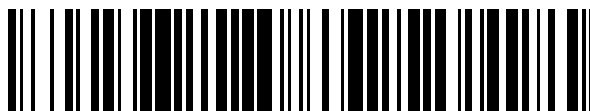


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 334**

51 Int. Cl.:
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09721455 .5**
96 Fecha de presentación: **13.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2293807**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2011**

54 Título: **Derivados de ciclopenta[g]quinazolina para el tratamiento de la artritis reumatoide o la leucemia mielocítica aguda**

30 Prioridad:
18.03.2008 GB 0805035
18.03.2008 GB 0805036

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2012

73 Titular/es:
BTG International Limited
5 Fleet Place
London EC4M 7RD, GB

72 Inventor/es:
JANSEN, Gerrit y
JACKMAN, Ann

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 334 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

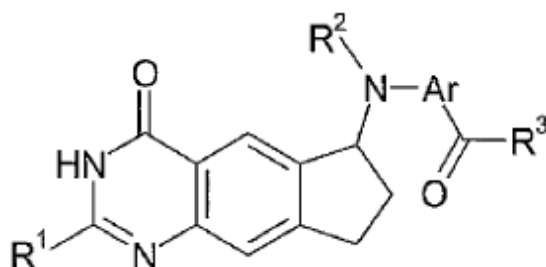
Derivados de ciclopenta[g]quinazolina para el tratamiento de la artritis reumatoide o la leucemia mielocítica aguda

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a la utilización de derivados de ciclopenta[g]quinazolina. Más particularmente se refiere a derivados de ciclopenta[g]quinazolina para el tratamiento de la leucemia mielocítica aguda (LMA).

Se han desarrollado derivados de ciclopenta[g]quinazolina que presentan un buen nivel de actividad tanto en cuanto a su capacidad para inhibir la timidilato sintasa (TS) como también en cuanto a su actividad anticancerosa contra varias estirpes celulares.

El documento WO 94/11354 A1 (British Technology Group Limited) describe compuestos tricíclicos de fórmula:



10

en la que R¹ es hidrógeno, amino, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄ o fluoroalquilo C₁₋₄;

R² es hidrógeno, alquilo C₁₋₄, alqueno C₃₋₄, alquino C₃₋₄, hidroxialquilo C₂₋₄, halogenoalquilo C₂₋₄ o cianoalquilo C₁₋₄;

Ar es fenileno, tiofenodiilo, tiazoldiilo, piridindiilo o pirimidindiilo que puede llevar opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados de entre halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄; y

15

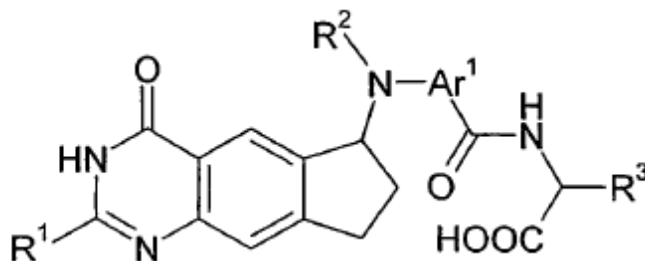
R³ es un grupo de una de las fórmulas siguientes:



o R³ es un aminoácido natural con N ligado seleccionado entre el grupo consistente en L-alanina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina y L-fenilalanina. Entre los compuestos descritos está el compuesto CB300638 L-Glu-γ-D-Glu, mencionado también en *Clinical Cancer Research*, **5**, noviembre de 1999 (Suplemento) en el nº 566 (Theti *et al.*) y en *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, **41**, marzo de 2000 en el nº 33 (Jackman *et al.*), así como en *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 1910-1926, donde se describe en la página 1923 como compuesto **7b**.

20

El documento WO 95/30673 A1 (British Technology Group Limited) da a conocer ciclopenta-[g]quinazolininas de fórmula:



25

en la que R¹ es hidrógeno, amino, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄ o fluoroalquilo C₁₋₄;

R² es hidrógeno, alquilo C₁₋₄, alqueno C₃₋₄, alquino C₃₋₄, hidroxialquilo C₂₋₄, halogenoalquilo C₂₋₄ o cianoalquilo C₁₋₄;

Ar¹ es fenileno, tiofenodiilo, tiazoldiilo, piridindiilo o pirimidindiilo que puede llevar opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados de entre halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄; y

R³ es un grupo de una de las fórmulas siguientes:



La isoforma α del receptor de folato (FR- α , proteína de unión al folato asociada a la membrana) es una proteína de la membrana celular anclada a glicosilfosfatidilinositol que tiene una afinidad muy elevada por el ácido fólico y los folatos reducidos más biológicamente relevantes (Kd ~ 0,1 nM). El mecanismo de interiorización de folato es la endocitosis mediada por el receptor. La FR- α se sobreexpresa en muchos carcinomas, especialmente los de origen ovárico en los que se sobreexpresa en gran medida y de manera homogénea en el 90% de los casos, véase *Cancer Res.* **51**, 5329-5338, 1991 (Campbell *et al.*, 1991). Por otra parte, de alta expresión de FR- α se ha asociado a una enfermedad agresiva, resistente al platino y de mal pronóstico véase *Int. J. Cancer* **74**, 193-198, 1997 e *Int. J. Cancer* **79**, 121-126, 1998 (tambas de Toffoli *et al.*). La isoforma β se expresa ampliamente en tumores de origen epitelial y no epitelial, con los niveles de expresión que generalmente son bajos, moderados y altos, respectivamente, examinados en *Critical Rev. Therap.. en Drug Carrier Systems* **15**, 587-627, 1998 (Reddy and Low).

Los receptores de folato (α y β) se expresan en algunos tejidos adultos normales (expresión baja a moderada). Se ha publicado que determinados compuestos dentro de la clase general de ciclopenta-[g]-quinazolininas tienen un alto nivel de selectividad para el receptor de folato α que expresa estirpes celulares tumorales humanas frente a la afinidad por el PFR (portador de folato reducido), Dichos compuestos se describen en el documento WO 03/020300 A1, WO 03/020706 A1 y WO 03/020748 A1 (BTG International Limited). Entre los compuestos descritos está el compuesto CB300945 L-Glu- γ -D-Glu, también mencionado en *Tetrahedron*, **63** (7), 12 de febrero de 2007, 1537-1543 (Bavetsias *et al.*) y *Cancer Research* **65**, 15 de diciembre de 2005, 11721 a 11728 (Gibbs *et al.*).

FR- β se encuentra normalmente en los tejidos de placenta y en células hematopoyéticas, donde se expresa en el linaje mielomonocítico y está particularmente elevado durante la maduración de neutrófilos o durante la activación de monocitos o macrófagos. Sin embargo, el FR- β expresado en las células hematopoyéticas normales, a diferencia de en los macrófagos activados por ejemplo, no es funcional porque no puede unirse e interiorizar folato. FR- β se expresa en las células cancerosas de pacientes con leucemia mielógena crónica (LMC), y en las células cancerosas de aproximadamente 70% de los pacientes con AML.

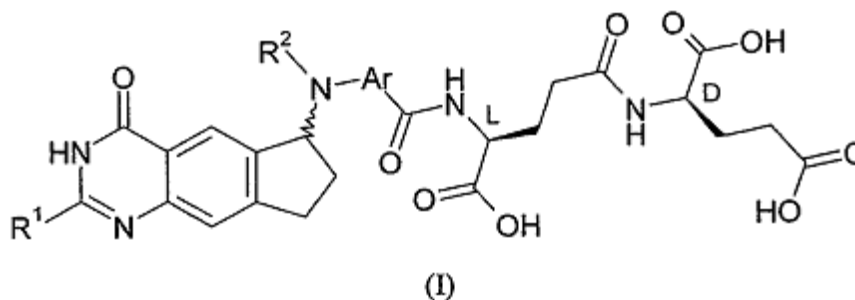
El documento WO 03/072091-A1 (The Ohio State University Research Foundation) utiliza el descubrimiento de que la expresión del FR- β se incrementa en las células cancerosas de pacientes con leucemia mielocítica por inductores de FR- β . El FR- β expresado en células de leucemia mielocítica, preferentemente células de AML, es funcional porque une e interioriza folato, a diferencia del FR- β expresado en la mayoría de las células hematopoyéticas normales que no es funcional. Dicho FR- β funcional es un objetivo para los folato conjugados con productos terapéuticos.

Arthritis & Rheumatism, **42**(8), agosto de 1999, 1609-1616 (Nakashima Matsushita *et al.*) da a conocer la expresión selectiva del receptor β de folato y su posible función en el transporte de metotrexato en macrófagos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide.

Jansen, en un resumen de la 13^o Simposio Internacional sobre Química y Biología de las pteridinas y folatos titulado "Antifolates in chronic inflammatory diseases/rheumatoid arthritis: ¿what can we learn from cancer and vice versa", *Pteridines*, **16**: 46, 2005, indica que el metotrexato (MTX) es el fármaco de anclaje en los regímenes de tratamiento para los pacientes con artritis reumatoide. Además, especula que los inhibidores de TS a base de ciclopenta[g]quinazolinina presentaban afinidades de unión próximas al ácido fólico y por lo tanto podrían ser interesantes fármacos dirigidos a FR en el tratamiento del cáncer, así como de enfermedades inflamatorias.

Compendio de la invención

Los autores han descubierto ahora que ciertos compuestos dentro de la clase general de ciclopenta[g]quinazolininas tienen un nivel inesperadamente alto de selectividad para los receptores de β -folato que expresan estirpes celulares. Dicho compuesto tiene dos características estructurales, a saber una estructura de tres anillos y la modificación de la cadena lateral del glutamato en comparación con la de ácido fólico. En consecuencia, la presente invención comprende un derivado de ciclopenta[g]quinazolinina, que contiene un grupo L-Glu- γ -D-Glu dipéptido, de fórmula (I):



en la que:

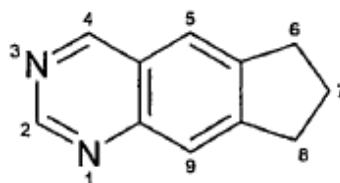
R¹ es amino, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄, fluoroalquilo C₁₋₄ o metoxi-alquilo C₁₋₄;

R² es alquilo C₁₋₄, alquenilo C₃₋₄, alquinilo C₃₋₄, hidroxialquilo C₂₋₄, halogenoalquilo C₂₋₄ o cianoalquilo C₁₋₄; y

5 Ar es fenileno, tiofenodiilo, tiazoldiilo, piridindiilo o pirimidindiilo que puede llevar opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄; estando opcionalmente el compuesto (I) en forma de una sal o éster farmacéuticamente aceptable; para el tratamiento de la artritis reumatoide o la leucemia mielocítica.

Los compuestos de la invención presentan una o más de las siguientes ventajas:

- 10 1. Alta selectividad para las células que sobreexpresan el FR-β, cuando se cultiva en concentraciones fisiológicas de ácido fólico y que poseen la expresión normal del PFR;
 2. una inhibición potente de TS, una baja afinidad por el PFR y una moderada a alta afinidad por el FR-β;
 3. actividad específica de TS y son resistentes a hidrolasas *in vivo*, y
 4. actividad selectiva en la identificación primaria de la estirpe celular de ovario de hámster chino con expresión moderada FR-β.
- 15 En la presente memoria los términos alquilo, alquenilo y alquinilo incluyen tanto los grupos de cadena lineal como ramificada pero las referencias a cada uno de los grupos alquilo, tales como propilo, son específicas solamente para el grupo de cadena lineal. Un convenio análogo se aplica a otros términos genéricos. Además, el sistema de numeración utilizado para el núcleo de ciclopenta[g]quinazolina es el convencional, mostrado a continuación:



20 en la presente memoria se designan residuos de aminoácidos de forma convencional (*Pure and Applied Chemistry*, 1974, **40**, 317 y *European Journal of Biochemistry*, 1984, **138**, 9). Así, por ejemplo, γ-glutamilo indica el radical H₂NCH(CO₂H)CH₂CH₂CO- o -NHCH(CO₂H)CH₂CH₂CO según el contexto, estando numerados los átomos de carbono en estos radicales a partir del átomo de carbono del grupo α-carboxilo como posición 1.

25 Debe observarse que una ciclopenta[g]quinazolina de la invención contiene al menos tres átomos de carbono asimétricos [presentes en el punto de unión del grupo -N(R²)- al sistema de anillo tricíclico y en los átomos de carbono α del grupo L-Glu-γ-D-Glu] y por lo tanto puede existir en las formas racémicas y ópticamente activas. Debe sobreentenderse que la presente invención abarca tanto las formas racémicas como las ópticamente activas, siendo un asunto del conocimiento general común cómo dichas formas ópticamente activas pueden obtenerse por síntesis estereoespecífica o por separación de una mezcla de isómeros. Se apreciará que un isómero pueda ser de mayor interés que otro debido a la naturaleza de la actividad que presenta o debido a propiedades físicas superiores, por ejemplo la solubilidad acuosa.

30

Debe entenderse también que una ciclopenta[g]quinazolina de fórmula (I) puede presentar el fenómeno de la tautomería y que las fórmulas mostradas en la presente memoria sólo representan una de las posibles formas tautómeras.

Debe entenderse también que ciertas ciclopenta[g]quinazolininas de la fórmula (I) pueden existir en formas solvatadas así como no solvatadas tales como, por ejemplo, formas hidratadas.

Un valor adecuado para R^1 o R^2 cuando es alquilo C_{1-4} , o para un sustituyente alquilo C_{1-4} que puede estar presente en Ar, es, por ejemplo, metilo, etilo, propilo o isopropilo.

5 Un valor adecuado para un sustituyente de alcoxi C_{1-4} que puede estar presente en Ar es, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi o butoxi.

Un valor adecuado para un sustituyente de halógeno que puede estar presente en Ar es, por ejemplo, flúor, cloro o bromo.

10 Un valor adecuado para R^2 cuando es alqueno C_{3-4} es, por ejemplo, prop-2-enilo, but-2-enilo, but-3-enilo o 2-metilprop-2-enilo; y cuando es alquino C_{3-4} es, por ejemplo, prop-2-inilo o but-3-inilo.

Un valor adecuado para R^2 cuando es hidroxialquilo C_{2-4} es, por ejemplo, 2-hidroxi-etilo o 3-hidroxi-propilo; cuando es halogenoalquilo C_{2-4} es, por ejemplo, 2-fluoro-etilo, 2-cloro-etilo, 2-bromo-etilo, 3-fluoro-propilo, 3-cloro-propilo o 3-bromo-propilo; y cuando es cianoalquilo C_{1-4} es, por ejemplo, ciano-metilo, 2-ciano-etilo o 3-ciano-propilo.

Un valor adecuado para Ar cuando es fenileno es, por ejemplo, 1,3 – o 1,4-fenileno, en especial 1,4-fenileno.

15 Un valor adecuado para Ar cuando es tiofenodiilo es, por ejemplo, tiofeno-2,4-diilo o tiofeno-2,5-diilo; cuando es tiazoldiilo es, por ejemplo tiazol-2,4-diilo o tiazol-2,5-diilo; cuando es piridindiilo es, por ejemplo, piridin-2 ,4-diilo, piridin-2,5-diilo, piridin-2,6-diilo o piridin-3 ,5-diilo; y cuando es pirimidindiilo es, por ejemplo, pirimidin-2,4-diilo, pirimidin-2,5-diilo o pirimidin-4,6-diilo.

20 Como se ha indicado, Ar puede llevar uno o dos sustituyentes. Un nivel preferido de sustitución en Ar, en el que la sustitución está presente, es o bien dos sustituyentes o especialmente un sustituyente; y uno o dos sustituyentes pueden estar convenientemente en posiciones adyacentes al átomo unido al grupo -CO-L-Glu-γ-D-Glu, siendo preferidos los sustituyentes halogenados tal como flúor.

25 Una forma de sal farmacéuticamente aceptable adecuada de una ciclopenta[g]quinazolina de la invención es, por ejemplo, una sal de adición de ácido con un ácido inorgánico u orgánico, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, trifluoroacético o maleico, o un metal alcalino, por ejemplo sodio, un metal alcalinotérreo, por ejemplo calcio o amonio, por ejemplo sal tetra(2-hidroxi-etil)amonio.

Una forma de éster farmacéuticamente aceptable de una ciclopenta[g]quinazolina de la invención es, por ejemplo, un éster con un alcohol alifático de hasta 6 átomos de carbono, por ejemplo un éster de metilo, etilo o terc-butilo.

30 El compuesto contiene tres grupos carboxilo. Una sal o éster puede ser mono-ácido-di-sal o éster-, di-ácido mono-sal o -éster o incluso tri-sal o -éster.

Preferentemente, R^1 es alquilo C_{1-4} o hidroxialquilo C_{1-4} . Más preferentemente, R^1 es metilo o, especialmente, hidroximetilo.

Preferentemente, R^2 es metilo, etilo, propilo, prop-2-enilo, prop-2-inilo, 2-hidroxi-etilo, 2-fluoro-etilo, 2-bromo-etilo o 2-ciano-etilo. Más preferentemente, R^2 es metilo o, especialmente, prop-2-inilo.

35 Preferentemente Ar es 1,4-fenileno que puede tener opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo consistente en cloro y especialmente flúor, tiofeno-2,5-diilo, tiazol-2,5-diilo o piridina 2,5-diilo. Más preferentemente Ar es 1,4-fenileno o 1,4-fenileno que tiene un sustituyente 2-fluoro como en 2,6-difluor-1,4-fenileno o especialmente 2-fluoro-1,4-fenileno o es piridina-2,5-diilo. Lo más preferentemente Ar es 1,4-fenileno o 2-fluoro-1,4-fenileno.

40 Una ciclopenta[g]quinazolina preferida de la invención tiene la fórmula (I) en la que R^1 es alquilo C_{1-4} o hidroxialquilo C_{1-4} , especialmente hidroximetilo;

R^2 es metilo, etilo, propilo, prop-2-enilo, prop-2-inilo, 2-hidroxi-etilo, 2-fluoro-etilo, 2-bromo-etilo o 2-ciano-etilo; y

Ar es 1,4-fenileno que puede tener opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo consistente en cloro y especialmente flúor, tiofeno-2,5-diilo, tiazol-2,5-diilo o piridina-2,5-diilo.

Otra ciclopenta[g]quinazolina preferida de la invención tiene la fórmula (I) en la que R^1 es metilo o hidroximetilo;

45 R^2 es metilo o prop-2-inilo; y

Ar es 1,4-fenileno o 1,4-fenileno que tiene un sustituyente 2-fluoro como en 2,6-difluoro-1,4-fenileno o especialmente 2-fluoro-1,4-fenileno o es piridina-2,5-diilo.

Una ciclopenta[g]quinazolina especialmente preferida de la invención tiene la fórmula (I) la que R^1 es metilo o hidroximetilo;

R² es metilo o, preferentemente, prop-2-inilo; y

Ar es 1,4-fenileno o 2-fluoro-1,4-fenileno.

Las ciclopenta[g]quinazolinas específicas particularmente preferidas de la invención son: ácido N-{N-{4-[N-(2-metil-4-oxo-3,4,7,8-tetrahidro-6H-ciclopenta[g]quinazolin-6-il)-N-(prop-2-inil)amino]benzoi}-L-γ-glutamil)-D-glutámico; o

- 5 ácido N-{N-{4-[N-(2-hidroximetil-4-oxo-3,4,7,8-tetrahidro-6H-ciclopenta[g]quinazolin-6-il)-N-(prop-2-inil)amino]benzoi}-L-γ-glutamil)-D-glutámico, o una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptable del mismo; así como los isómeros 6S de estos dos compuestos.

- 10 Aunque los compuestos de la presente invención pueden existir como una mezcla de estereoisómeros se prefiere que se resuelvan en una forma isomérica ópticamente activa. Dicho requisito complica la síntesis de los compuestos y se prefiere por tanto, que contengan tan pocos átomos de carbono asimétricos como sea posible lo que es coherente con el logro de la actividad deseada.

- 15 Como se indicó anteriormente, sin embargo, las ciclopenta[g]quinazolinas de la presente invención contienen al menos tres átomos de carbono asimétricos. De éstos, los de la posición 6 del sistema de anillo tienen, preferentemente, la orientación 6S en lugar de la orientación 6R. Los compuestos (I) preferidos descritos anteriormente por lo tanto tienen preferentemente dicha configuración en estos átomos de carbono asimétricos o menos preferentemente son una mezcla en la que uno o ambos de estos átomos de carbono asimétricos no se ha resuelto.

Una ciclopenta[g]quinazolina de la invención pueden prepararse por cualquier proceso conocido por ser aplicable a la preparación de compuestos químicamente relacionados.

- 20 Una ciclopenta[g]quinazolina de la presente invención puede ser activa o puede ser un profármaco convertido *in vivo* en un compuesto activo. Una ciclopenta[g]quinazolina de la invención puede administrarse a un animal de sangre caliente, incluyendo un ser humano, en forma de una composición farmacéutica que comprende el ciclopenta[g]quinazolina junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 La composición puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo un comprimido, cápsula, solución, suspensión o emulsión acuosa u oleosa; para uso tópico, por ejemplo una crema, pomada, gel o solución o suspensión acuosa u oleosa; para uso nasal, por ejemplo un inhalador nasal, atomizador nasal o gotas nasales; para uso vaginal o rectal, por ejemplo un supositorio; para administración por inhalación, por ejemplo como un polvo finamente dividido tal como un polvo seco, una forma microcristalina o un aerosol líquido; para uso sublingual o bucal, por ejemplo un comprimido o cápsula; o para uso parenteral (incluyendo uso por vía intravenosa, subcutánea, 30 intramuscular, intravascular o por infusión), por ejemplo una solución, emulsión o suspensión acuosa u oleosa estéril. En general, las composiciones anteriores se pueden preparar de manera convencional usando excipientes convencionales.

- 35 La ciclopenta[g]quinazolina se administrará normalmente a un animal de sangre caliente, a una dosis dentro de un intervalo de 50 a 25000, en particular de 50 a 5000, mg por metro cuadrado de área corporal del animal, es decir, aproximadamente 1500, particularmente 1 a 100, mg/kg. Cuando se desee, sin embargo, se pueden emplear dosis fuera de este intervalo y, en particular, cuando se utiliza el modo de administración preferido que implica la inyección subcutánea entonces el intervalo de dosis puede aumentarse entre 1 y 1000 mg/kg. Preferentemente se emplea una dosis diaria comprendida en el intervalo de 10 a 250 mg/kg, en particular de 30 a 150 mg/kg. Sin embargo, la dosis diaria variará necesariamente dependiendo del huésped tratado, la vía específica de administración y la gravedad de 40 la enfermedad a tratar. En consecuencia, el médico que está tratando cualquier paciente en particular puede determinar la dosis óptima.

Por consiguiente, la presente invención también incluye un método para el tratamiento de la leucemia mielocítica en un paciente necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un derivado de ciclopenta[g]quinazolina según se definió anteriormente en la presente memoria.

- 45 El compuesto se administrará normalmente a una dosis en el intervalo de 5 a 25000, particularmente 5 a 500, mg por metro cuadrado de área corporal del animal, es decir, aproximadamente 0,1 a 500, particularmente 0,1 a 10, mg/kg. Cuando se desee se pueden emplear, sin embargo, las dosis fuera de este intervalo. Puede utilizarse la administración tópica de un ciclopenta[g]quinazolina de la invención. Así, por ejemplo, para la administración tópica puede utilizarse una dosis diaria en el intervalo, por ejemplo, de 0,1 a 10 mg/kg.

- 50 Las composiciones que contienen las quinazolininas se pueden formular en forma de dosis unitaria, es decir, en forma de porciones discretas que comprende cada una una dosis unitaria, o un múltiplo o submúltiplo de una dosis unitaria, por ejemplo un comprimido o cápsula. Dicha forma de dosis unitaria puede contener, por ejemplo, una cantidad de ciclopenta[g]quinazolina comprendida en el intervalo de 1 a 250 o 1 a 500 mg.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Inmunohistoquímica de la tejido sinovial con AR: Microscopia óptica de (A) tinción de isotipo en conejo, (B) tinción de FR- β y (C) tinción de macrófagos (3A5). Tinción por inmunofluorescencia (doble) de la (D) FR- β , (E) CD-68 (macrófagos) y (F) combinación de D y E. De nota: los núcleos se tiñen de azul (tinción con Dapi).

5 Figura 2: (A) Correlación entre células positivas a 3A5 (macrófagos) y a FR- β /mm² en el tejido sinovial de pacientes con AR (n = 15) antes de tratamiento con MTX. Los recuentos medios de células positivas en la capa de subvestimiento sinovial/mm² fueron 126 (intervalo: 9-630) para FR- β y 219 (intervalo: 11-622) para 3A5. Regresión lineal: R = 0,64, p = 0,04. (B) La correlación entre la mejora de DAS28 (Δ DAS28) y la expresión de FR- β en los macrófagos (células positivas/mm²) después de 4 meses de tratamiento con MTX (R = 0,31, p = 0,11).

10 Figura 3: Expresión del ARNm de FR- β en el tejido sinovial y linfocitos en la sangre periférica (LSP, por sus siglas en inglés) de AR cultivados *ex vivo*. Se determinó la expresión media del ARNm de FR- β en linfocitos en la sangre periférica (LSP, n = 9), monocitos (n = 9), macrófagos cultivados *ex vivo* (n = 25), linfocitos T activados *ex vivo* (n = 22) y tejido sinovial de pacientes con AR (n = 7). La expresión de FR- β en estas muestras se muestra como porcentaje de la expresión en células CHO- β (células de ovario de hámster chino transfectadas con FR- β ; la expresión en estas células se fijó a 1,00).

15 Figura 4: Afinidades de unión relativas de FR- α (barras blancas) y FR- β (barras grises) para la generación de nuevos antagonistas de folato. Las afinidades de unión de FR- α y FR- β de los fármacos se determinaron por desplazamiento de [³H]-ácido fólico de la las células KB que expresan FR- α y las células CHO- β transfectadas con FR- β como se describe en el apartado Materiales y procedimientos. Las afinidades de unión se presentan como porcentaje relativo de afinidad de unión de ácido fólico. Los resultados son la media \pm desviación estándar de 3-5 experimentos independientes (desviación estándar <30%). A modo de comparación, las afinidades del PFR por los antagonistas de folato se presentan como: + + + + (gran afinidad), + + + (afinidad moderada), + + (poca afinidad), +/- (muy poca afinidad), (afinidad muy pobres) basándose en los datos publicados anteriormente.

20 Figura 5: La inhibición del crecimiento de CHO/WT y células CHO/FR- β por BGC 945, con o sin ácido fólico 1 μ M (A), CB300635 (B) y AG2034 (C/D), con o sin enriquecimiento de ácido fólico (1 μ M) o leucovorina (20 nM). Los resultados son la media de 3 experimentos (SD <20%).

Descripción detallada

30 Ejemplo 1: Aprovechamiento de los receptores β de folato como una vía de suministro potencial para los antagonistas de folato de nueva generación a los macrófagos activados en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide

Introducción

35 El metotrexato (MTX) antagonista del folato es el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FARME) más extensamente aplicado para anclaje del fármaco en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (AR). Se utiliza, ya sea como agente único o en combinación con otros FARME (por ejemplo, sulfasalazina e hidroxicloroquina) y el uso de MTX es obligado en la mayoría de las estrategias de tratamiento con agentes biológicos (anti-FNT α o anticuerpos monoclonales CD20).

40 La primera etapa esencial en la farmacología celular de MTX es su entrada en la célula que puede ser mediada por al menos 3 rutas diferentes; el portador de folato reducido (PFR), los receptores de folato asociados a la membrana (RFM) o un transportador de folato acoplado a protones (TFAP) (pH bajo). Este último transportador está involucrado principalmente en la absorción intestinal del folato. Las demás rutas de transporte albergan relevancia fisiológica y farmacológica para las células inmunocompetentes, facilitando la absorción de cofactores naturales de folato reducido y los antagonistas de folato, como MTX. El PFR y RFM difieren considerablemente en el mecanismo de absorción de (anti)folato (portador transmembranario frente a endocitosis/potocitosis), especificidad de sustrato (ácido fólico de baja afinidad/MTX de alta afinidad frente a ácido fólico de alta afinidad/MTX de baja afinidad) y especificidad tisular (expresión constitutiva frente a restringida).

45 Para RFM, se han identificado tres isoformas (α , β y γ). La isoforma α de RFM está sobreexpresado en tipos específicos de cáncer (cáncer de ovario), mientras que la isoforma γ es una proteína secretada por las células hematopoyéticas. La expresión selectiva de la isoforma FR- β se ha descrito en los macrófagos activados en el líquido sinovial inflamado de pacientes con AR y en modelos animales de artritis. Posteriormente, FR- β fue reconocida como un objetivo atractivo para la detección por la imagen de la artritis y terapéuticamente para la entrega selectiva guiada por anticuerpos o guiada por folato conjugado de toxinas y otras pequeñas moléculas o macromoléculas. Hasta ahora, la selección de FR con los antagonistas de folato sólo se ha explorado en las células cancerosas y los tejidos que sobreexpresan α FR.

55 En las últimas décadas, una segunda generación de antagonistas de folato se ha diseñado y evaluado clínicamente desde una perspectiva de eludir los mecanismos corrientes de resistencia a MTX, incluido el transporte alterado del PFR, la poliglutamilación defectuosa, el aumento de actividad de la enzima DHFR diana y/o la mejor salida de los

fármacos. Basándose en estos antecedentes, los antifolatos de segunda generación incluyen compuestos que fueron transportados de manera más eficiente por PFR, eran poliglutamilados con más eficacia o independientes de la poliglutamilación o destinatarios de otras enzimas clave en el metabolismo del folato aparte de DHFR, p. ej., la timidilato sintasa (TS) o la glicinamida ribonucleótido transformilasa. En el presente estudio los autores se propusieron investigar si diferentes antifolatos de segunda generación puede servir como fármacos destinatarios selectivos para las células que expresan FR- β en el tejido sinovial y/o las inmunocompetentes las células de los pacientes con AR. Los autores han identificado el inhibidor BGC 945 de TS como un fármaco antifolato prototípico que cumplía los criterios de una alta afinidad de unión de FR- β y una baja afinidad de PFR, lo que permite la absorción selectiva de fármacos en células que expresan la FR- β .

10 Materiales y métodos

Fármacos

El ácido fólico se adquirió en Sigma Chem.. Co., St. Louis, MO, L-leucovorina de Merck Eprova, Schaffhausen, Suiza, el metotrexato en Pharmachemie, Haarlem, Holanda y Pemetrexed/ALIMTA[®] (Eli Lilly) a través del departamento de farmacia de VUmc. Los siguientes fármacos antagonistas de folato se adquirieron de las empresas o instituciones indicadas; Raltitrexed/Tomodex[®]/ZD 1694 (AstraZeneca, Reino Unido), PT523 y PT644 (Dr. A. Rosowsky, Harvard Medical School, Boston, MA), GW1843 (Glaxo Wellcome, EE.UU.), CB300635 (Institute of Cancer Research, Sutton, Reino Unido), BGC 9331 y BGC 945 (6RS y 6S) (BTG International Limited, Londres, Reino Unido), 5,10-dideazatetrahidrofolato (DDATHF) (Eli Lilly, Indianapolis, IN) y AG2034 (Agouron/Pfizer Pharmaceuticals, San Diego, CA). Las estructuras química de estos antagonistas de folato se representa en las Tablas 2 y 3. ácido [3',5',7,9-³H]fólico 20-40Ci/mmol, MT783) se adquirió en Moravek, Brea, CA.

Estirpes celulares

Células naturales de ovario de hámster chino (CHO-WT), células CHO transfectadas con FR- β (CHO-FR- β) y células KB nasofaríngeas epidermoides humanas, que expresan FR- α (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se cultivaron en medio RPMI 1640 exento de ácido fólico (Gibco, Grand Island, NY), enriquecido con suero fetal de ternero al 10%, L-glutamina 2 mM, 0,15 mg/ml de prolina y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomocina. Las capacidades de unión en [³H]ácido fólico de las células CHO-FR- β y KB fueron de 0,5-1 pmol/10⁶ células y 20-40 pmol/10⁶ células, respectivamente. Linfocitos THP1 macrófagos monocíticos humanos (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) que contenía ácido fólico 2,2 μ M, enriquecido con suero fetal de ternero al 10%, L-glutamina 2 mM, 0,15 mg/ml de prolina y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomocina. Todas las estirpes celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂.

Muestras de tejido sinovial

En este estudio los autores analizaron biopsias de tejido sinovial procedentes de las articulaciones de la rodilla, de 15 pacientes de AR con enfermedad activa antes del tratamiento y después de 4 meses de tratamiento con MTX (dosis inicial de MTX: 7,5 mg/semana, aumento gradual hasta 15 mg/semana durante 12 semanas). La enfermedad activa se definió como \geq 6 articulaciones inflamadas o sensibles y niveles de moderada o peor en las evaluaciones del médico y del paciente de la actividad de la enfermedad (Disease Activity Score-28; DAS-28). Todos los pacientes tenían al menos un articulación de la rodilla afectada clínicamente. Se permitieron dosis bajas de prednisona (<10 mg/día) y dosis estables simultáneas de tratamiento con medicamento antiinflamatorio no esteroideo (MAINE). Ninguno de los pacientes utilizaban nunca MTX antes de inscribirse en el estudio. En pacientes que tomaban otros FARME, el tratamiento se dio por terminado después de una fase de reposo farmacológico de 28 días. El procedimiento de la artroscopia se realizó como se describió anteriormente como parte de un estudio en articulaciones aprobado por los comités de Ética Médica del Centro Médico de la Universidad de Leiden (Holanda) y del Centro Médico de la Universidad de Leeds (Reino Unido). Véase *Arthritis Rheum.* 2002; 46(8):2034-2038 y 2000; 43(8):1820-1830 (ambas de Kraan *et al.*).

Como tejido sinovial no inflamatorio de referencia se incluyeron 7 muestras de pacientes con lesión mecánica de la articulación, proporcionados por el Dr. B. J. van Royen, departamento de Cirugía Ortopédica, VU University Medical Center, Amsterdam, Holanda. Para la recogida de muestras de sangre periférica, todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio sobre la "resistencia FAME" fue aprobado por el Comité de Ética Médica del VU University Medical Center, Amsterdam, Holanda.

Inmunohistoquímica de FR- β

Se realizó la tinción inmunohistoquímica de secciones en criostato (4 μ m) de biopsias de tejido sinovial de pacientes con AR y controless utilizando un método de inmunoperoxidasa en 3 etapas como se describió anteriormente. Véase *Cancer Res.* 2001; 61(8):3458-3464 (Maliepaard *et al.*) y 2000; 60(18): 5269-5277 (Scheffer *et al.*). Se tiñeron secciones con un anticuerpo específico para FR- β (dilución 1:3000), isotipo de referencia: suero normal de conejo). Los macrófagos y las linfocitos T se tiñeron con 3A5 (dilución 1:100) y anticuerpos anti-CD3-PE monoclonales (dilución 1:25; Dako, Glostrup, Dinamarca) (isotipo de referencia: inmunoglobulina de ratón), respectivamente. IgG anti-conejo porcina biotinilada (Dako; dilución 1:200) e IgG anti-ratón de conejo (Dako; dilución 1:300) se utilizaron

como anticuerpos secundarios. La formación de color se realizó utilizando 0,4 mg/ml de AEC (aminoetil carbazol). Después de la tinción por contraste con hematoxilina, se montaron las extensiones. Se analizó la expresión de FR- β , 3A5 y CD3 en las secciones teñidas por análisis de detección por la imagen digital, como se describió anteriormente. Véase *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7(4):R862-R867 (Haringman *et al.*). En resumen, para cada marcador se utilizaron regiones representativas para la adquisición de imágenes, utilizando una ampliación de 400x. Estas zonas se dividieron en 6 campos de alta potencia (HPFS), con un solape de 3 píxeles. Las células positivas se evaluaron analizando 18 HPFS consecutivos, anotando el número de células positivas en la capa de revestimiento de la íntima y la de subrevestimiento sinovial por mm².

Inmunofluorescencia con doble marcaje

- 10 FR- β se detectó con anticuerpos anti-conejo porcinos marcados con HRP (siglas en inglés de peroxidasa de rábano picante) (dilución 1:200; Dako, Glostrup, Dinamarca) y el revelado se hizo con rodamina/tiramina (fluorescencia roja) según las instrucciones del fabricante (dilución 1:1000). CD68 se detectó mediante los anticuerpos de cabra anti-ratón biotinilados (dilución 1:100; Dako, Glostrup, Dinamarca), utilizando estreptavidina Alexa-488 como sustrato (dilución 1:750; fluorescencia verde, Molecular Probes, Eugene, OR). Las extensiones se montaron con Vectashield, que contenía 1 μ g/ml de DAPI (para la tinción de los núcleos) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Las células se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DMRB, Rijswijk, Holanda).

Aislamiento de linfocitos en sangre periférica de pacientes de AR y condiciones de cultivo

- 20 Se aislaron células mononucleares en la sangre periférica de muestras de sangre recién extraída por centrifugación en gradiente (35 minutos a 400 x g) en Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotecnologías, Reino Unido). Después de la centrifugación se recogió la interfase con cuidado y se lavó 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enriquecida con 1% de BSA. Se hizo recuento de la fracción de linfocitos y se volvió a poner en suspensión en medio de cultivo IMDM (Invitrogen, Breda, Holanda), que contenía FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y 100 μ g/ml de penicilina y estreptomina. Los monocitos se aislaron por adherencia después de 2 horas de incubación a 37°C en frascos de cultivo seguidos de extracción de ARN o diferenciación de macrófagos cultivando los monocitos durante 7 días en presencia de 10 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Strathmann Biotech, Hamburgo, Alemania).

- 30 Los linfocitos en sangre periférica (LSP) que quedan en suspensión después de adherencia de los monocitos se recogieron para el aislamiento de ARN o se utilizaron para activación de linfocitos T incubándoles a una densidad de 1×10^6 células/ml con anticuerpo monoclonal anti-CD28 (5 μ g/ml, CLB -CD28/1, Sanquin, Amsterdam, Holanda) y anti-CD3 (1 μ g/ml, CLB-T3/4.E, Sanquin, Holanda) en placas de 24 pocillos recubiertas con anti-ratón de cabra (Dako, Glostrup, Dinamarca). Después de 48 horas de estimulación, se recogieron linfocitos T activados para aislamiento del ARN y se determinó el estado de activación midiendo la expresión de CD25 mediante citometría de flujo (FACScalibur, Becton & Dickinson).

Expresión de ARNm de FR- β en el tejido sinovial y los linfocitos en la sangre periférica de pacientes con AR

- 35 ARN del tejido sinovial (n = 7), LSP (n = 9), monocitos (n = 9), macrófagos (n = 25), y linfocitos T activados (n = 22) de pacientes con AR se aislaron utilizando el kit de aislamiento RNeasy Plus de Qiagen (Qiagen, Venlo, Holanda) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Antes de aislamiento del ARN, las muestras congeladas de tejido sinovial se pulverizaron moléndolas en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido en el que después tampón RPE. Se determinaron las concentraciones totales de ARN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE.UU.). La metodología de RCP con transcripción inversa en tiempo real (RT-RCP) descrita anteriormente se utilizó para medir simultáneamente las concentraciones de ARNm para FR- β y gliceraldehído-3-fosfato (gen de referencia). Véase *Cancer Res.* 2006; 66(11): 5875-5882 (Qi *et al.*).

- 45 La etapa de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando reactivos de transcripción inversa TaqMan-script de Applied Biosystems (Foster City, CA), siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se mezclaron 400 ng de ARN total con los cebadores hexámeros aleatorios (50 mmol/l), inhibidor de RNasa (1 unidad/ μ l), transcriptasa inversa MultiScribe (5 unidades/ μ l), y mezcla de trifosfatos de desoxinucleósido (2,5 mmol/l cada uno) en tampón de transcriptasa inversa. La mezcla de reacción 10 μ l se incubó primero a 25°C durante 10 minutos, luego a 48°C durante 30 minutos y por último a 95°C durante 5 minutos.

- 50 La etapa posterior de RCP en tiempo real para FR- β se llevó a cabo en presencia de 12,5 μ l de RCP Mastermix (Applied Biosystems), 0,5 μ l cada uno de los cebadores directo e inverso (CTGGCTCCTTGCTG-AGTTC, GCCAGCCTGGTTATCCA) y 0,5 μ l de sonda Taqman (6FAM-TCCTCCAGACTACCTGCCCTCAGC-TAMERA). Los cebadores y la sonda TaqMan para el gen *GAPDH* de referencia se adquirieron en Applied Biosystems. Las condiciones de RCP fueron 2 minutos a 50°C, luego 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos cada uno a 95°C, y por último 1 minuto a 60°C. Los datos generados por fluorescencia se siguieron y registraron por el sistema detección de secuencias Gene Amp 5700 (Applied Biosystems). Todas las muestras se montaron por triplicado y se normalizaron los valores de GAPDH.

Análisis de FR- β /FR- α y afinidad de unión a PFR para antagonistas de folato de nueva generación

Un ensayo de unión de células intactas para la unión competitiva de [³H]-ácido fólico y nuevos fármacos anti-folato para FR-β y FR-α se realizó esencialmente como se describió anteriormente. Véase *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 459-47 y la *Cancer Res.* 1995; 55(17): 3795-3802 (ambos de Westerhof *et al.*). En resumen, las células CHO-β (células de ovario de hámster chino transfectadas con FR-β) y células KB (células que expresan FR-α) se desprendieron por incubación en PBS + EDTA 1 mM. Las células desprendidas se pusieron en suspensión en solución salina tamponada con HEPES enfiada con hielo (NaCl 140 mM, HEPES 20 mM, KCl 6 mM, MgCl₂ 2 mM, D-glucosa 6 mM, pH 7,4 con NaOH) a una concentración celular de 3 x 10⁵ y 1 x 10⁶ células/ml, respectivamente. Un ml de suspensión celular se añadió a una serie de tubos Eppendorf que contenía 100 pmol ácido [³H]-fólico (radiactividad específica: 2000 dpm/pmol) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de folato natural o antagonistas de folato. Después de 10 minutos a 4°C, las células se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf (30 s, 10.000 rpm), el sobrenadante se aspiró y los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 200 μl de agua y se analizó la radiactividad (fluído de centelleo Optima Gold, United Technologies, Packard, Bruselas, Bélgica). La unión no específica de [³H] (normalmente <2% de la unión específica) se determinó midiendo la radiactividad asociada a las células en presencia de un exceso molar de 1000 veces de ácido fólico sin marcar. Se determinaron las concentraciones de folatos naturales y de antagonistas de folato seleccionados necesaria para desplazar el 50% de [³H]ácido fólico de FR-β o FR-α y se presentan como afinidades de unión relativas al ácido fólico. A modo de comparación, los datos de las afinidades de la PFR de folatos naturales y antagonistas de folato se presentaron en estudios anteriores. Véase *Mol. Pharmacol.* 1995; 48: 459-471 Westerhof *et al.*) y *Cancer Res.* 2005; 65(24): 11721-11728 (Gibbs *et al.*).

20 Ensayo de inhibición de proliferación celular

Células CHO-WT y CHO-FR-β se sembraron en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10⁴/cm². Después de 24 horas, se añadieron 8 concentraciones (con incrementos de 2,5 veces) de fármacos antagonistas del folato en ausencia o presencia (para bloquear FR) de ácido fólico 1 μM. Después de 72 horas de incubación, las células se recogieron por tripsinización y se hizo el recuento para viabilidad celular como se ha descrito anteriormente. Véase *Mol. Pharmacol.* 1999; 55(4): 761-769 (Jansen *et al.*).

En otros experimentos linfocitos THP1 humanos monocíticos-macrófagos se probaron los efectos antiproliferantes de los antagonistas del ácido fólico. Para ello, 1 ml de suspensión celular que contenía 1,25 x 10⁵ células se sembraron en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se incubaron con 8 concentraciones (con incrementos de 2,5 veces) de fármacos antagonistas del folato. Después de 72 horas se realizaron recuentos de células de exposición al fármaco con un hemocitómetro y la viabilidad se verificó por exclusión con azul de tripano.

Resultados

Inmunohistoquímica de FR-β del tejido sinovial

La tinción inmunohistoquímica de todo el tejido sinovial de AR mostró elevada expresión de FR-β en la capa de revestimiento de la íntima, así como en la de subrevestimiento sinovial. El modelo de tinción para FR-β era compatible con la tinción de 3A5 (macrófagos), mientras que las áreas de los linfocitos T no presentaban ninguna tinción (Figura 1 A-C). De hecho, un análisis microscópico de fluorescencia más detallado demostró localización conjunta de FR-β y CD68 (marcador de macrófagos) en las membranas celulares de los macrófagos y de los macrófagos de la íntima que se infiltran en el tejido sinovial (Figuras 1 D-F). En el tejido sinovial no inflamatorio de controles ortopédicos, no se observó ninguna tinción para FR-β, en consonancia con el bajo número de macrófagos (no mostrado).

Los resultados de la tinción se analizaron por asistida por análisis de detección de la imagen digital asistido por ordenador. Se observó una correlación significativa entre la expresión de 3A5 y FR-β en la capa de subrevestimiento sinovial (recuento de células/mm²) (p = 0,04) (Figura 2A). Los recuentos medios de células positivas en la capa de subrevestimiento sinovial/mm² fueron 126 (intervalo 9-630) para FR-β y 219 (intervalo 11-622) para 3A5. El número medio de macrófagos disminuyó en los 4 meses de tratamiento con MTX (de 219 a 119 recuentos de células positivas en la capa sinovial de subrevestimiento/mm², p = 0,14). La expresión FR-β después de 4 meses de tratamiento con MTX se correlacionó positivamente (r = 0,31) con la mejora de DAS28 (ΔDAS28), pero no alcanzó significación estadística (p = 0,11) (Figura 2B).

50 Expresión del ARNm de FR-β en el tejido sinovial de AR y en las células en la sangre periférica de pacientes con AR

Para confirmar más la expresión diferencial de FR-β en el tejido sinovial, se determinaron las concentraciones de ARNm en FR-β por análisis de RCP en biopsias de tejido sinovial en comparación con las de los linfocitos en la sangre periférica de los pacientes de RA, incluyendo linfocitos, linfocitos T activados *ex vivo* y monocitos en la sangre periférica y macrófagos procedentes de monocitos *ex vivo*. Las concentraciones de ARNm en FR-β se presentaron en relación con las células CHO-FR-β (establecidas en 100%). Clasificación de la expresión del ARNm de FR-β fue la mayor para el tejido sinovial de la AR (media del 17% en comparación con las células CHO-β) > ex

vivo macrófagos derivados de monocitos (un 3% en comparación con las células CHO- β) > linfocitos en la sangre periférica (LSP) (0,7%) >> monocitos (0,02%) y linfocitos T activados *ex vivo* (<0,001%) (Figura 3).

Afinidades de unión de FR- β frente a FR- α para los antagonistas de folatos

5 Las afinidades de unión de la FR- α para determinados antagonistas de folatos fueron descritos anteriormente por Westerhof *et al.* pero en qué medida se superponen o difieren de la isoforma FR- β no se ha demostrado. Para ello, se determinaron las afinidades de unión de FR- β frente a FR- α para una serie de inhibidores de DHFR, TS y GARTFasa a base de folato y se muestran en la Figura 4. Con respecto al ácido fólico, tanto FR- β como FR- α presentaban una afinidad bastante baja por el grupo de inhibidores de DHFR antagonistas del folato. La afinidad de unión de FR- β por MTX es aproximadamente 50 veces menor que por el ácido fólico. La afinidad de unión por 10 PT523 es notablemente inferior que por MTX (0,3% de ácido fólico), mientras que PT644, el análogo 5-metilo de PT523, presentaba una afinidad comparable a MTX. Obsérvese que FR- α presenta una buena afinidad de unión por todos los inhibidores de la TS probados a base de ácido fólico, pero las afinidades de unión de FR- β para Pemetrexed, Raltitrexed y BGC 9331 fueron notablemente más bajas (16 a 30 veces) que para FR- α . La retención de una gran afinidad de unión de FR- β se observó para los inhibidores CB300635 de TS (161% del ácido fólico) y (6RS)-BGC 945 (89% de ácido fólico) y (6S)-BGC 945 (46% de ácido fólico). FR- β también presentó una afinidad de unión muy competente para los inhibidores DDATHF de GARTFasa (27% del ácido fólico) y AG2034 (54% del ácido fólico) aun cuando las afinidades de unión de FR- α por estos compuestos eran 2,5 veces mayores. En conjunto, estos resultados demuestran un amplio diferencial en las afinidades de unión de FR- β por los antagonistas de folato, entre los que varios antagonistas de folato pusieron de manifiesto una afinidad de unión notablemente superior que 20 para MTX.

Antagonistas del folato provocaron la inhibición del crecimiento de células que expresan FR- β

Para investigar si todos los antagonistas de folato utilizados en el estudio actual expresarían efectos potenciales inhibitorios de crecimiento contra tipos de células similares a los macrófagos, se investigó este parámetro para linfocitos THP1 monocitos-macrófagos humanos (Tabla 1). De acuerdo con el PFR como la ruta de transporte dominante en los linfocitos THP1, se observaron potentes efectos inhibitorios de crecimiento en todos los antagonistas de folato, excepto CB300635 y BGC 945, dos compuestos que tienen poca afinidad por PFR. Dado que el modelo de estirpe celular THP1 es negativo para FR (al contrario que el macrófago sinovial activado), tres antagonistas de folato para los que FR- β presentó la mayor afinidad de unión (CB300635, AG2034 y BGC 945) se evaluó su potencia para dirigirse a FR- β provocando la inhibición del crecimiento celular de las células CHO-FR- β . 25 Contra las células CHO/WT, BGC 945 sólo provocaron la inhibición del crecimiento a concentraciones extracelulares > 1000 nM (Figura 5A). Cabe destacar que la inhibición del crecimiento de las células CHO/FR- β se provocó a concentraciones notablemente más bajas (10-50 nm) de BGC 945. La adición de ácido fólico a estos cultivos celulares suprimió totalmente la actividad de BGC 945, de acuerdo con un bloqueo de la FR. A pesar de presentar la afinidad de unión mayor por FR- β , CB300635 no fue notablemente potente en la provocación de la inhibición del crecimiento en células CHO/FR- β células (Figura 5B). La idea de que la administración conjunta de ácido fólico suprimía la actividad de CB300635 sugiere que FR- β está implicado en la absorción celular de este compuesto. Por último, AG2034 puede utilizar tanto el PFR como FR expresados de forma constitutiva como ruta para la entrada a las células (Fig. 5). Como tal, AG2034 presentaba un potencial inhibidor de crecimiento contra células CHO/WT y en mayor medida contra las células CHO/FR- β (Figura 5C/D). De acuerdo con esto, la supresión de los efectos inhibitorios del crecimiento de AG2034 por el bloqueo de FR- β (con ácido fólico) y el bloqueo de PFR (con LV), son sólo parciales (Figura 5C/D). 30 35 40

Exposición

Puesto que MTX es el anclaje del fármaco en muchos regímenes terapéuticos para el tratamiento de la AR, la definición de los parámetros genéticos, bioquímicos y metabólicos que podrían ayudar a predecir y/o mejorar la respuesta terapéutica a MTX ha recibido considerable interés reciente. Este estudio se centró específicamente en la función del transporte de la membrana celular de MTX, que, en los macrófagos sinoviales activados, interviene como mediador principalmente la isoforma β del receptor de folato. Dada la idea de que las propiedades moleculares y funcionales de los FR y de las PFR expresadas de forma constitutiva difieren considerablemente, una mejor comprensión de las propiedades de FR- β puede facilitar un mejor margen terapéutico por reconocimiento selectivo de FR- β sobre el PFR. 45 50

En esta memoria descriptiva los autores han demostrado que la expresión de FR- β principalmente localizada conjuntamente con los macrófagos en la capa de revestimiento de la íntima y en la de subrevestimiento sinovial de pacientes con AR y por lo tanto puede ser una diana atractiva para los antagonistas del folato. La detección de afinidades de unión de una serie de antagonistas del ácido fólico de la segunda generación, algunos de ellos con probada actividad anticancerígena, puso de manifiesto que todo el grupo de los inhibidores de la DHFR tenía una afinidad de FR- β más bien baja. Esto es coherente con relaciones de la actividad de la estructura descritas anteriormente que demuestran que la isoforma α de FR tenía bajas afinidades por antagonistas de folato con una estructura a base de 2,4-NH₂ (véase la Tabla 2). Curiosamente, mientras FR- α demostraba una afinidad de unión relativamente alta por todos los inhibidores a base de folato de timidilato sintasa probados, para FR- β esto se mantenía solamente para 3 compuestos (CB300635, GWL1843 y BGC 945) que comparten una propiedad química 55 60

común de estructuras con 3 anillos y/o modificaciones de la cadena lateral del glutamato (véanse las Tablas 2 y 3). Esta última modificación también suprime notablemente su capacidad para ser transportada por el PFR y por lo tanto contribuye a una mayor selectividad de FR. De hecho, el reconocimiento selectivo por BGC 945 para FR- α y no PFR se demostró en FR- α sobreexpresando estirpes celulares. Además de inhibidores de TS a base de ácido fólico, FR- β también presentaba afinidad de unión moderadas a altas por los inhibidores de GARTFasa (AG2034 y DDATHF) a base de ácido fólico, que los clasifica como fármacos antagonistas de folato que pueden ser transportados tanto por PFR como por FR.

Se utilizaron células CHO transfectadas con FR- β como un sistema modelo para evaluar la eficacia de la absorción celular en la que interviene como mediador FR- β de antagonistas del folato transmitiendo efectos antiproliferantes. Este modelo de estirpe celular pueden ser clínicamente representativo, basándose en los niveles de unión del ácido [3 H]fólico y los niveles de ARNm de FR- β que son compatibles con los niveles de ARNm de FR- β en el tejido sinovial de pacientes con AR (Fig. 4). El mayor diferencial en la actividad entre las células CHO de referencia (que expresan a PFR) y células transfectadas con FR- β se observó para BGC 945, lo que es coherente con una poca afinidad para el transporte por PFR y una alta afinidad de unión de FR- β . La absorción de BGC 945 en la que interviene como mediador FR- β puede inhibirse bloqueando el receptor con ácido fólico en exceso, lo que implica que los folatos naturales circulantes en tejido sinovial/plasma podrían atenuar la actividad potencial de BGC 945 *in vivo*, ya sea por la ocupación o la competencia del receptor o por regulación por disminución del receptor.

Ejemplo 2: Compuestos de la invención

La tabla 3 muestra las estructuras de los siguientes compuestos de la invención:

- | | | |
|----|----------------------|----------------------|
| 20 | • CB300638 (CGF 638) | • CB30094 |
| | • (6S)-CB300638 | • CB300945 (CGF 945) |
| | • CB300935 | • (6S)-CB300945 |
| | • CB300936 | • CB300947 |
| | • CB300940 | • CB300951 |

25 Éstos se prepararon según los métodos propuestos en los documentos WO 94/11354 A1, WO 03/020300 A1, WO 03/020706 A1, WO 03/020748 A1, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 1910-1926, *Tetrahedron*, **63** (7), 2007, 1537-1543 (Bavetsias *et al.*) y *Cancer Research* **65**, 2005, 1172111728 (Gibbs *et al.*).

Ejemplo 3: Formulación

30 A continuación se ilustran formas de dosificación farmacéutica representativas que contienen una ciclopenta[g]quinazolina de fórmula (I), particularmente en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para uso terapéutico o profiláctico en seres humanos:

(a) <u>Comprimido I</u>	<u>mg/comprimido</u>
Sal de ciclopenta[g]quinazolina	100
Lactosa Ph. Eur.	182,75
35 Croscarmelosa de sodio	12,0
Pasta de almidón de maíz (pasta al 5% p/v)	2,25
Estearato de magnesio	3,0
(b) <u>Comprimido II</u>	<u>mg/comprimido</u>
40 Sal de ciclopenta[g]quinazolina	50
Lactosa Ph. Eur.	223,75
Croscarmelosa de sodio	6,0
Almidón de maíz	15,0
Polividona (pasta al 5% p/v)	2,25
45 Estearato de magnesio	3,0

ES 2 387 334 T3

	(c) <u>Comprimido III</u>	<u>mg/comprimido</u>
	Sal de ciclopenta[g]quinazolina	1,0
	Lactosa Ph. Eur.	93,25
5	Croscarmelosa de sodio	4,0
	Pasta de almidón de maíz (pasta al 5% p/v)	0,75
	Estearato de magnesio	1,0
	 (d) <u>Cápsula</u>	 <u>mg/cápsula</u>
10	Sal de ciclopenta[g]quinazolina	10,0
	Lactosa Ph. Eur.	488,5
	Estearato de magnesio	1,5
	 (e) <u>Inyección I</u>	 <u>(50 mg/ml)</u>
15	Sal de ciclopenta[g]quinazolina	5,0% p/v
	Solución 1 M de hidróxido sódico	15,0% v/v
	Ácido clorhídrico 0,1 M (para ajustar el pH a 7,6)	
	Polietilenglicol 400	4,5% p/v
	Agua para inyectables hasta 100%	
20	 (f) <u>Inyección II</u>	 <u>(10 mg/ml)</u>
	Sal de ciclopenta[g]quinazolina	1,0% p/v
	Fosfato sódico BP	3,6% p/v
	Solución 1 M de hidróxido sódico	15,0% v/v
25	Agua para inyectables hasta 100%	
	 (g) <u>Inyección III</u>	 (1 mg/ml, tamponada a pH 6)
	Sal de ciclopenta[g]quinazolina	0,1% p/v
	Fosfato sódico BP	2,26% p/v
30	Ácido cítrico	0,38% p/v
	Polietilenglicol 400	3,5% p/v
	Agua para inyectables hasta 100%	

35 Las formulaciones anteriores pueden prepararse por procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Los comprimidos (a) a (c) puede estar recubiertos con cubierta entérica por medios convencionales, por ejemplo con un revestimiento de acetato ftalato de celulosa.

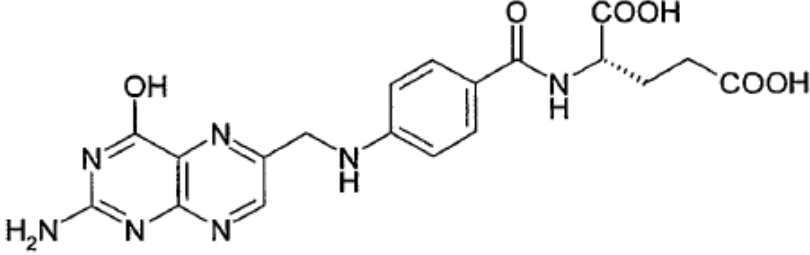
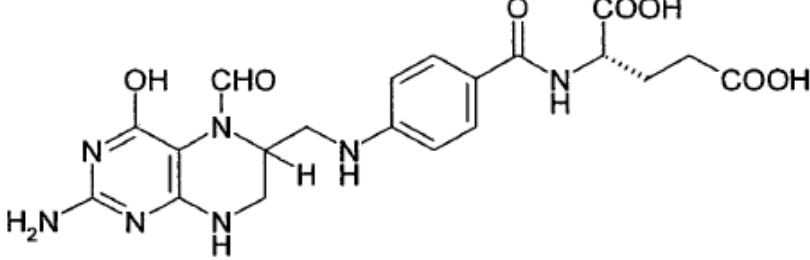
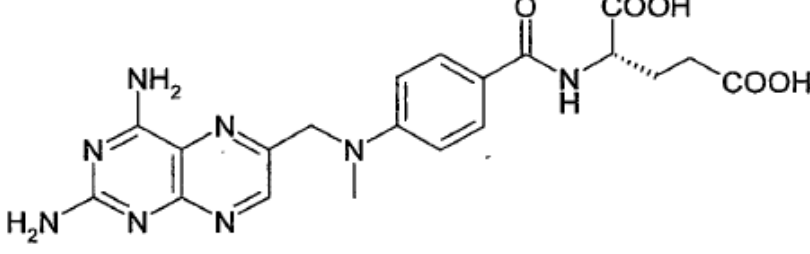
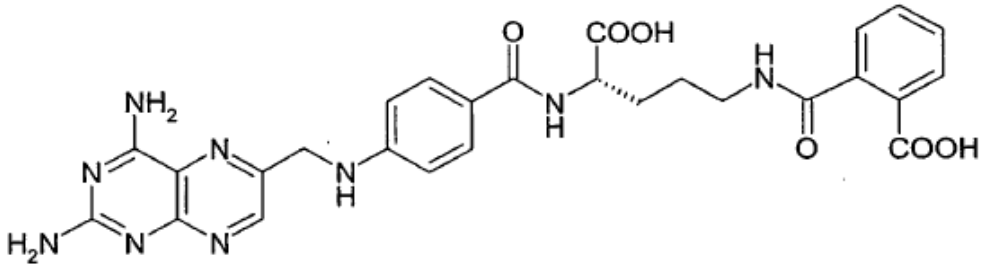
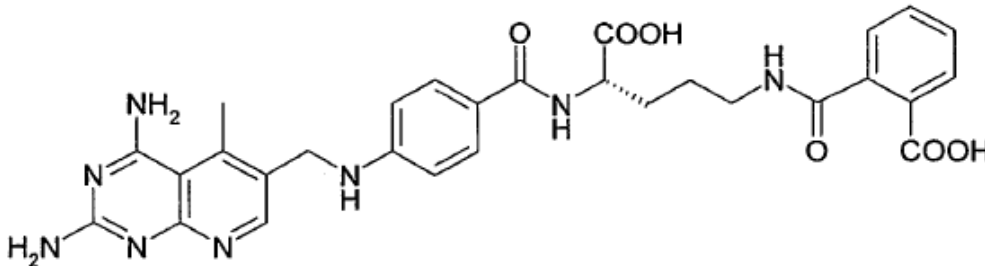
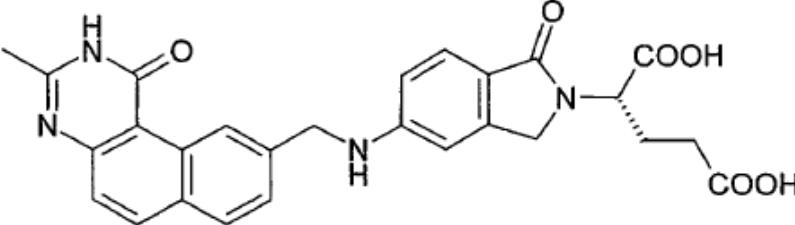
Tabla 1. Efectos inhibitorios del crecimiento de los antagonistas del folato contra linfocitos THP1 monocitos-macrófagos humanos[#]

	Folato antagonista	CI ₅₀ (nM)
	MTX	7,1 ± 0,5
5	PT523	2,2 ± 0,3
	PT644 mM	1,0 ± 0,4
	Raltitrexed	2,4 ± 0,5
	Pemetrexed	10,7 ± 2,2
10	GW1843	1,6 ± 0,1
	BGC9331	8,7 ± 0,8
	CB300635	4850 ± 285
	BGC945	3630 ± 350
	DDATHF	9,8 ± 0,8
15	AG2034	3,2 ± 0,2

[#]Se cultivaron linfocitos THP-1 en medio RPMI-1640 que contenía 2,2 de ácido fólico (que bloquearía cualquier actividad de FR).

Tiempo de exposición al fármaco: 72 horas. Los resultados son la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Tabla 2: Estructuras de los compuestos comparativos

Denominación	Estructura
Ácido fólico	
Leucovorina	
MTX	
PT523	
PT644	
GW1843	

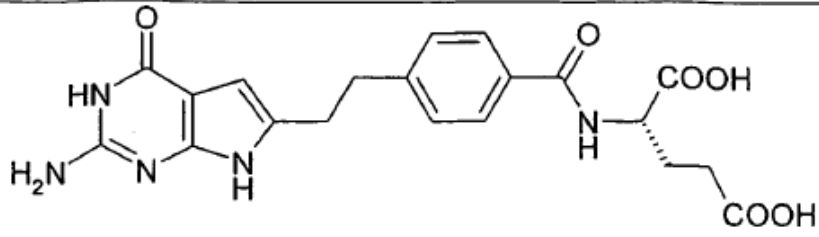
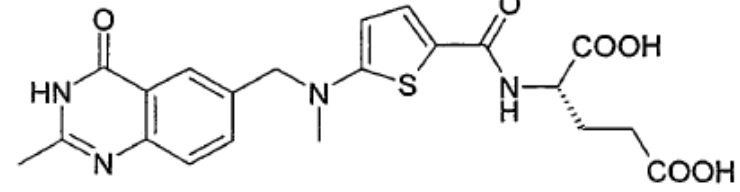
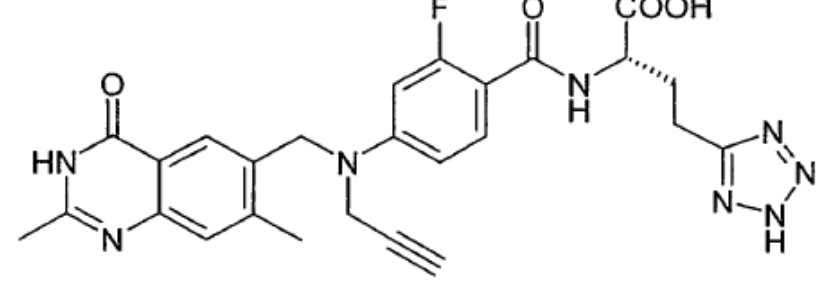
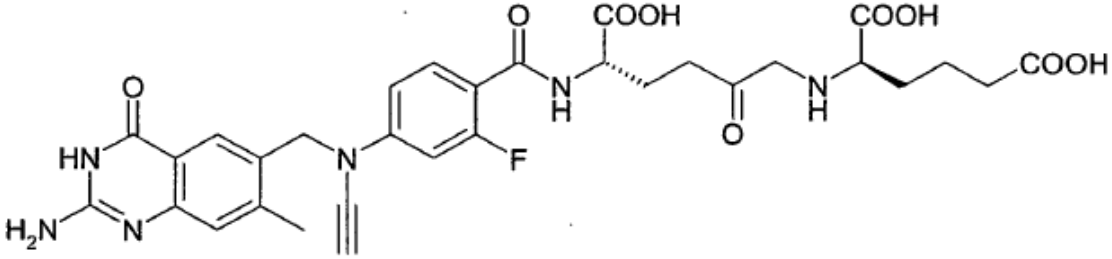
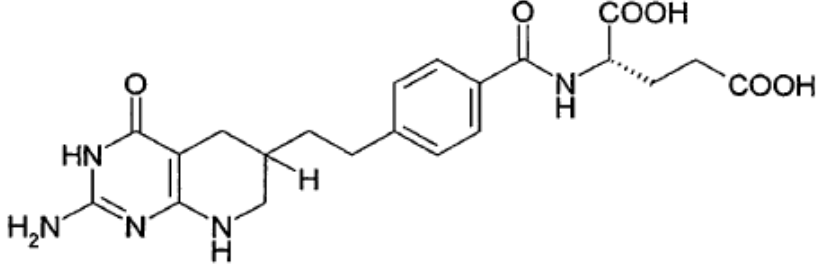
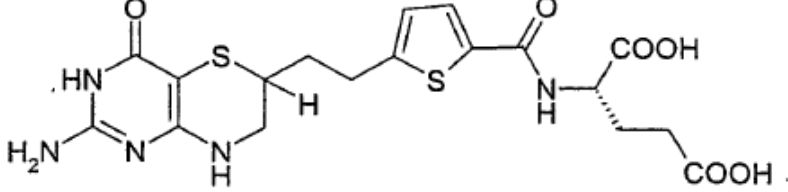
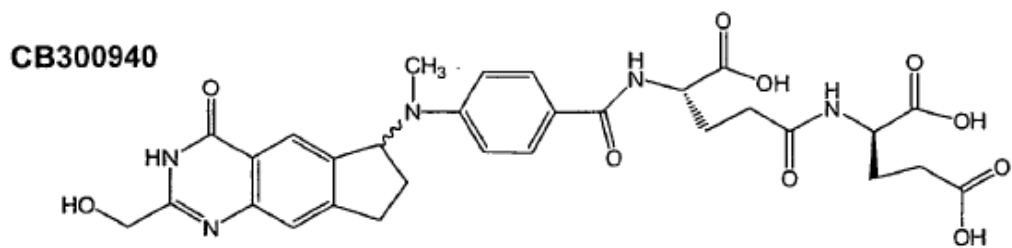
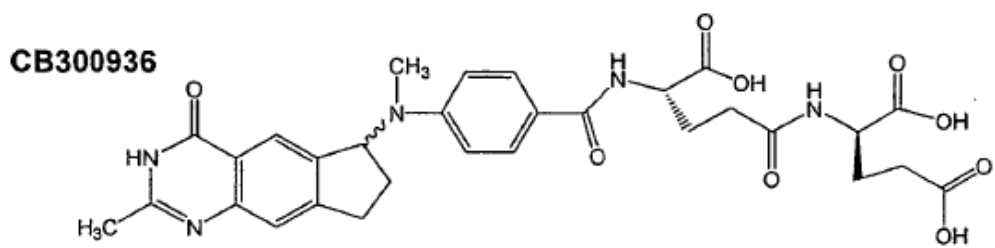
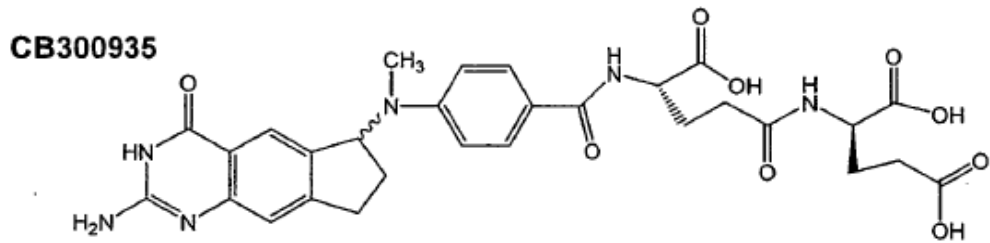
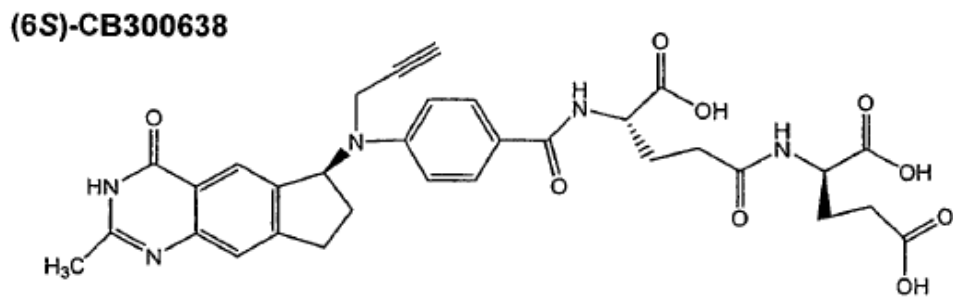
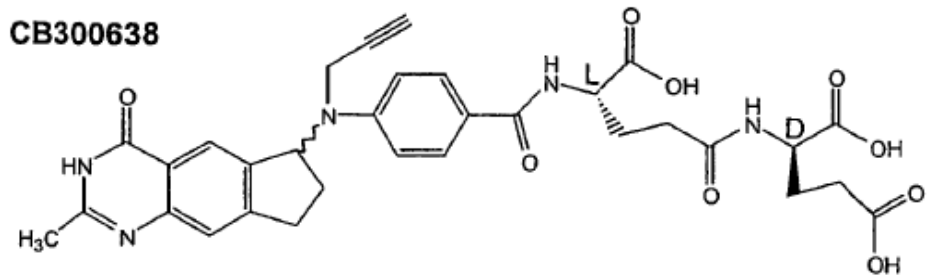
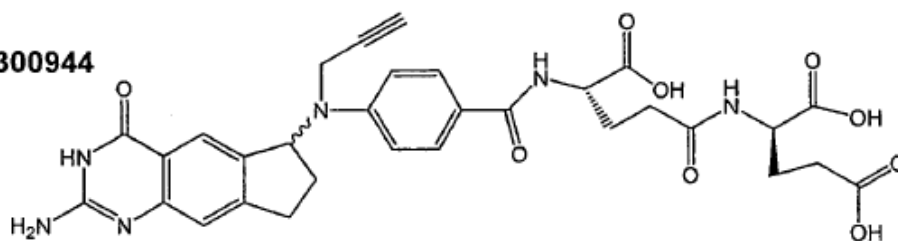
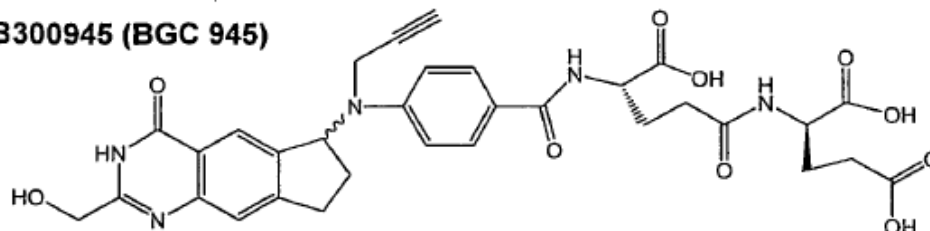
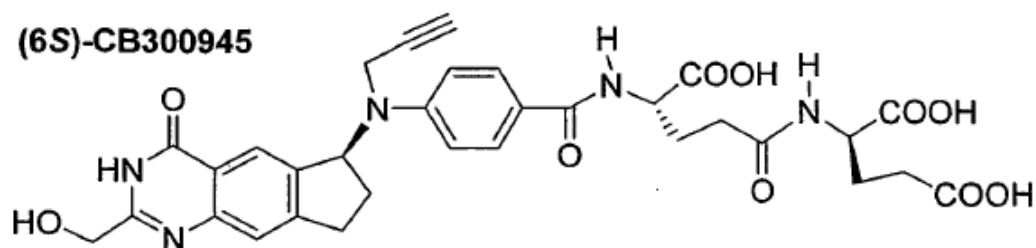
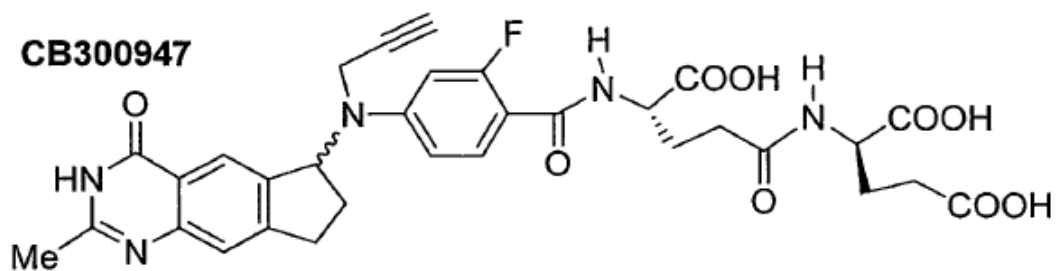
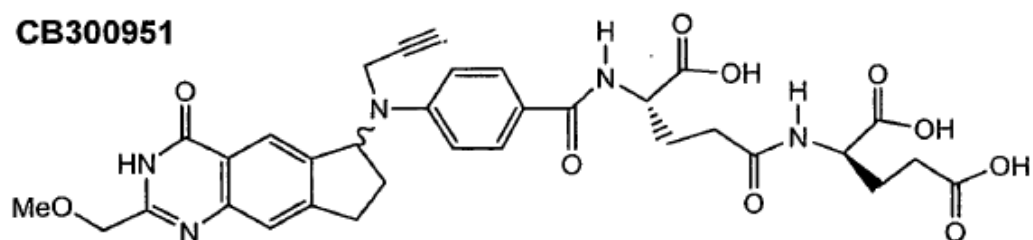
Denominación	Estructura
Pemetrexed	
Raltitrexed	
BGC 9331	
CB300635	
DDATHF	
AG2034	

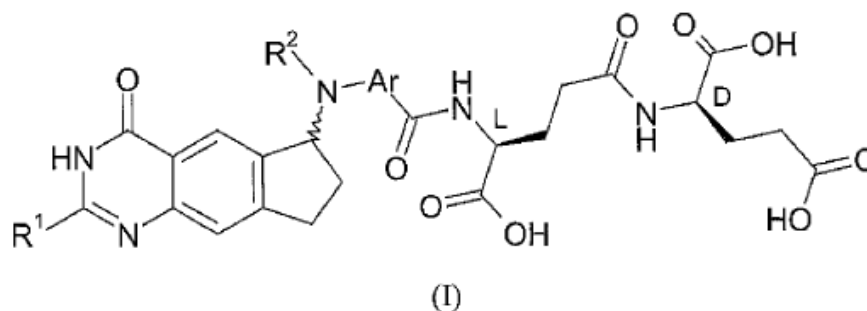
Tabla 3: Estructuras de los compuestos de la invención



CB300944**CB300945 (BGC 945)****(6S)-CB300945****CB300947****CB300951**

REIVINDICACIONES

1. Derivado de ciclopenta[g]quinazolina, que contiene un grupo L-Glu-γ-D-Glu dipéptido, de fórmula (I):



en la que:

R¹ es amino, alquilo C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄, fluoroalquilo C₁₋₄ o metoxi-alquilo C₁₋₄;

R² es hidrógeno, alquilo C₁₋₄, alqueno C₃₋₄, alquino C₃₋₄, hidroxialquilo C₂₋₄, halogenoalquilo C₂₋₄ o cianoalquilo C₁₋₄; y

5 Ar es fenileno, tiofenodiilo, tiazoldiilo, piridindiilo o pirimidindiilo que puede llevar opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, trifluorometilo, alquilo C₁₋₄ y alcoxi C₁₋₄;

estando opcionalmente el compuesto (I) en forma de una sal o éster farmacéuticamente aceptable; para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica.

10 2. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 1 en el que R¹ es alquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄.

3. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 2 en el que R¹ es metilo o hidroximetilo.

15 4. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según cualquier reivindicación anterior en el que R² es metilo, etilo, propilo, prop-2-enilo, prop-2-inilo, 2-hidroxietilo, 2-fluoroetilo, 2-bromoetilo o 2-cianoetilo.

5. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 4 en el que R² es metilo o prop-2-inilo.

20 6. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según cualquier reivindicación anterior en el que Ar es 1,4-fenileno que puede llevar opcionalmente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en cloro y especialmente flúor, tiofeno-2,5-diilo, tiazol-2,5-diilo o piridina 2,5-diilo.

7. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 6 en el que Ar es 1,4-fenileno, 1,4-fenileno que tiene un sustituyente 2-fluoro o piridina 2,5-diilo.

25 8. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica, según la reivindicación 7, en la que Ar es 1,4-fenileno o 2-fluoro-1,4-fenileno.

9. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 1 en el que el derivado de ciclopenta[g]quinazolina se selecciona de:

30 ácido N-{N-(4-[N-(2-metil-4-oxo-3,4,7,8-tetrahidro-6H-ciclopenta[g]quinazolin-6-il)-N-(prop-2-inil)amino]benzoi)-L-γ-glutamil)-D-glutámico; o

ácido N-{N-(4-[N-(2-hidroximetil-4-oxo-3,4,7,8-tetrahidro-6H-ciclopenta[g]quinazolin-6-il)-N-(prop-2-inil)amino]benzoi)-L-γ-glutamil)-D-glutámico; o

una de sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

35 10. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según la reivindicación 9 en el que el derivado de ciclopenta[g]quinazolina está presente en forma de su isómero 6S.

11. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según cualquier reivindicación anterior en el que el derivado de ciclopenta[g]quinazolina se administra junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 12. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según cualquier reivindicación anterior en el que la leucemia mielocítica es la leucemia mielocítica aguda.
13. Un derivado de ciclopenta[g]quinazolina para su utilización en el tratamiento de la leucemia mielocítica según cualquier reivindicación anterior en el que la leucemia mielocítica es la leucemia mielocítica crónica.

Figura 1

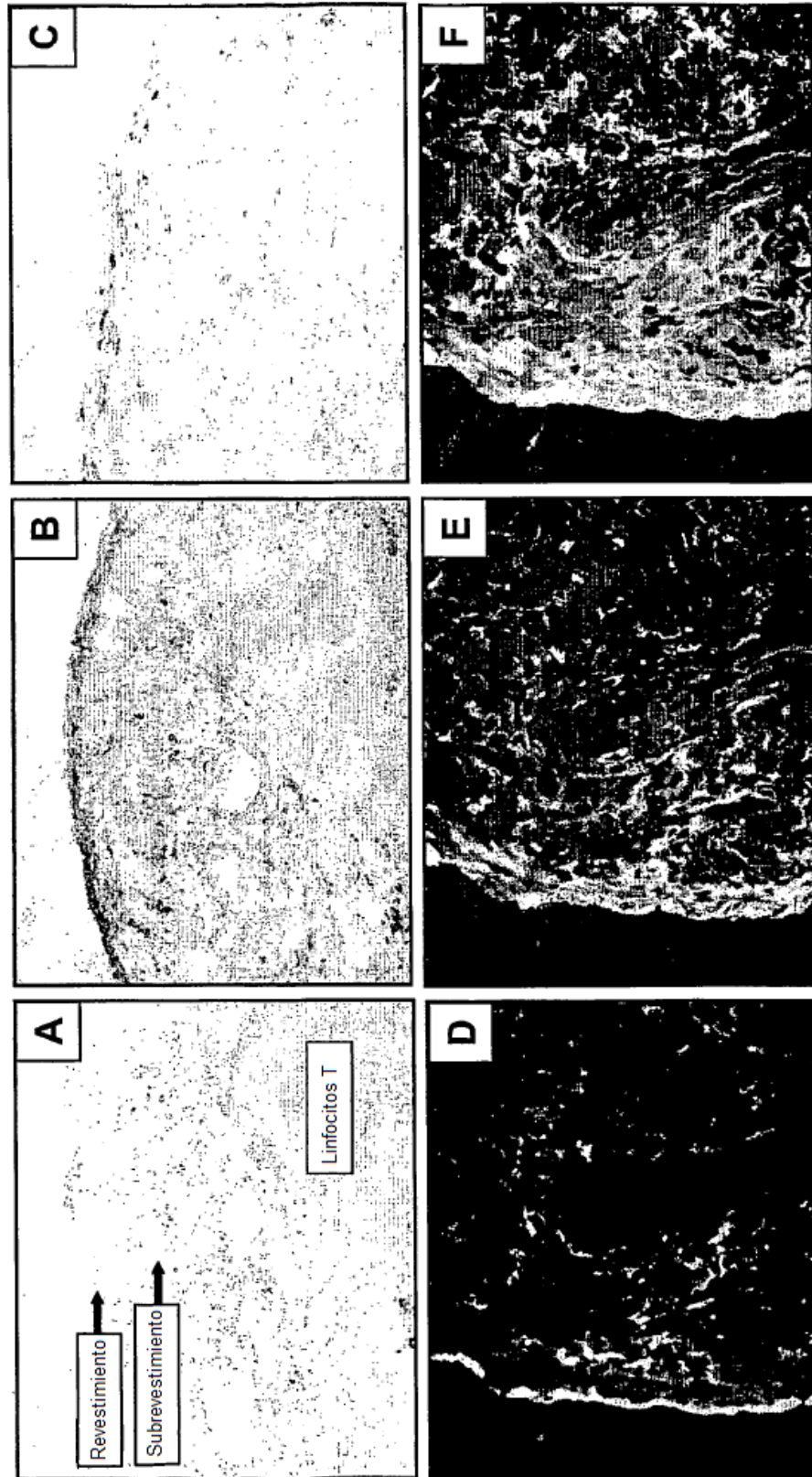


Figura 2

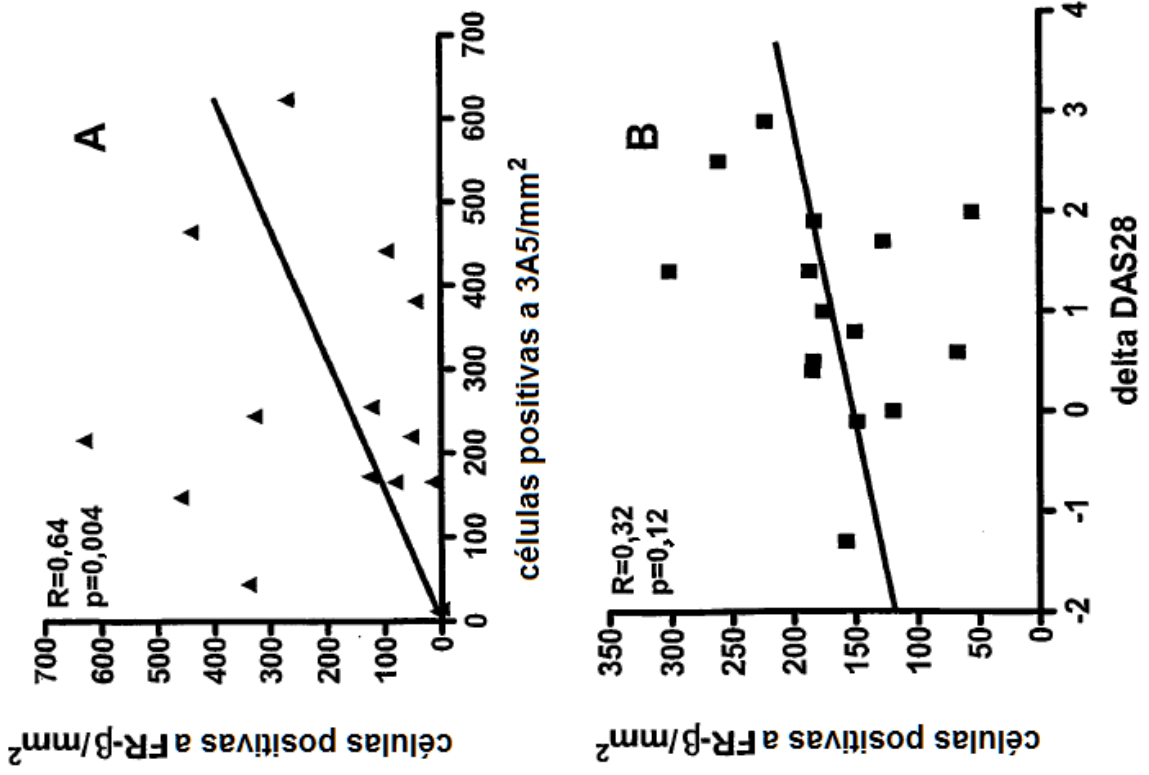


Figura 3

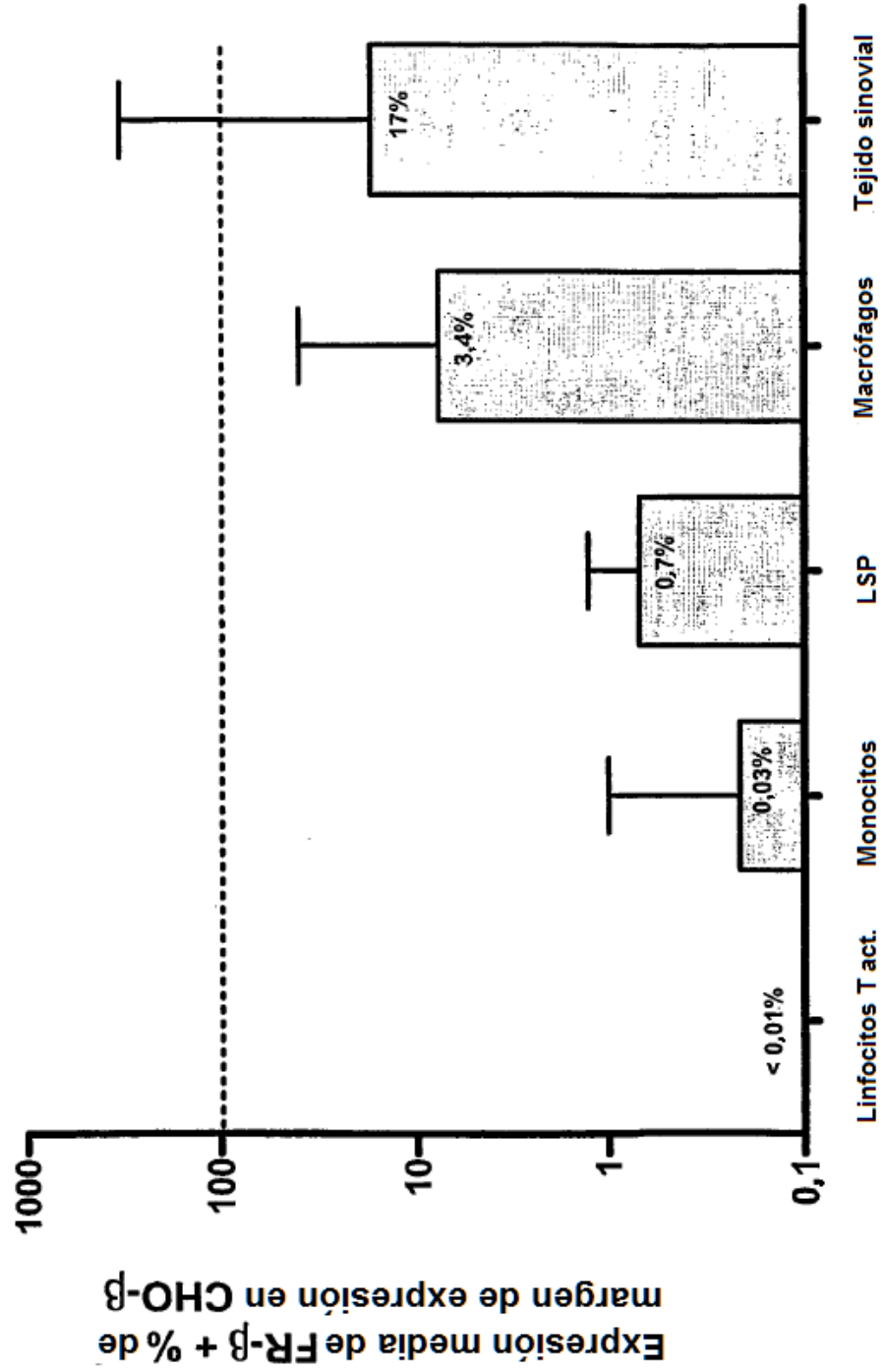


Figura 4

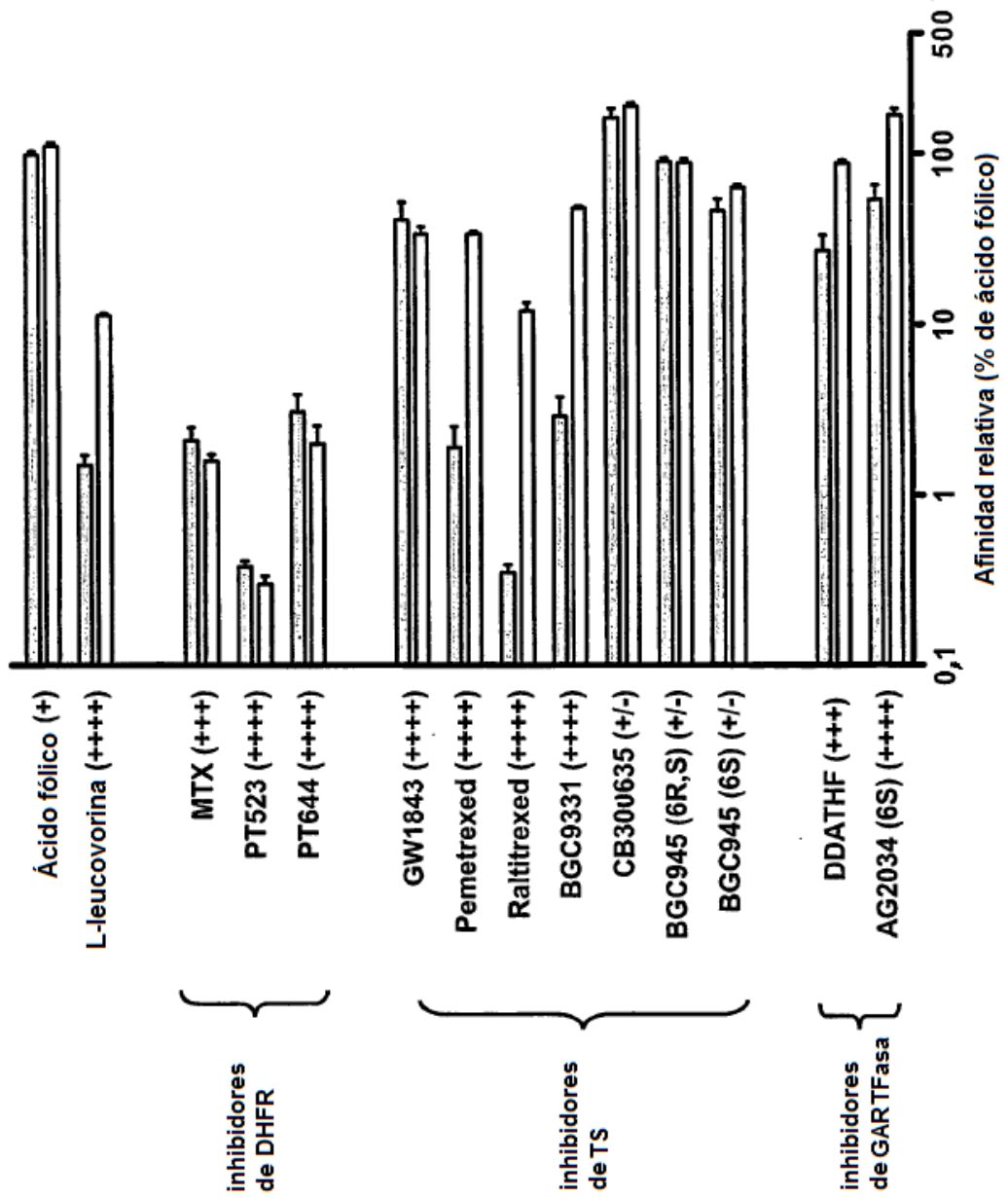


Figura 5

