



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 166**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10153271 .1**
96 Fecha de presentación : **30.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **2177530**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **Octapéptido que tiene actividad antiangiogénica.**

30 Prioridad: **31.10.2001 US 681**
04.10.2002 US 263812

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2011

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Department D377/Ap6A-1
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-6008, US

72 Inventor/es: **Haviv, Fortuna y**
Bradley, Michael, F.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 166 T3

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

DESCRIPCIÓN

Octapéptido que tiene actividad antiangiogénica

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un compuesto para su uso en la inhibición de angiogénesis, para su uso en el tratamiento de cáncer y un compuesto que tiene actividad útil para tratar afecciones que surgen de o empeoran por angiogénesis. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto.

10

Antecedentes de la invención

La angiogénesis es el proceso fundamental por el que se forman nuevos vasos sanguíneos y es esencial para una diversidad de actividades corporales normales (tales como reproducción, desarrollo y reparación de heridas). Aunque el proceso no se entiende completamente, se cree que implica una interacción compleja de moléculas que tanto estimulan como inhiben el crecimiento de células endoteliales, las células primarias de los vasos sanguíneos capilares. En condiciones normales estas moléculas parecen mantener la microvasculatura en un estado quiescente (es decir, uno sin crecimiento capilar) durante periodos prolongados que pueden durar semanas o, en algunos casos, décadas. Sin embargo, cuando es necesario, tal como durante la reparación de heridas, estas mismas células pueden experimentar proliferación rápida y renovación en un periodo tan corto como cinco días.

15

20

25

30

Aunque la angiogénesis es un proceso altamente regulado en condiciones normales, muchas enfermedades (caracterizadas como "enfermedades angiogénicas") están impulsadas por angiogénesis no regulada persistente. Dicho de otro modo, la angiogénesis no regulada puede causar una enfermedad particular directamente o agravar una afección patológica existente. Por ejemplo, se ha mostrado que el crecimiento o metástasis de tumores sólidos es dependiente de angiogénesis. Basándose en estos hallazgos, existe una necesidad continuada de compuestos que demuestren actividad antiangiogénica debido a su potencial uso en el tratamiento de diversas enfermedades tales como cáncer. Se han descrito péptidos que tienen propiedades inhibitorias de angiogénesis en los documentos del mismo solicitante WO 01/38397, WO 01/38347, WO 99/61476, US 5932545 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos US 2003/0050246. Sin embargo, sería deseable preparar compuestos antiangiogénicos que tengan perfiles mejorados de actividad y tamaño menor.

Sumario de la invención

35

En su realización principal, la presente invención proporciona un compuesto que es N-Ac-Gly-Val-D-allo-Ser-Gln-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃ o una sal terapéuticamente aceptable del mismo.

40

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o sal terapéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo terapéuticamente aceptable.

45

En otra realización, la presente invención proporciona el compuesto para su uso en la inhibición de angiogénesis en un mamífero que se reconoce que lo necesite.

En otra realización, la presente invención proporciona el compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero que se reconoce que lo necesite.

Descripción detallada de la invención

50

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", y "el" incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

Como se usa en la presente memoria descriptiva los siguientes términos tienen los significados indicados:

55

El término "alcoxi", como se usa en este documento, representa un grupo alquilo unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.

60

El término "alquilo", como se usa en este documento, representa un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo saturado de cadena ramificada o sencilla por la retirada de un átomo de hidrógeno. Los grupos alquilo preferidos para la presente invención son grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁-C₆). Se prefieren más grupos alquilo de uno a tres átomos de carbono (alquilo C₁-C₃) para la presente invención.

El término "alquilcarbonilo", como se usa en este documento, representa un grupo alquilo unido al resto molecular parental a través de un grupo carbonilo.

65

El término "aminoácido", como se usa en este documento, representa NR^aR^b, seleccionándose R^a y R^b de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y alquilcarbonilo.

El término "arilo", como se usa en este documento, representa un grupo fenilo o un sistema de anillo fusionado tricíclico o bicíclico en el que uno o más de los anillos fusionados es un grupo fenilo. Los sistemas de anillos fusionados bicíclicos se ejemplifican por un grupo fenilo fusionado con un grupo cicloalqueno, como se define en este documento, un grupo cicloalquilo, como se define en este documento, u otro grupo fenilo. Los sistemas de anillos fusionados tricíclicos se ejemplifican por un sistema de anillo fusionado bicíclico fusionado con un grupo cicloalqueno, como se define en este documento, un grupo cicloalquilo, como se define en este documento u otro grupo fenilo. Los ejemplos representativos de arilo incluyen, pero sin limitación, antraceno, azuleno, fluoreno, indano, indeno, naftilo, fenilo y tetrahidronaftilo. Los grupos arilo de la presente invención pueden sustituirse opcionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

El término "carbonilo", como se usa en este documento, representa -C(O)-.

El término "carboxilo", como se usa en este documento, representa -CO₂H.

El término "cicloalqueno", como se usa en este documento, se refiere a un sistema de anillo cíclico o bicíclico no aromático que tiene de tres a diez átomos de carbono y de uno a tres anillos, en el que cada anillo de cinco miembros tiene un doble enlace, cada anillo de seis miembros tiene uno o dos dobles enlaces, cada anillo de siete y ocho miembros tiene de uno a tres dobles enlaces y cada anillo de nueve a diez miembros tienen de uno a cuatro dobles enlaces. Los ejemplos de grupos cicloalqueno incluyen ciclohexeno, octahidronaftaleno, norbornileno y similares. Los grupos cicloalqueno de la presente invención pueden sustituirse opcionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

El término "cicloalquilo", como se usa en este documento, se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico, bicíclico o tricíclico saturado que tiene de tres a doce átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, biciclo[3.1.1]heptilo, adamantilo y similares. Los grupos cicloalquilo de la presente invención pueden sustituirse opcionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

El término "halo", como se usa en este documento, representa F, Cl, Br o I.

El término "heterociclo", como se usa en este documento, se refiere a un anillo de cinco, seis o siete miembros que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de cinco miembros tiene de cero a dos dobles enlaces y los anillos de seis y siete miembros tienen de cero a tres dobles enlaces. El término "heterociclo" también incluye grupos bicíclicos en los que el anillo heterociclo está fusionado con un grupo arilo, como se define en este documento. Los grupos heterociclo de la presente invención pueden unirse a través de un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno en el grupo. Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero sin limitación, furilo, tienilo, pirrolilo, pirrolidinilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, imidazonililo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperazinilo, piridinilo, indolilo, indolinilo, benzotienilo y similares. Los grupos heterociclo de la presente invención pueden sustituirse opcionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en alcoxi, alquilo, carboxilo, halo e hidroxilo.

El término "hidroxilo", como se usa en este documento, representa -OH.

La expresión "sal terapéuticamente aceptable", como se usa en este documento, representa sales o formas zwitterionicas de los compuestos de la presente invención que son dispersables o solubles en agua o aceite, que son adecuados para tratamiento de enfermedades sin toxicidad, irritación y respuesta alérgica indebida; que son proporcionados con una relación de beneficio/riesgo razonable y que son eficaces para su uso pretendido. Las sales pueden prepararse durante el aislamiento o purificación final de los compuestos o de forma separada haciendo reaccionar un grupo amino con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metanosulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, paratoluenosulfonato y undecanoato. Además, los grupos amino en los compuestos de la presente invención pueden cuaternizarse con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esterilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición terapéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico y cítrico.

A no ser que se indique de otro modo por un prefijo "D", por ejemplo, D-Ala o NMe-D-Ile, la estereoquímica del

5 carbono α de los aminoácidos y restos aminoacídicos en péptidos descritos en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas es la configuración natural o "L". Se usan las designaciones "R" y "S" de Cahn-Ingold-Prelog para especificar la estereoquímica de centros quirales en ciertos sustituyentes de acilo en el extremo N-terminal de los péptidos de la presente invención. La designación "R,S" pretende indicar una mezcla racémica de las dos formas enantioméricas. Esta nomenclatura sigue la descrita en R.S. Cahn, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 5, 385-415 (1966).

10 Todas las secuencias peptídicas se escriben de acuerdo con la convención generalmente aceptada por la que el resto aminoacídico α -N-terminal está a la izquierda y el α -C-terminal está a la derecha. Como se usa en este documento, el término " α -N-terminal" se refiere al grupo amino α libre de un aminoácido en un péptido y el término " α -C-terminal" se refiere al extremo de ácido carboxílico α libre de un aminoácido en un péptido.

15 En su mayor parte, los nombres de restos aminoacídicos de origen natural o de origen no natural usados en este documento siguen las convenciones de denominación sugeridas por la Comisión de Nomenclatura de Química Orgánica de IUPAC y la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB como se expone en "Nomenclature of α -Amino Acids (Recommendations, 1974)" *Biochemistry*, 14(2), (1975). En tanto que los nombres y abreviaturas de aminoácidos y restos aminoacídicos empleados en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas difieren de esas sugerencias, se aclararán al lector. Algunas abreviaturas útiles en la descripción de la invención se definen a continuación en la siguiente Tabla 1.

20

Tabla 1

Abreviatura	Definición
Ala	alanilo
AlaNH ₂	alanilamida
alle	aloisoleucilo
alloThr	alotreonilo
alloThr(t-Bu)	alotreonilo(O-t-butilo)
Arg	arginilo
Arg(Pmc)	arginil(N ^G -2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	N-Fmoc-N ^G -(2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)arginina
Asn	asparaginila
Asn(Trt)	asparaginil(tritilo)
Asp	aspartilo
Asp(Ot-Bu)	aspartil(O-t-butilo)
Cit	citruililo
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Gln	glutaminilo
Gln(Trt)	glutaminil(tritilo)
Glu	glutamilo
NMeGlu	N-metilglutamilo
NMeGlu(t-Bu)	N-metilglutamil(t-butilo)
Gly	glicilo
His	histidilo
His(Trt)	histidil(tritilo)
Hser	homoserilo
Ile	isoleucilo
Leu	leucilo
Lys(Ac)	lisil(N-epsilon-acetilo)

Abreviatura	Definición
Met	metionilo
6-Me-nicotinyl	6-metilnicotinilo
Nle	norleucilo
Nva	norvalilo
NMeNva	N-metilnorvalilo
Orn(Ac)	ornitil(N-delta-acetilo)
Pen	penicilaminilo
Phe	fenilalanilo
(4-CH ₃)Phe	4-metilfenilalanilo
(4-CN)Phe	4-cianofenilalanilo
NMePhe	N-metilfenilalanilo
Pro	prolilo
ProNHCH ₂ CH ₃	proliletilamida
3-Pal	3-(3-piridil)alanilo
Sar	sarcosilo
Ser	serilo
Ser(t-Bu)	seril(O-t-butilo)
Thr	treonilo
Thr(t-Bu)	treonil(O-t-butilo)
Trp	triptilo
Trp(Boc)	triptil(t-butoxicarbonilo)
Tyr	tirosilo
Tyr(t-Bu)	tirosil(O-t-butilo)
Val	valilo
NMeVal	N-metilvalilo

Quando no se halle en la tabla anterior, la nomenclatura y abreviaturas pueden clarificarse adicionalmente por referencia a Calbiochem-Novabiochem Corp. 1999 Catalog and Peptide Synthesis Handbook o el catálogo Chem-Impex International, Inc. Tools for Peptide & Solid Phase Synthesis 1998-1999.

5

Composiciones

Los compuestos de la invención, incluyendo sin limitación los especificados en los ejemplos, poseen actividad antiangiogénica. Como inhibidores de angiogénesis, tales compuestos son útiles en el tratamiento de tumores sólidos tanto primarios como metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cérvix, útero y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo las glándulas tiroideas, adrenal e hipófisis) y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los que surgen de hueso y tejidos blandos así como sarcoma de Kaposi) y tumores del cerebro, nervios, ojos y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas). Tales compuestos también pueden ser útiles en el tratamiento de tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemias (es decir, cloromas, plasmacitomas y las placas y tumores de micosis fungoide y linfoma/leucemia de linfocitos T cutánea) así como en el tratamiento de linfomas (tanto linfomas de Hodgkin como no de Hodgkin). Además, estos compuestos pueden ser útiles en la prevención de metástasis de los tumores descritos anteriormente cuando se usan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes

10

15

20

quimioterapéuticos.

Los usos adicionales incluyen el tratamiento o profilaxis de enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, inmune y degenerativa; diversas enfermedades oculares tales como retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneal, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, rubeosis, neovascularización retinal debido a degeneración de la mácula, hipoxia, angiogénesis en el ojo asociada con infección o intervención quirúrgica y otras afecciones de neovascularización anómala del ojo; enfermedades cutáneas tales como psoriasis; enfermedades de vasos sanguíneos tales como hemangiomas y proliferación capilar con placas ateroscleróticas; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de placas; telangectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma y granulación de heridas. Otros usos incluyen el tratamiento de enfermedades caracterizadas por estimulación excesiva o anómala de células endoteliales, incluyendo sin limitación adhesiones intestinales, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas (es decir, queloides). Otro uso es como un agente de control de la natalidad, inhibiendo la ovulación y el establecimiento de la placenta. Los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de enfermedades que tienen la angiogénesis como una consecuencia patológica tal como enfermedad por arañazo de gato (*Rochelel minutesalia quintosa*) y úlceras (*Helicobacter pylori*). Los compuestos de la invención son también útiles para reducir la hemorragia por administración antes de cirugía, especialmente para el tratamiento de tumores resecables.

Los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otras composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, un tumor puede tratarse de forma convencional con cirugía, radiación o quimioterapia combinado con un péptido de la presente invención y después un péptido de la presente invención puede posteriormente administrarse al paciente para prolongar la latencia de micrometástasis y para estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier tumor primario residual. Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación prolongada, tales como polímeros biodegradables para formar composiciones terapéuticas.

Una matriz de liberación prolongada, como se usa en este documento, es una matriz compuesta de materiales, habitualmente polímeros que son degradables por hidrólisis ácido-base o enzimática o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, sobre la matriz actúan enzimas y fluidos corporales. Una matriz de liberación prolongada idealmente se selecciona a partir de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), coglicolida de polilactida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitín sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de una de polilactida, poliglicolida o polilactida coglicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Cuando se usa en el tratamiento anterior u otros, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos de la presente invención puede emplearse en forma pura o, cuando existen tales formas, en forma de sal farmacéuticamente aceptable. Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto de la invención se entiende una cantidad suficiente del compuesto para tratar una enfermedad angiogénica (por ejemplo, para limitar el crecimiento tumoral o para ralentizar o bloquear la metástasis tumoral) a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico a cargo dentro del alcance del criterio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, vía de administración y tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado.

Como alternativa, un compuesto de la presente invención puede administrarse como composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de interés en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral, vía intracisternal, vía intravaginal, vía intraperitoneal, tópica (como por polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), vía rectal o vía bucal. El término "parenteral" como se usa en este documento se refiere a modos de administración que incluyen infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Las composiciones farmacéuticas para inyección parenteral comprenden soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables estériles así como polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos o no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como

glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como etiloleato. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas de liberación prolongada inyectables se realizan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres), poli(anhídridos) y (poli)glicoles, tales como PEG. Dependiendo de la relación de fármaco y polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación de fármaco puede controlarse. También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso.

La administración tópica incluye administración a la piel o mucosa, incluyendo superficies del pulmón y el ojo. Las composiciones para administración tópica, incluyendo las de inhalación, pueden prepararse como un polvo seco que puede estar presurizado o no presurizado. En composiciones de polvo no presurizado, el principio activo en forma finamente dividida puede usarse en mezcla con un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable de tamaño mayor que comprende partículas que tienen un tamaño, por ejemplo, de hasta 100 micrómetros de diámetro. Los vehículos inertes adecuados incluyen azúcares tales como lactosa. Idealmente, al menos el 95 % en peso de las partículas del principio activo tienen un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros.

Como alternativa, la composición puede presurizarse y contener un gas comprimido, tal como nitrógeno o un propulsor de gas licuado. El medio propulsor licuado y de hecho la composición total es preferentemente tal que el principio activo no se disuelve en el mismo en ningún grado sustancial. La composición presurizada también puede contener un agente tensioactivo, tal como un agente tensioactivo líquido o sólido no iónico o puede ser un agente tensioactivo aniónico sólido. Se prefiere usar el agente tensioactivo aniónico sólido en forma de una sal sódica.

Una forma adicional de administración tópica es al ojo. Un compuesto de la invención se suministra en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de modo que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones corneal e interna del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser una pomada, aceite vegetal o un material encapsulante. Como alternativa, los compuestos de la invención pueden inyectarse directamente en el humor vítreo y acuoso.

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

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas generalmente derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido metabolizable y fisiológicamente aceptable no tóxico capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Se conocen en la técnica procedimientos para formar liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), p. 33 y siguientes.

Aunque los compuestos de la invención pueden administrarse como el único agente farmacéutico activo, también pueden usarse en combinación con uno o más agentes que se administran convencionalmente a pacientes para tratar enfermedades angiogénicas. Por ejemplo, los compuestos de la invención son eficaces durante un periodo corto para hacer a los tumores más sensibles a terapias citotóxicas tradicionales tales como compuestos químicos y radiación. Los compuestos de la invención también potencian la eficacia de terapias antineoplásicas con adyuvantes citotóxicos existentes. Los compuestos de la invención también pueden combinarse con otros agentes antiangiogénicos para potenciar su eficacia o combinarse con otros agentes antiangiogénicos y administrarse junto

con otros agentes citotóxicos. En particular, cuando se usan en el tratamiento de tumores sólidos, los compuestos de la invención pueden administrarse con IL-12, retinoides, interferones, angiostatina, endostatina, talidomida, trombospondina 1, trombospondina 2, captoprilo, angioinhibinas, TNP-470, pentosan polisulfato, factor plaquetario 4, LM-609, SU-5416, CM-101, Tecogalan, plasminógeno K-5, vasostatina, vitaxina, vasculostatina, escualamina, marimastat u otros inhibidores de MMP, agentes antineoplásicos tales como interferón alfa, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, belomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PRO-MACE/MOPP (prednisona, metotrexato (con rescate de leucovin), doxorubicina, ciclofosfamida, cisplatino, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbina), vincristina, vinblastina y similares y así como con radiación.

La dosis diaria total de las composiciones de la invención a administrar a un ser humano u otro huésped mamífero en dosis sencillas o divididas puede estar en cantidades, por ejemplo, de 0,0001 a 300 mg/kg de peso corporal diariamente y más habitualmente de 1 a 300 mg/kg de peso corporal.

Se entenderá que los agentes que pueden combinarse con los compuestos de la presente invención para la inhibición, tratamiento o profilaxis de enfermedades angiogénicas no se limitan a los enumerados anteriormente, sino que incluyen en principio cualquier agente útil para tratamiento o profilaxis de enfermedades angiogénicas.

Determinación de Actividad Biológica

Ensayo *in vitro* para Actividad Angiogénica

El ensayo de migración endotelial microvascular humana (HMVEC) se realizó de acuerdo con el procedimiento de S. S. Tolsma, O. V. Volpert, D. J. Good, W. F. Frazier, P. J. Polverini y N. Bouck, J. Cell Biol. 1993,122, 497-511.

El ensayo de migración de HMVEC se llevó a cabo usando Células Endoteliales Microvasculares Humanas dérmicas (donante sencillo) y Células Endoteliales Microvasculares Humanas (neonatal). Las células HMVEC se sometieron a inanición durante una noche en DME que contenía albúmina de suero bovino (BSA) 0,01 %. Después se recogieron las células con tripsina y se resuspendieron en DME con BSA 0,01 % a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células por ml. Las células se añadieron al fondo de una cámara Boyden modificada de 48 pocillos (Nucleopore Corporation, Cabin John, MD). La cámara se ensambló y se invirtió y se permitió que las células se unieran durante 2 horas a 37 °C a membranas de quimiotaxis de policarbonato (tamaño de poro 5 μ m) que se habían empapado en gelatina 0,01 % durante una noche y se habían secado. La cámara se volvió a invertir después y se añadieron sustancias de ensayo (volumen total de 50 μ l), incluyendo activadores, bFGF/VEGF 15 ng/ml, a los pocillos de la cámara superior. El aparato se incubó durante 4 horas a 37 °C. Las membranas se recuperaron, fijaron y tiñeron (Diff Quick, Fisher Scientific) y se contó el número de células que habían migrado a la cámara superior por tres campos de alta potencia. Se restó la migración de fondo a DME + BSA 0,1 y los datos se indicaron como el número de células migradas por 10 campos de alta potencia (400X) o, cuando se combinaron resultados de múltiples experimentos, como el porcentaje de inhibición de la migración en comparación con un control positivo.

Los compuestos representativos inhibieron la migración de células endoteliales humanas en el ensayo anterior al menos el 50 % cuando se ensayaron a una concentración de 1 nM. Los compuestos preferidos inhibieron la migración de células endoteliales humanas en aproximadamente 65 % a 90 % cuando se ensayaron a una concentración de 1 nM y la mayoría de los compuestos preferidos inhibieron la migración de células endoteliales humanas en aproximadamente 50 % a 95 % a una concentración de 0,1 nM. Como se muestra por estos resultados, los compuestos de la presente invención demuestran potencia mejorada.

Síntesis de los péptidos

La presente invención pretende abarcar compuestos que tienen fórmula (I) cuando se preparan por procesos sintéticos o por procesos metabólicos. La preparación de los compuestos de la invención por procesos metabólicos incluye los que se dan en el cuerpo animal o humano (*in vivo*) o los procesos que ocurren *in vitro*.

Los polipéptidos de la presente invención pueden sintetizarse por muchas técnicas que se conocen por los expertos en la materia. Para síntesis peptídica en fase sólida, puede encontrarse un sumario de las múltiples técnicas en J.M. Stewart y J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 y J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (Nueva York), 1973. Para síntesis en solución clásica véase G. Schroder y K. Lupke, The Peptides, vol. 1, Academic Press (Nueva York), 1965.

Los reactivos, resinas, aminoácidos y derivados de aminoácidos están disponibles en el mercado y pueden obtenerse de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL, Estados Unidos.) o Calbiochem Novabiochem Corp. (San Diego, CA, Estados Unidos.) a no ser que se indique de otro modo en este documento.

En general, estos métodos comprenden la adición secuencial de uno o más aminoácidos o aminoácidos protegidos de forma adecuada a una cadena peptídica creciente. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido se protege por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivatizado puede después

unirse a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) protegido de forma adecuada, en condiciones adecuadas para formar el enlace amida. El grupo de protección se retira después de este resto aminoacídico nuevamente añadido y se añade el siguiente aminoácido (protegido de forma adecuada) y así sucesivamente. Después de que se hayan ligado todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, se retira cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido) secuencialmente o simultáneamente, para producir el polipéptido final. Por modificación sencilla de este procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido a la vez a una cadena creciente, por ejemplo, acoplando (en condiciones que no racemizan centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido protegido de forma apropiada para formar, después de la desprotección, un pentapéptido.

Un método particularmente preferido para preparar compuestos de la presente invención implica síntesis peptídica de fase sólida. En este método particularmente preferido la función α -amino se protege por un grupo sensible a ácido o base. Tales grupos de protección deberían tener las propiedades de ser estables en las condiciones de formación de enlace peptídico, siendo a la vez fácilmente movable sin destrucción de la cadena peptídica creciente o la racemización de cualquiera de los centros quirales contenidos en la misma. Los grupos de protección adecuados son 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), t-butoxicarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Cbz), bifenilisopropil-oxycarbonilo, t-amiloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo, (α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxycarbonilo, O-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-t-butiloxycarbonilo y similares. Se prefiere el grupo de protección 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc).

Son grupos de protección de cadena lateral particularmente preferidos: para arginina: 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) y 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-S-sulfonilo (Pbf); para asparagina: tritilo (Trt); para ácido aspártico: t-butilo (t-Bu); para glutamina: tritilo (Trt); para ácido N-metilglutámico: t-butilo (t-Bu); para histidina: tritilo (Trt); para lisina: t-butoxicarbonilo (Boc); para serilo: t-butilo (t-Bu); para treonina y alotreonina: t-butilo (t-Bu); para triptófano: t-butoxicarbonilo (Boc); y para tirosina: t-butilo (t-Bu).

En el método de síntesis peptídica de fase sólida, el aminoácido C-terminal se une a una resina o soporte sólido adecuado. Los soportes sólidos adecuados útiles para la síntesis anterior son los materiales que son inertes para los reactivos y condiciones de reacción de las reacciones de desprotección-condensación por etapas, así como insolubles en el medio usado. El soporte sólido preferido para síntesis de péptidos de carboxilo C-terminal es la resina de amida Sieber o resina de etilamida Sieber. El soporte sólido preferido para péptidos de amida C-terminal es resina de etilamida Sieber disponible de Novabiochem Corporation.

El aminoácido C-terminal se acopla a la resina por medio de un acoplamiento mediado por N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), [O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato] (HATU) u O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluorofosfato (HBTU), con o sin 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), N-metilmorfolina (NMM), benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio-hexafluorofosfato (BOP) o cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfina (BOPCl), durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas a temperatura de entre 10 °C y 50 °C en un disolvente tal como diclorometano o DMF.

Cuando el soporte sólido es resina de etilamida Sieber o amida Sieber, el grupo Fmoc se escinde con una amina secundaria, preferiblemente piperidina, antes de acoplamiento con el aminoácido C-terminal como se ha descrito anteriormente. Los reactivos preferidos usados en el acoplamiento con la resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamidoetil desprotegida son O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluorofosfato (HI3TU, 1 equivalente) con 1-hidroxibenzotriazol (HOBT, 1 equivalente) o [O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato] (HATU, 1 equivalente) con N-metilmorfolina (1 equivalente) en DMF.

El acoplamiento de aminoácidos protegidos sucesivos puede llevarse a cabo en un sintetizador de polipéptidos automático como se conoce bien en la técnica. En una realización preferida, la función α -amino en los aminoácidos de la cadena peptídica creciente se protegen con Fmoc. La retirada del grupo protector Fmoc del lado N-terminal del péptido creciente se consigue por tratamiento con una amina secundaria, preferiblemente piperidina. Cada aminoácido protegido se introduce después en un exceso de aproximadamente 3 veces molar y el acoplamiento se lleva a cabo preferiblemente en DMF. El agente de acoplamiento es normalmente O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluorofosfato (HBTU, 1 equivalente) o [O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato] (HATU, 1 equivalente) en presencia de N-metilmorfolina (NMM, 1 equivalente).

Al final de la síntesis de fase sólida, el polipéptido se retira de la resina y se desprotege, en sucesión o en una operación sencilla. La retirada del polipéptido y desprotección puede conseguirse en una operación sencilla tratando el polipéptido unido a resina con un reactivo de escisión, por ejemplo ácido trifluoroacético que contiene tianisol, agua o etanodiol.

En casos en los que el extremo C-terminal del polipéptido es una alquilamida, la resina se escinde por aminólisis con una alquilamina. Como alternativa, el péptido puede retirarse por transesterificación, por ejemplo, con metanol, seguido de aminólisis o por transamidación directa. El péptido protegido puede purificarse en este punto o llevarse directamente a la siguiente etapa. La retirada de los grupos protectores de cadena lateral se consigue usando el cóctel de escisión descrito anteriormente.

5 El péptido completamente desprotegido se purifica por una secuencia de etapas cromatográficas que emplean cualquiera o todos de los siguientes tipos: intercambio iónico en una resina básica débil en forma de acetato; cromatografía de adsorción hidrófoba en poliestireno-divinilbenceno no derivatizado (por ejemplo, AMBERLITE® XAD); cromatografía de adsorción en gel de sílice; cromatografía de intercambio iónico en carboximetilcelulosa; cromatografía de partición, por ejemplo, en SEPHADEX® G-25, LH-20 o distribución contracorriente; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), especialmente HPLC de fase inversa en empaquetamiento de columna de fase unida a sílice de octilo u octadecilsililo.

10 Lo anterior puede entenderse mejor a la luz de los ejemplos con los que se pretende describir compuestos y procesos que pueden llevarse a cabo de acuerdo con la invención y no se pretenden como limitación del alcance de la invención de ningún modo.

15 Las abreviaturas que se han usado en los siguientes ejemplos son: DMF para N,N-dimetilformamida; HBTU para O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluorofosfato; NMM para N-metilmorfolina; y TFA para ácido trifluoroacético.

Ejemplo Comparativo 1

20 N-Ac-Gly-Val-D-Ile-Thr-Nva-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃

En el recipiente de reacción de un sintetizador peptídico Rainin se colocó resina de etilamida Fmoc-ProSieber (0,25 g, carga de 0,4 mmol/g). La resina se solvató con DMF y se acoplaron aminoácidos secuencialmente de acuerdo con el siguiente ciclo sintético:

- 25
- (1) lavados 3 x 1,5 minutos con DMF;
 - (2) desprotección 2 x 15 minutos usando piperidina 20 %;
 - (3) lavados 6 x 3 minutos con DMF;
 - (4) adición de aminoácidos;
 - 30 (5) activación de aminoácido con HBTU/NMM 0,4 M y acoplamiento;
 - (6) lavados 3 x 1,5 minutos con DMF.

Los aminoácidos protegidos se acoplaron a resina en el siguiente orden:

Aminoácido Protegido	Tiempo de acoplamiento
Fmoc-Arg(Pmc)	30 minutos
Fmoc-Ile	30 minutos
Fmoc-Nva	30 minutos
Fmoc-Thr(t-Bu)	30 minutos
Fmoc-D-Ile	30 minutos
Fmoc-Val	30 minutos
Fmoc-Gly	30 minutos
ácido acético	30 minutos -

35 Tras la compleción de la síntesis el péptido se escindió de la resina usando una mezcla de TFA/anisol/agua (95:2,5:2,5) durante 3 horas. La solución peptídica se concentró en vacío y después se precipitó con dietil éter y se filtró. El péptido en bruto se purificó por HPLC usando una columna C-18 y un sistema de disolvente que variaba durante 50 minutos en un gradiente de 5 % a 100 % de acetonitrilo/agua que contenía TFA 0,01 %. Las fracciones puras se liofilizaron para proporcionar N-Ac-Gly-Val-D-Ile-Thr-Nva-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃ como la sal trifluoroacetato: R_f = 3,16 minutos (gradiente que varía durante 10 minutos de 20 % a 80 % de acetonitrilo/agua que contiene TFA 0,01 %); MS (ESJ) m/e 923 (M+H)⁺; Anal. de aminoácidos : Gly 0,96; Val 1,01; Ile 1,98; Thr 0,46; Nva 0,94; Arg 1,03; Pro 0,98.

Ejemplo 2

45 N-Ac-Gly-Val-D-alle-Ser-Gln-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃

El producto deseado se preparó sustituyendo Fmoc-O-Ile con Fmoc-D-alle, Fmoc-Thr(t-Bu) con Fmoc-Ser (t-Bu) y Fmoc-Nva con Fmoc-Gln(Trt) en el Ejemplo 1. Después de la escisión del péptido de la resina y tratamiento se purificó el producto en bruto por HPLC usando una columna C-18 y un sistema de disolvente que variaba durante 50 minutos en un gradiente acetonitrilo/agua de 5 % a 100 % que contenía TFA 0,01 %. Las fracciones puras se

liofilizaron para proporcionar N-Ac-Gly-Val-D-alle- Ser-Gln-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃ como la sal de trifluoroacetato: R₁ = 2,39 minutos (gradiente que variaba durante 10 minutos de acetonitrilo/agua de 20 % a 80 % que contenía TFA 0,01 %); MS (ESI) m/e 938,5 (M+H)⁺; Anal. de aminoácidos: Gly 1,00; Val 0,95; Ile 2,10; Ser 0,33; Glu 1,04; Arg 1,02; Pro 1,04.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que es N-Ac-Gly-Val-D-alle-Ser-Gln-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃ o una sal terapéuticamente aceptable del mismo.
2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1, o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo terapéuticamente aceptable.
- 10 3. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inhibición de angiogénesis en un mamífero que se reconozca que lo necesite.
4. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal terapéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero que se reconozca que lo necesite.