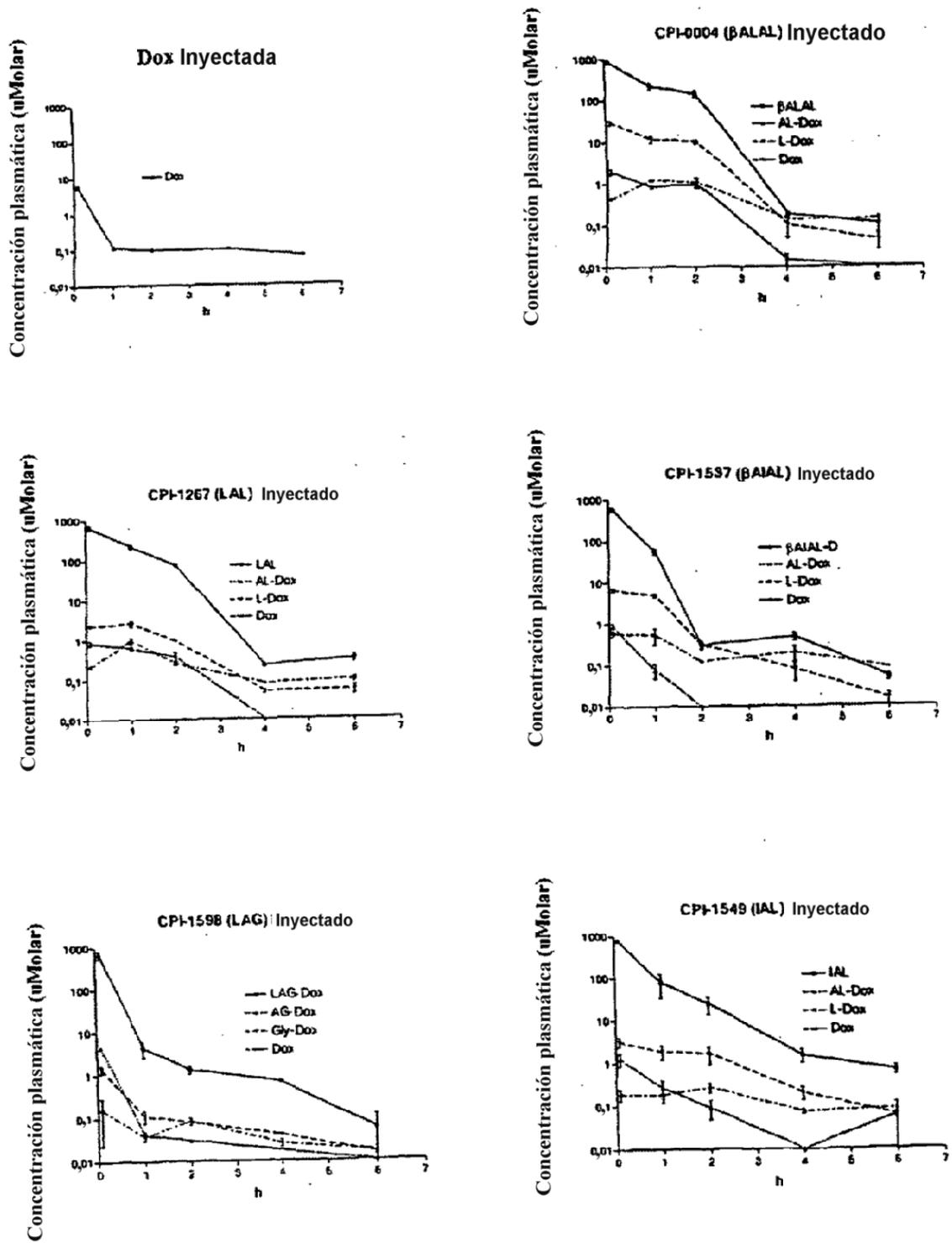


FIG. 26

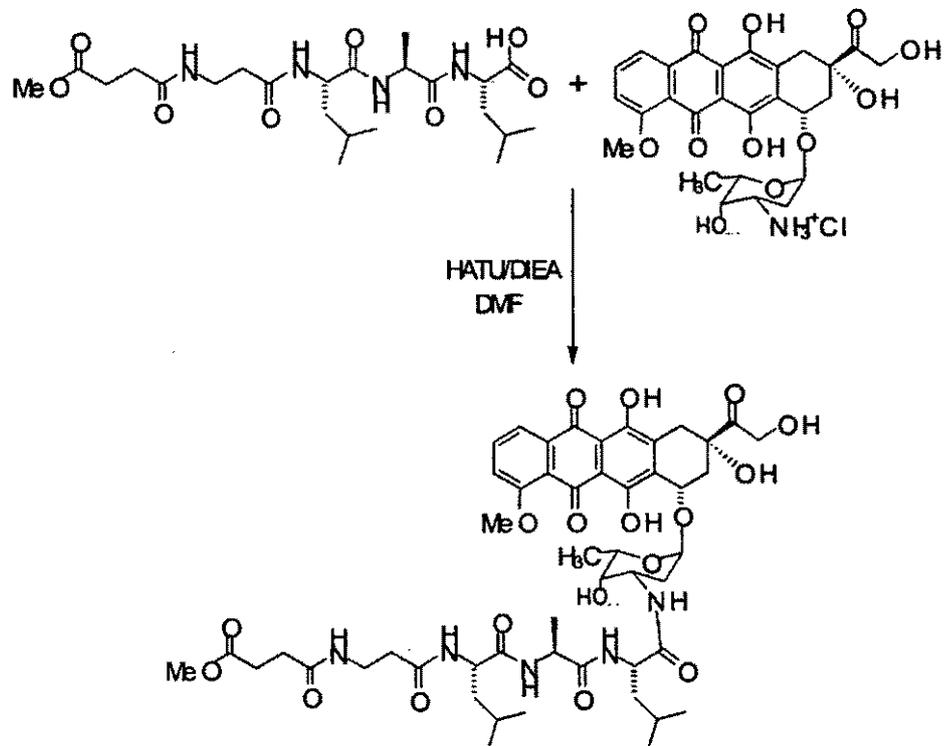


FIG. 27

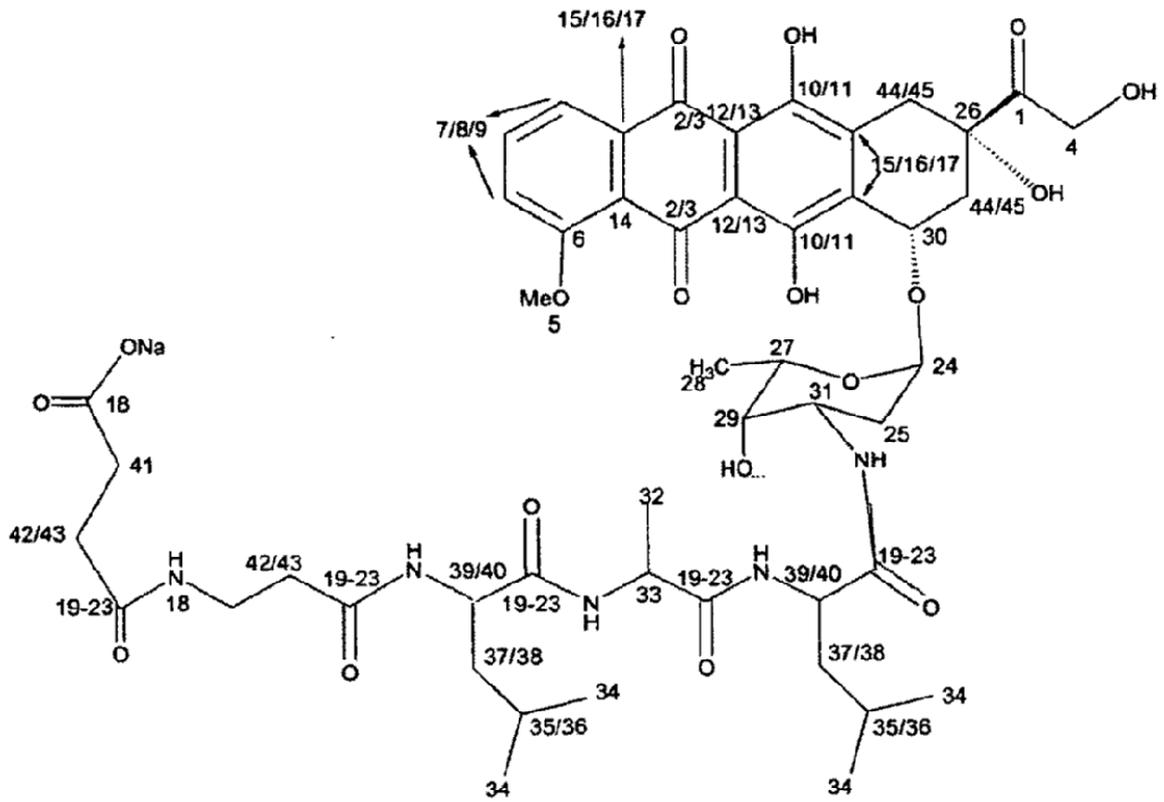


FIG. 28

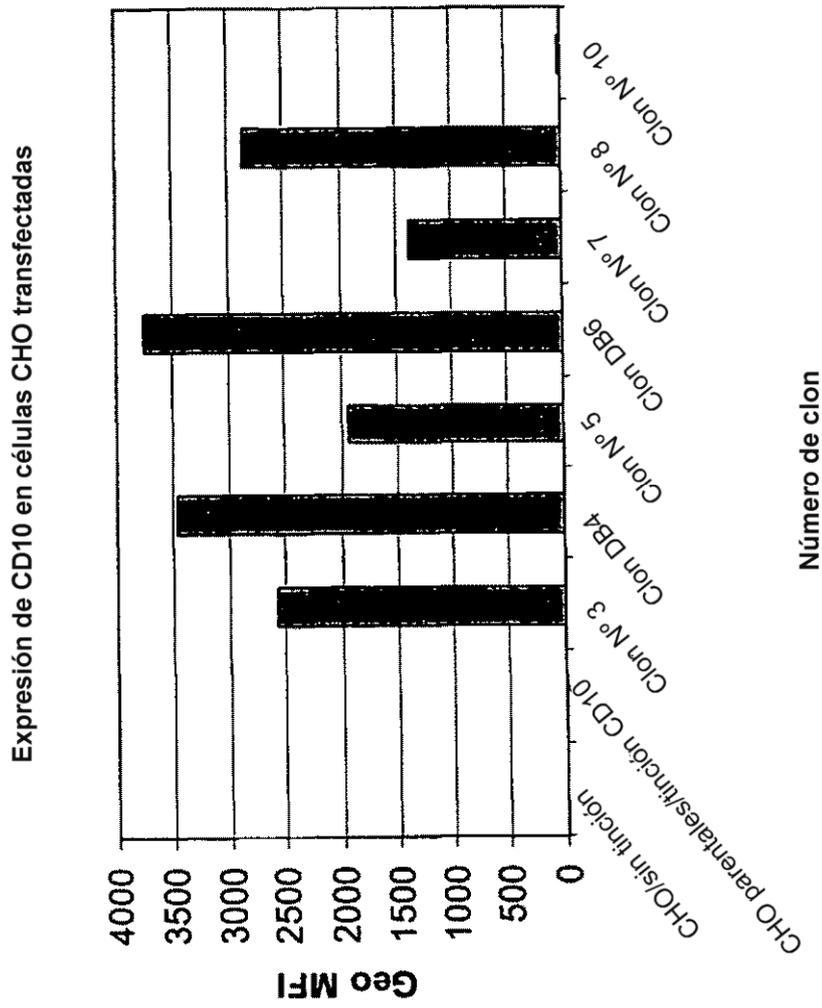
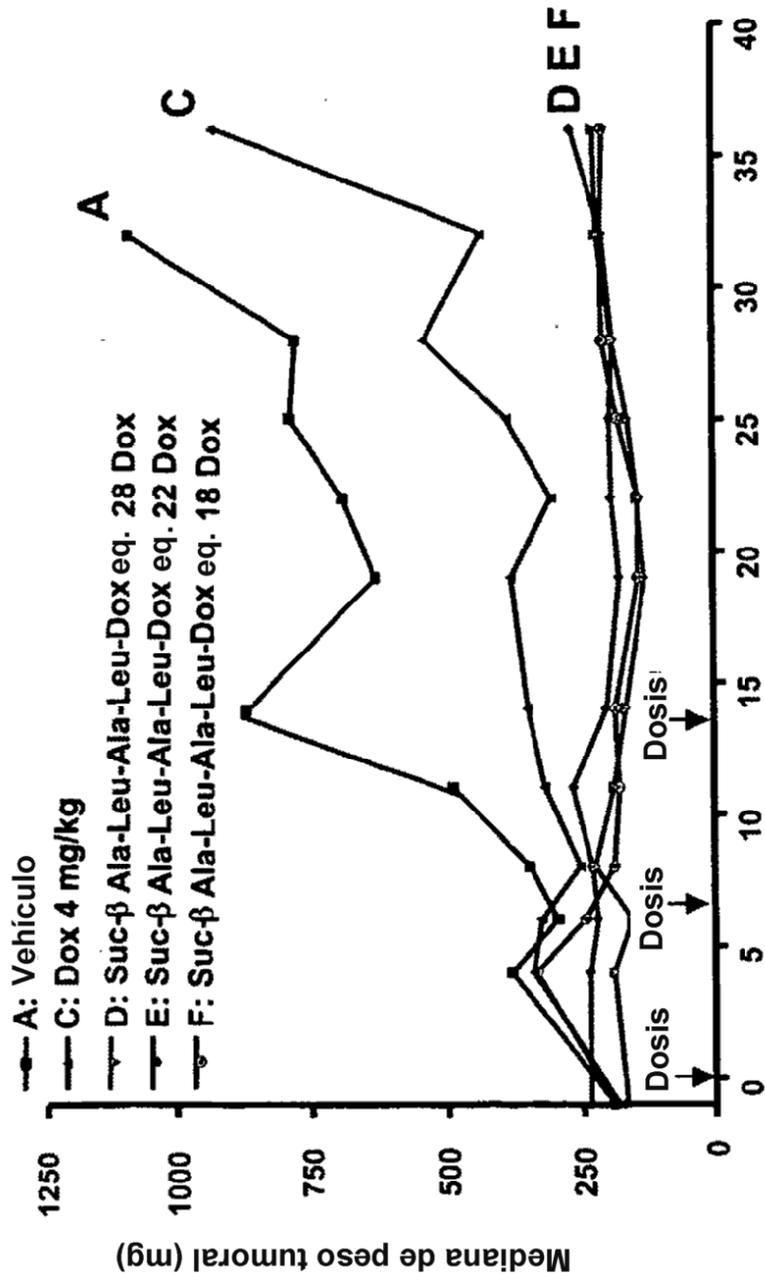


FIG. 29

Curva de mediana de crecimiento tumoral



Días post-dosificación inicial

FIG. 30

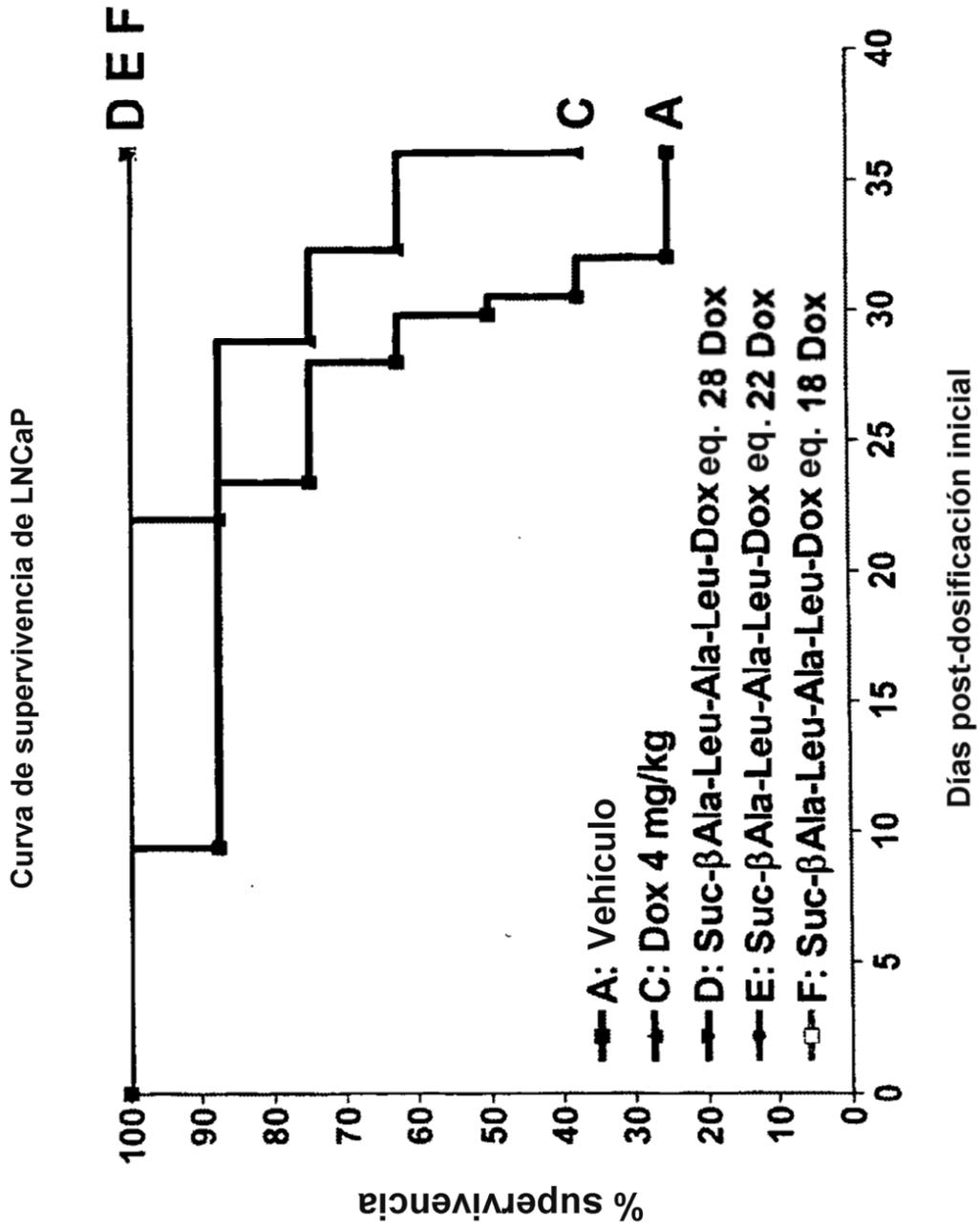
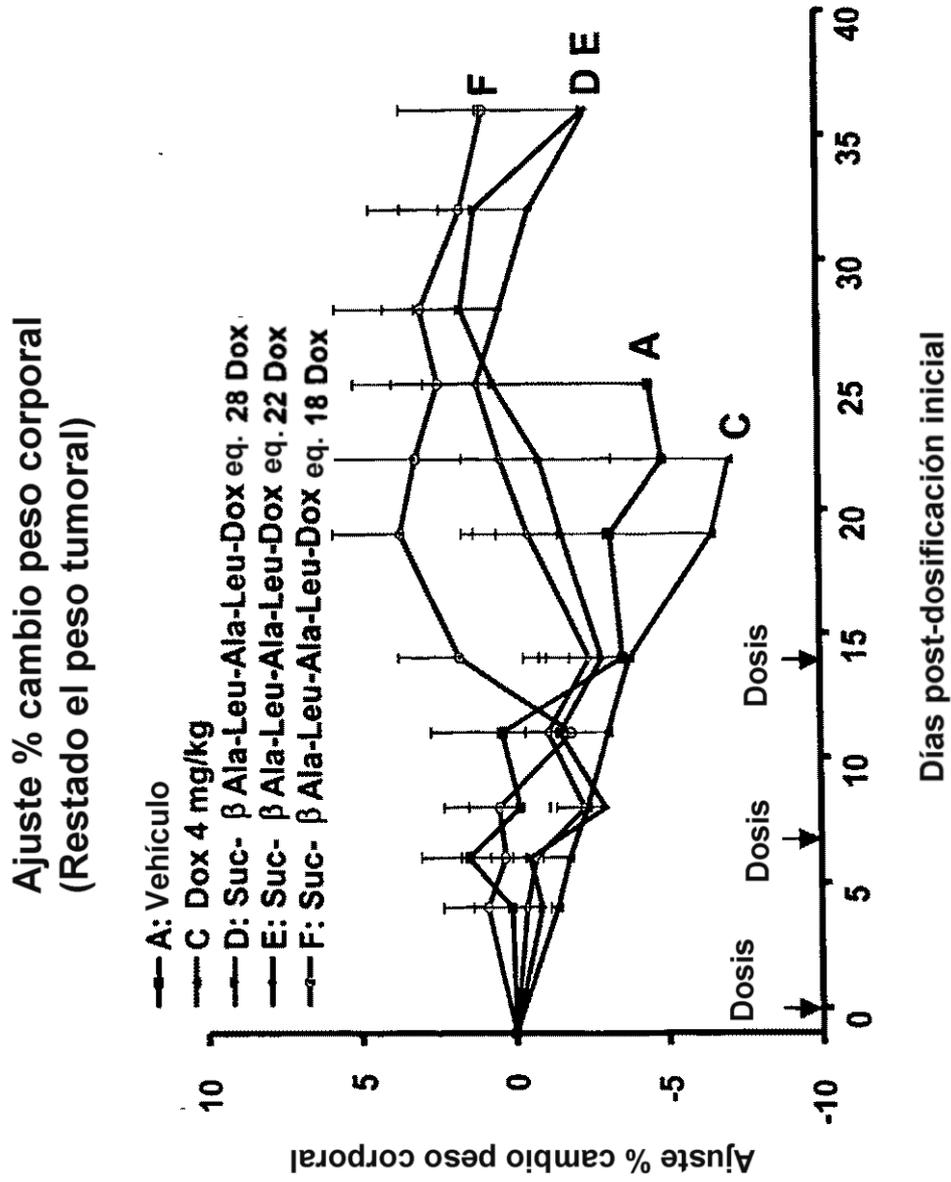


FIG. 31



Curva de mediana de crecimiento tumoral

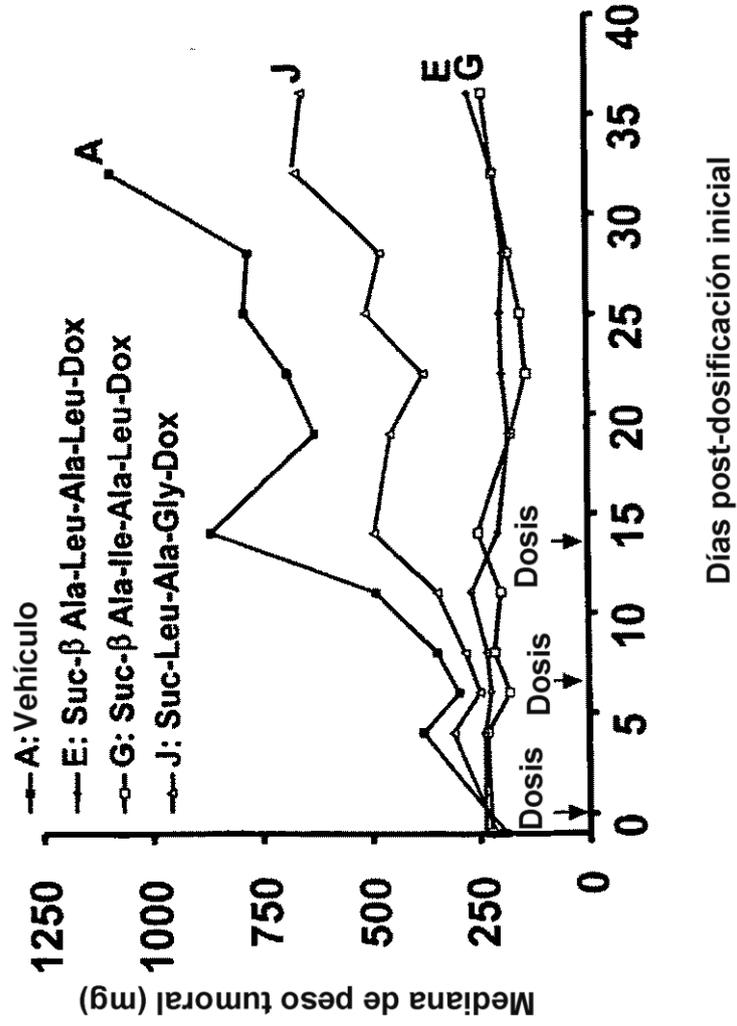


FIG. 33

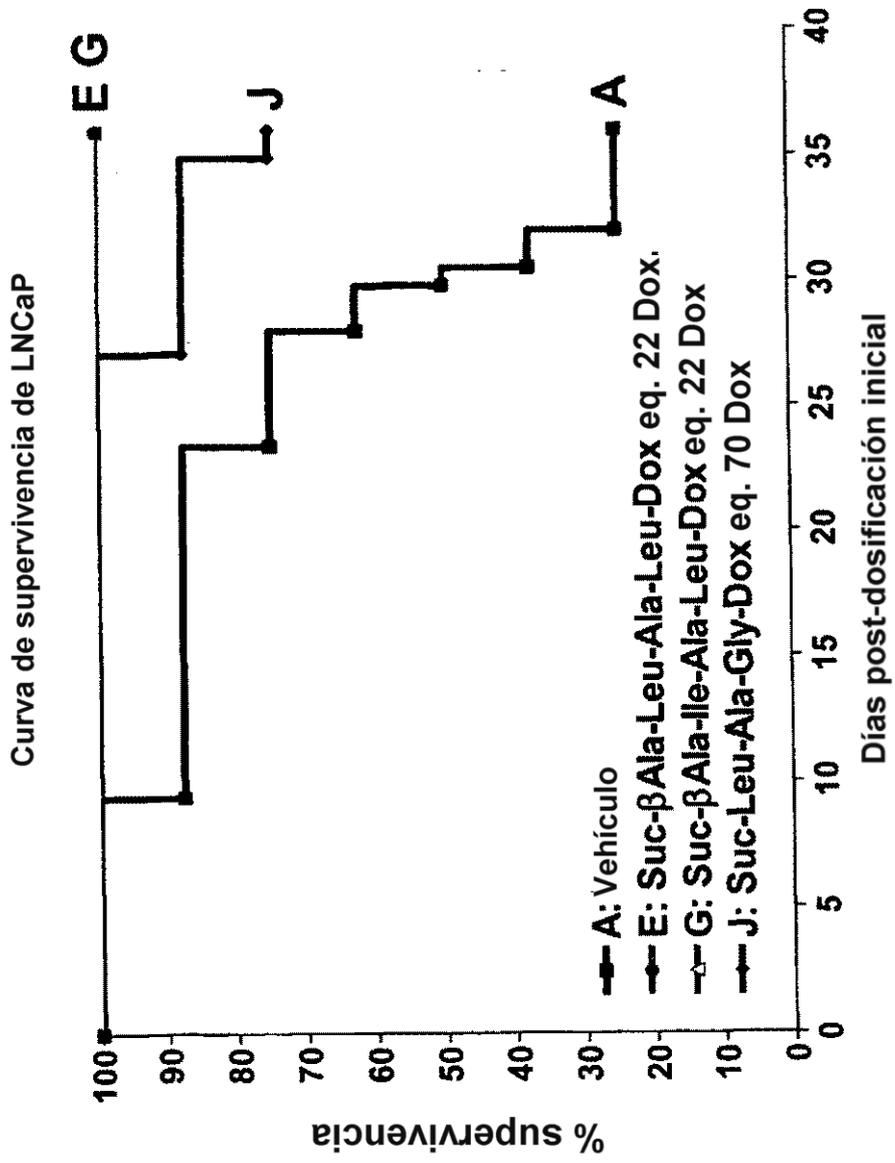


FIG. 34

Ajuste % cambio peso corporal  
(Restado el peso tumoral)

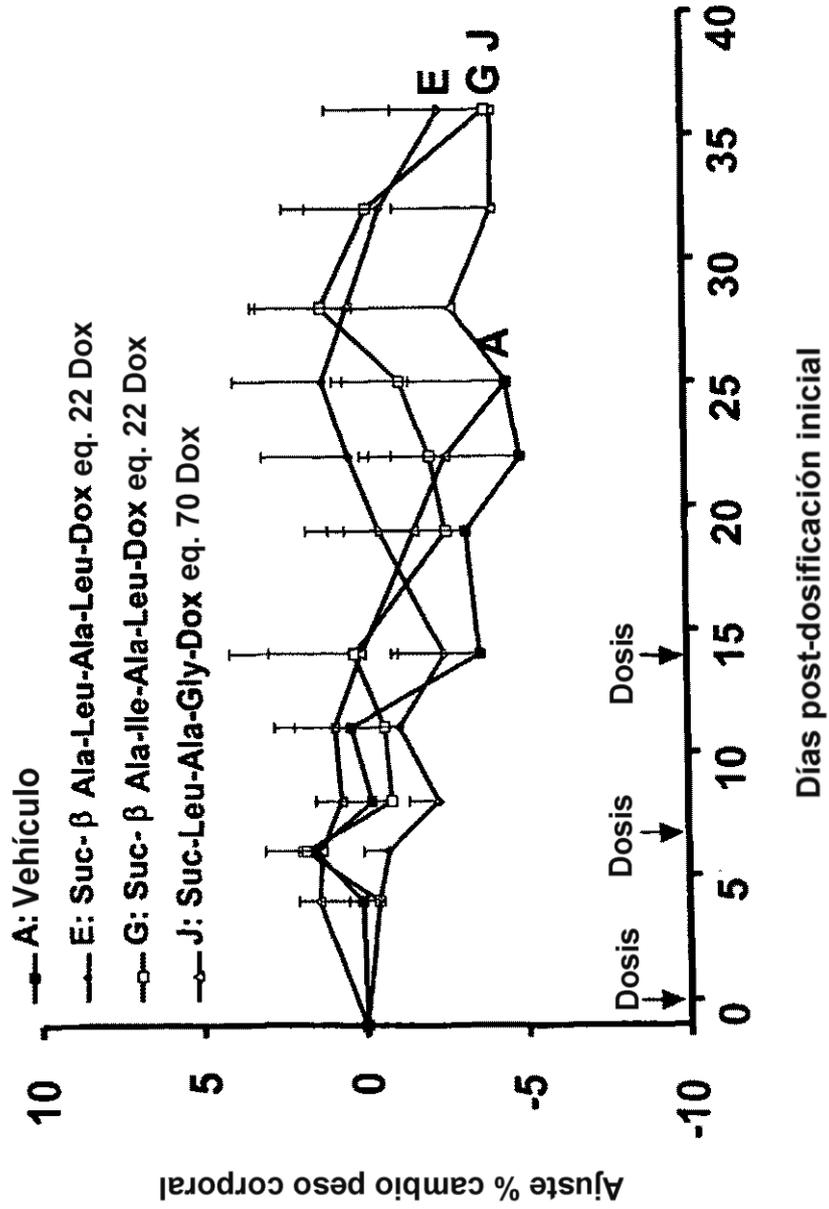


FIG. 35

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9605863 A [0004]
- US 5962216 A [0004] [0114]
- WO 0033888 A [0110] [0114] [0116] [0154]
- WO 0069472 A [0114]
- WO 9852966 A [0114]
- US 5599686 A [0114]
- EP 02746852 A [0372]
- US 0221135 W [0372]
- US 60297596 B [0372]

10

## Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- *Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*, March 2001, vol. 42, 324 [0004]
- Wong-Leung et al. Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney. *Biochem. J.*, 1968, vol. 110, 5P [0118]
- Neprilysin, Turner. Handbook of Proteolytic Enzymes. 1998, 1080-1085 [0118] [0121] [0122] [0123]
- Malfroy et al. High-affinity enkephalin-degrading peptidase is increased after morphine. *Nature*, 1978, vol. 276, 523-526 [0118]
- Devault et al. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J*, 1987, vol. 6, 1317-1322 [0118]
- LeTarte. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J. Exp. Med*, 1988, vol. 168, 1247-1253 [0118]
- Matsas et al. The metabolism of neuropeptides: the hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase-24.11. *Biochem J*, 1984, vol. 223, 433-440 [0119]
- Connelly et al. Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 1985, vol. 86, 7103-7107 [0120]
- Bateman et al. Identification of the active site arginine in rate neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as Arg 102 and analysis of a glutamine 102 mutant. *J. Biol. Chem*, 1989, vol. 264, 6151-6157 [0121]
- Li et al. Neprilysin: Assay Methods, Purification, and Characterization. *Methods in Enzymology*, 1995, vol. 248, 253-263 [0123] [0129] [0131]
- Barker et al. The common acute lymphoblastic leukemia antigen maps to chromosomal region 3(q21-q27). *J. Immunol*, 1989, vol. 142, 283-287 [0124]
- A. J. Kenny. *Trends Biochem. Sci.*, 1986, vol. 11, 40 [0126]
- A. J. Kenny ; S. L. Stephenson ; A. J. Turner. Mammalian Ectoenzymes. Elsevier, 1987, 169 [0127]
- N. Sales ; I. Dutriez ; B. Maziere ; M. Ottaviani ; B.P. Roques. *Regul. Pept.*, 1991, vol. 33, 209 [0127]
- J. N. Baraniuk ; K. Ohkubo ; O. J. Kwon ; J. Mak ; J. Rohde ; M. A. Kaliner ; S. R. Durham ; P. J. Barnes. *J. Appl. Physiol.*, 1993, vol. 74, 272 [0127]
- M. L. Casey ; J. W. Smith ; K. Nagai ; L. B. Hersh ; P.C. MacDonald. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 23041 [0127]
- J. R. Head ; P. C. MacDonald ; M. L. Casey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, vol. 76, 769 [0127]
- G. Waksman ; R. Bouboutou ; J. Devin ; R. Besselievre ; M. C. Fournie-Zaluski ; B. P. Roques. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, vol. 131, 262 [0128]
- J. M. Zajac ; Y. Charnay ; J. M. Soleilhac ; N. Sales ; B. P. Roques. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 216, 118 [0128]
- Indig et al. Investigation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and of neutral proteinases (EC 3.4.24.4) using a new two-stage enzymatic reaction. *FEBS*, 1989, vol. 255, 237-240 [0130]
- Chu et al. Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms: Frequent Expression of Renal Cell Carcinoma and Endometrial Stromal Sarcoma. *Am J Clin Pathol*, 2000, vol. 113, 374-382 [0132] [0134]
- Greaves et al. Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood*, 1983, vol. 61, 628-639 [0133]
- Weiss et al. Lymphoblastic lymphoma: an immunophenotype study of 26 cases with comparison to T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1986, vol. 67, 474-478 [0133]

- **Pozsgay et al.** Substrate and Inhibitor Studies of Thermolysin-like Neutral Metalloendopeptidase From Kidney Membrane Fractions. Comparison with Bacterial Thermolysin. *Biochemistry*, 1986, vol. 25, 1292-1299 [0135]
- **Hersh et al.** Comparison of the Subsite Specificity of the Mammalian Neutral Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) to the Bacterial Neutral Endopeptidase Thermolysin. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, vol. 261, 6433-6437 [0135]
- **Bruce A. Chabner ; Jerry M. Collins.** Cancer Chemotherapy. 1990 [0183]
- **Suzuki et al.** Imbalance between neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-1 expression in human endometrial carcinoma. *Oncology*, 2001, vol. 60, 258-267 [0194]
- **Chu ; Arber.** Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am. J. Pathol.*, 2000, vol. 113, 374-382 [0194]
- **Merrifield.** *J. A. Chem. Soc.*, 1963, vol. 88, 2149 [0199]
- **Bodanszky ; Bodanszky.** The Practice of Peptide Synthesis. Springer-Verlag, 1994, 7-161 [0199]
- **Stewart.** Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical, 1984 [0199]
- **Bodanszky, M.** The Practice of Peptide Synthesis. Springer Verlag, 1984, vol. 185 [0205]
- **Bodanszky, M.** Principles of Peptide Synthesis. Springer Verlag, 1984, vol. 159 [0205]
- **Matzanke, B. F. et al.** *Eur. J. Biochem*, 1992, vol. 207, 747-55 [0212]
- **Chaires, J. B. et al.** *Biochemistry*, 1982, vol. 21, 3927-32 [0212]
- **Hayakawa, E. et al.** *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, vol. 39, 1282-6 [0212]
- **Casimir, J. R. et al.** *Tet. Lett.*, 1995, vol. 36/19, 3409 [0216]
- **Genet, J-P et al.** *Tet. Lett.*, 1994, vol. 50, 497 [0217]
- **Bricout, H. et al.** *Tet. Lett.*, 1998, vol. 54, 1073 [0217]
- **Genet, J-P. et al.** *Synlett*, 1993, vol. 680 [0217]
- **Waldmann, H. et al.** *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, vol. 7, 749 [0217]
- **Shaphiro, G. ; Buechler, D.** *Tet. Lett.*, 1994, vol. 35, 5421 [0217]
- **Wang, S. S. J.** *Am. Chem. Soc.*, 1973, vol. 95, 1328 [0222]
- **Zhang, C. ; Mjaili, A. M. M.** *Tet. Lett.*, 1996, vol. 37, 5457 [0222]
- **Rink, H.** *Tet. Lett.*, 1987, vol. 28, 3787 [0222]
- **Chen, C. et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 2661 [0222]
- **Bartos, K. et al.** *Peptides, Proc. 22nd European Peptide Symposium*, 1992 [0222]
- ESCOM, Leiden. 1993, 281 [0222]
- **Chu ; Arber.** *Am. J. Clin. Pathol.*, 2000, vol. 113, 374-382 [0250]
- **Krongrad et al.** *Urol. Res.*, 1997, vol. 25, 113-116 [0250]
- **Liu.** *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 3429-3434 [0250]
- **DeFeo-Jones et al.** A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. *Nature Medicine*, 2000, vol. 6 (11), 1248-1252 [0286]
- **DeFeo-Jones et al.** *Nature Medicine*, 2000, vol. 6 (11), 1248-1252 [0293]
- **Van der Vijgh.** Comparative metabolism and pharmacokinetics of doxorubicin and 4'-epidoxorubicin in plasma, heart and tumor of tumorbearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1990, vol. 26 (1), 9-12 [0302]
- **Tabrizi-Fard et al.** Evaluation of the Pharmacokinetic Properties of a Doxorubicin Prodrug in Female ICR(CD1®) Mice Following Intravenous Administration. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 2001, vol. 42, 324 [0302]