(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 536 285**

(51) Int. Cl.:

C07K 11/02 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2004** **E 13180582 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 2664623**

(54) Título: **Nuevos compuestos antitumorales**

(30) Prioridad:

09.09.2003 GB 0321066

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2015

(73) Titular/es:

PHARMA MAR, S.A.U. (100.0%)
Polígono Industrial La Mina Avda. de los Reyes, 1
28770 Colmenar Viejo, Madrid, ES

(72) Inventor/es:

FERNÁNDEZ DONIS, ARIADNA;
GIRALT LLEDÓ, ERNEST;
GRACIA CANTADOR, CAROLINA;
LÓPEZ RODRÍGUEZ, PILAR;
VARÓN COLOMER, SONIA;
CUEVAS MARCHANTE, CARMEN;
LÓPEZ MACIA, ÁNGEL;
FRANCESCH SOLLOSO, ANDRÉS;
JIMÉNEZ GARCÍA, JOSÉ-CARLOS;
ROYO EXPÓSITO, MIRIAM y
ALBERICIO PALOMERA, FERNANDO

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 536 285 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

Nuevos compuestos antitumorales

Campo de la invención

La presente invención se dirige a nuevos compuestos antitumorales de kahalalido, en particular a análogos de kahalalido F, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso como agentes antitumorales, antifúngicos y en el tratamiento de la psoriasis.

Antecedentes de la invención

Los compuestos de kahalalido son péptidos aislados de una especie de molusco herbívoro marino hawaiano, Elysia rufescens y su alimento el alga verde Bryopsis sp. El kahalalido F se describe en Hamann, M. et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 5825-5826.

Kahalalido A-G se describen en Hamann, M. et al., J. Org. Chem. 1996, 61, 6594-6600: “Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk Elysia rufescens and its algal diet Bryopsis sp.”.

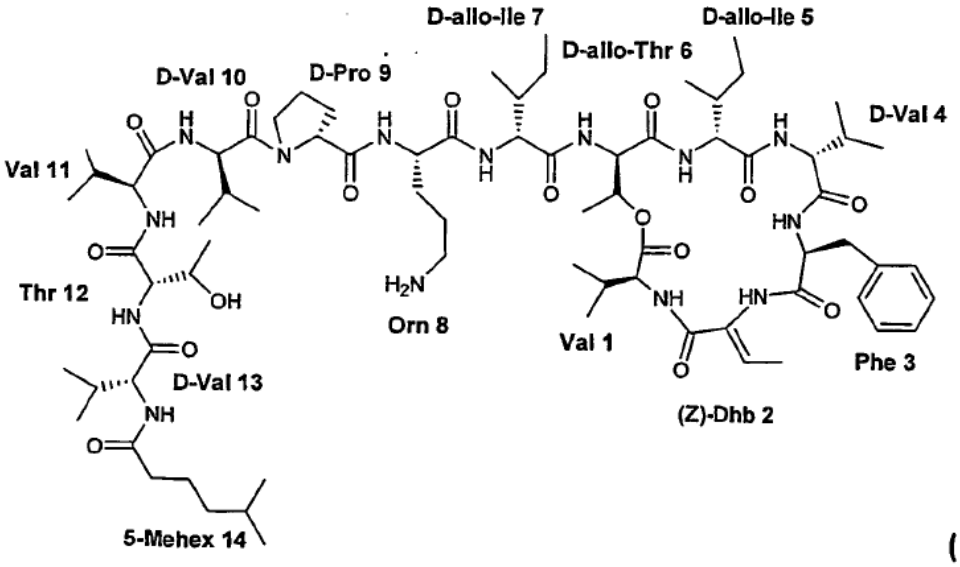
Kahalalido H y J se describen en Scheuer P.J. et al., J. Nat. Prod. 1997, 60, 562-567: “Two acyclic kahalalides from the sacoglossan mollusk Elysia rufescens”.

Kahalalido O se describe en Scheuer P.J. et al., J. Nat. Prod. 2000, 63(1): 152-4: “A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk Elysia ornata and the green alga Bryopsis species”.

Para kahalalido K, ver Kan, Y. et al., J. Nat. Prod. 1999 62(8) 1169-72: “Kahalalide K: A new cyclic depsipeptide from the hawaiian green alga Bryopsis species”.

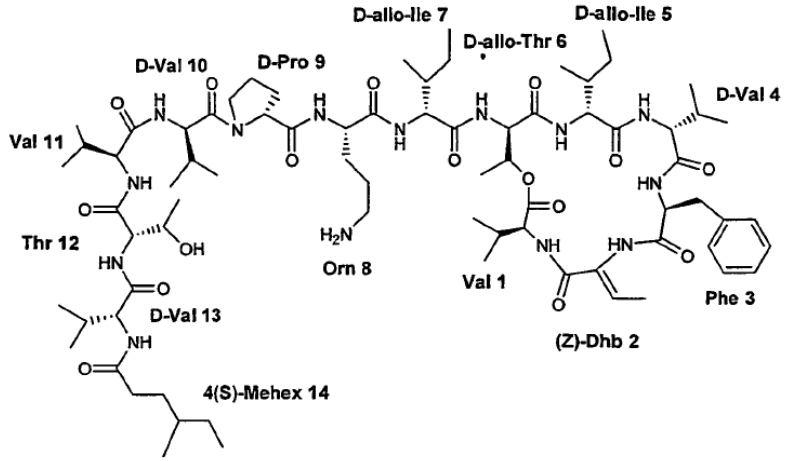
Para artículos relacionados, ver también Goetz et al, Tetrahedron, 1999, 55; 7739-7746: “The absolute stereochemistry of Kahalalide F”; Albericio, F. et al. Tetrahedron Letters, 2000, 41, 9765-9769: “Kahalalide B. Synthesis of a natural cyclodepsipeptide”; Becerro et al. J. Chem. Ecol. 2001, 27(11), 2287-99: “Chemical defenses of the sarcoglossan mollusk Elysia rufescens and its host Alga bryopsis sp.”.

De los compuestos de kahalalido, el más prometedor es kahalalido F debido a su actividad antitumoral. Su estructura es compleja, comprende seis aminoácidos como una parte cíclica, y una cadena exocíclica de siete aminoácidos con un grupo ácido graso terminal. Originalmente se describió que el kahalalido F tenía la estructura (I).



(1).

En WO 04035613 se describe el compuesto 4(S)-metilhexilo con la siguiente fórmula (II).



(II)

Se describieron la actividad del kahalalido F contra cultivos celulares de carcinoma de pulmón humano A-549 y carcinoma de colon humano HT-29 *in vitro* en EP 610 078. También se ha demostrado que el kahalalido F tiene propiedades antivíricas y antifúngicas, así como que es útil en el tratamiento de la soriasis.

WO 02 36145 describe composiciones farmacéuticas que contienen kahalalido F y nuevos usos de este compuesto en la terapia contra el cáncer.

WO 03 33012 describe el uso clínico en oncología de compuestos de kahalalido.

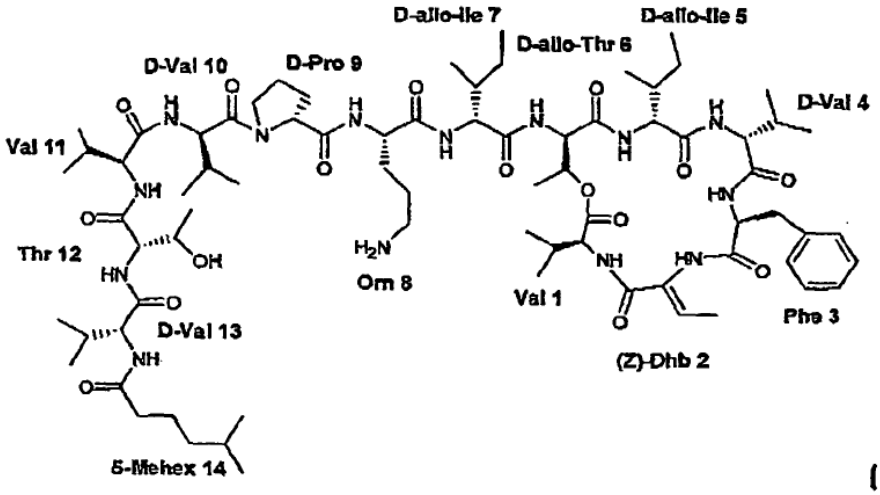
La síntesis y actividades citotóxicas de compuestos de kahalalido naturales y sintéticos se describe en WO 01 58934. WO 01 58934 describe la síntesis de kahalalido F y también de compuestos con estructura similar en los que la cadena de ácido graso terminal se sustituye por otros ácidos grasos.

Existe todavía una necesidad de proporcionar más compuestos antitumorales, en particular más compuestos de kahalalido con propiedades mejoradas.

Compendio de la invención

Se han encontrado compuestos análogos de kahalalido con actividad biológica mejorada.

La presente invención se dirige a un compuesto basado en la estructura de Kahalalido F de fórmula 1, denominado KF.



(1)

que es [Orn[11]]-KF, en el que el aminoácido indicado entre paréntesis es la modificación introducida en la estructura de kahalalido F; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se ha definido previamente y un soporte, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se dirige al compuesto o composición como se ha definido previamente para su uso como medicamento. En una realización preferida, el compuesto o composición es para su uso en el tratamiento del cáncer, psoriasis, infecciones virales o infecciones fúngicas.

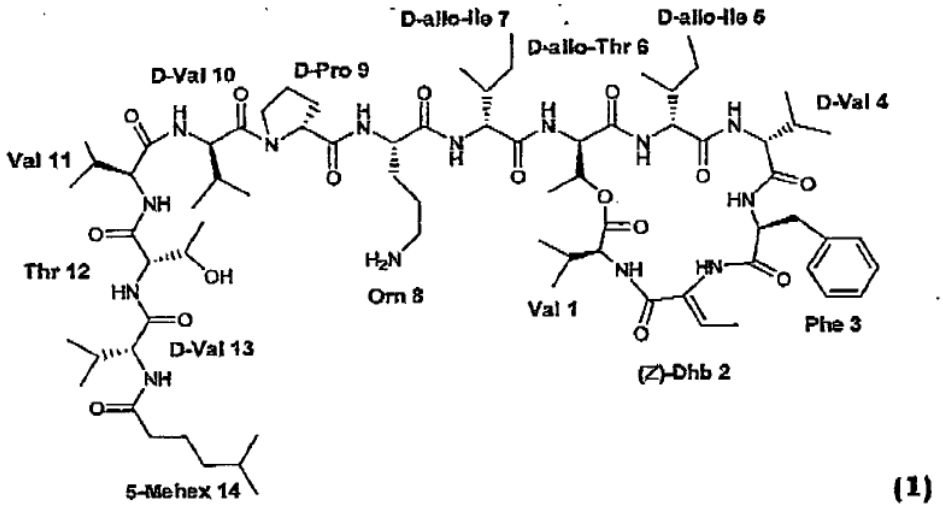
El compuesto de la presente invención se puede emplear para su uso en el tratamiento de pacientes con cánceres resistentes que no responden favorablemente a otros tratamientos. En particular, las composiciones de esta invención se pueden emplear después de que se haya probado otra quimioterapia y no haya funcionado.

La presente invención se dirige particularmente a los compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento de pacientes afectados por cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer NSCL, cáncer epitelial, cáncer de páncreas y tumores que sobreexpresan el oncogén Her2/neu.

Descripción detallada de la invención

Se ha identificado un análogo kahalalido F que muestra una mejora significativa en la actividad con respecto al kahalalido F.

La presente invención se dirige a un compuesto basado en la estructura de kahalalido F de fórmula 1, denominado KF



que es [Orn[11]]-KF, en el que el aminoácido indicado entre paréntesis es la modificación introducida en la estructura de kahalalido F; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los aminoácidos naturales incluyen, alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, cisteína, aspartato, asparagina, ácido glutámico, glutamina, lisina, arginina, prolina, serina, treonina, histidina e hidroxiprolina.

También se hace referencia a WO 0158934. Este texto anterior da consejos que son aplicables a los compuestos de esta invención.

Las abreviaturas usadas en la siguiente descripción para los aminoácidos y designaciones de péptidos siguen las reglas de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB en J. Biol. Chem., 1972, 247, 977-983.

Alloc	aliloxicarbonilo
Boc	*terc*-butiloxicarbonilo
t-Bu	*terc*-butilo
Cl-TrtCl-resina	resina de cloruro de 2-clorotritilo

Z-Dhb	ácido α,β-dideshidro-α-aminobutírico
DIPEA	*N,N*-diisopropiletilamina
DMF	*N,N*-dimetilformamida
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
GI50	inhibición del crecimiento del 50 %
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
LC50	concentración letal 50 %
MeHex-OH	ácido metilhexanoico
TFA	ácido trifluoroacético

Los símbolos de aminoácidos indican la configuración L a menos que se especifique de otra manera.

La presente invención también abarca las sales, profármacos, tautómeros y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El compuesto de la presente invención tiene centros asimétricos y por lo tanto existen en diferentes formas enantioméricas y diastereómicas. La presente invención se refiere al uso de todos los isómeros ópticos y estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, y mezclas de los mismos, y a todas las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que los pueden emplear o contenerlos.

El compuesto de la invención puede estar en forma cristalina bien como un compuesto libre o bien como un solvato (por ejemplo un hidrato) y se pretende que ambas formas estén en el ámbito de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en la técnica.

La presente invención también incluye el compuesto de la presente invención, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde uno o más hidrógenos, carbonos u otros átomos se cambian por isótopos de los mismos. Tales compuestos pueden ser útiles como herramientas de investigación y diagnóstico en estudios farmacocinéticos de metabolismo y en ensayos de unión.

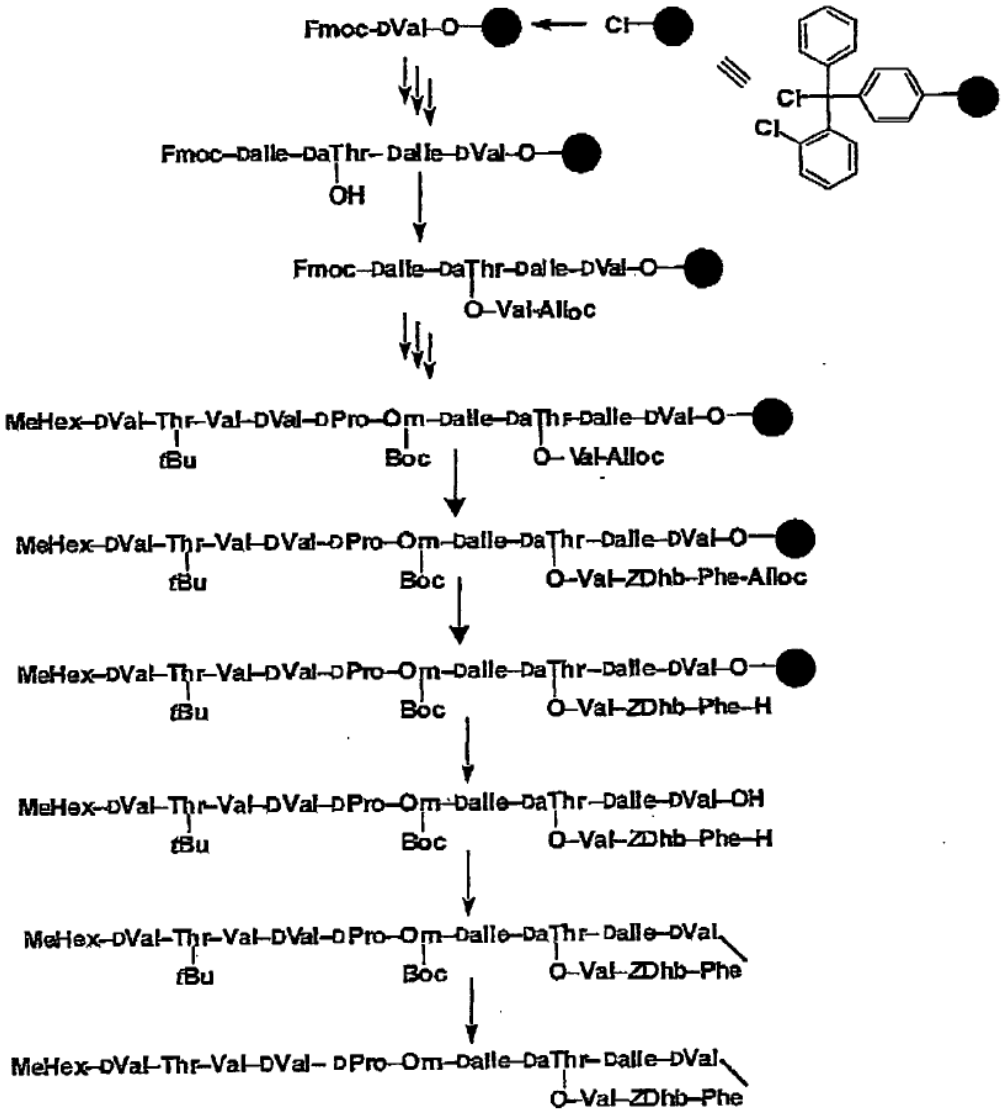
Las sales del compuesto de la presente invención pueden comprender sales de adición ácida derivadas de un nitrógeno en el compuesto de fórmula 1 ó 2. La actividad terapéutica reside en el grupo derivado del compuesto de la invención como se ha definido aquí y la identidad del otro componente es de menor importancia aunque para fines terapéuticos y profilácticos es, preferiblemente, farmacéuticamente aceptable para el paciente. Ejemplos de sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos tales como tartárico, acético, trifluoroacético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y metanosulfónico y ácidos arilsulfónicos, por ejemplo p-toluensulfónico. Las sales preferidas incluyen la sal trifluoroacetato y la sal clorhidrato.

El compuesto de la presente invención se puede preparar según el procedimiento de síntesis descrito en WO 01 58934, o según el proceso mejorado como se describe aquí. Por lo tanto, también se describe aquí un proceso para preparar un compuesto basado en la estructura de kahalido F de fórmula 1, denominado KF, que es [Orn^{11}]-KF, en el que el aminoácido indicado entre corchetes es la modificación introducida en la estructura de kahalalido F.

Los pasos clave del proceso optimizado para un síntesis más económica y segura del análogo de kahalalido F de la invención son: (i) incorporación parcial de Fmoc-D-Val-OH en la resina de clorotritilcloro-poliestireno para una carga inicial de 0,5 mmol/g; (ii) uso como método de acoplamiento de DIPCDI-HOBt, en lugar de HATU-DIPEA, para la incorporación secuencial de los aminoácidos protegidos y ácidos carboxílicos alifáticos; (iii) paso de ciclación con DIPCDI/HOBt/DIPEA en CH_2Cl_2; estas condiciones evitan las reacciones secundarias: epimerización del residuo de Val, que está implicado en la activación, y trifluoroacetilación de la Phe o su sustituto; (iv) uso de dietil-ditiocarbamato de sodio después de eliminar Alloc para evitar la presencia de Pd(0) en el producto final.

La síntesis es preferentemente un proceso de síntesis en fase sólida.

La realización preferida del proceso de síntesis de la presente invención se representa mejor en el esquema 1, que está dirigido a la formación de los compuestos diana.



Esquema 1

Como se muestra anteriormente en el esquema 1, el proceso preferido para la formación sintética de análogos de kahalalido F esta basado en una aproximación en fase sólida, ver por ejemplo Lloyd-Williams, P., et al Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Pess, Boca Raton (FL), 1997 y seguido con modificaciones del método ya descrito para la preparación de kahalalido F y alguno de sus análogos (WO 01 58934).

El proceso del esquema 1 comprende los pasos secuenciales de:

(a) incorporar Fmoc-DVal-OH en una resina de clorotritilo cloro, formando un enlace éster;

(b) elongar la cadena peptídica con tres aminoácidos [Dalle, DaThr (OH libre), Dalle) usando una estrategia Fmoc/tBu;

(c) incorporar [Val(1)] usando una estrategia Alloc/tBu;

(d) elongar la cadena peptídica con los aminoácidos restantes y ácidos carboxílicos alifáticos usando una estrategia Fmoc/tBu;

(e1) incorporar el dipéptido Alloc-Phe-ZDhb-OH, que se ha combinado y deshidratado en solución;

(e2a) elongar la cadena peptídica con dos aminoácidos, preferiblemente Thr y Phe. El OH de la Thr no está protegido y el grupo amino de la Phe, o su sustituto, está protegido con Fmoc o preferiblemente con Alloc; en

algunos casos si está protegido con Fmoc, este se elimina y se introduce Alloc en fase sólida;

(e2b) deshidratar en fase sólida para dar el dideshidropéptido;

(f) eliminar el grupo Alloc/Fmoc de la Phe, o su sustituto, mientras el péptido está todavía anclado al soporte sólido;

(g) cortar el péptido con cadena lateral protegida del soporte sólido;

(h) ciclar el péptido en solución:

(i) eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales sensibles a TFA.

(j) Modificaciones adicionales de grupo(s) funcional(es) en fase en solución.

Por lo tanto el proceso se puede realizar como sigue:

Se incorpora Fmoc-DVal-OH preferiblemente a una resina de clorotritilo-poliestireno, ver Barlos, K.; Gatos, D.; Schäfer, W. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991, 30, 590-593, en presencia de DIPEA manteniendo el nivel de sustitución de aproximadamente 0.5 mmol/g. El uso de cargas mayores produce la presencia de péptidos terminados en el producto final, ver Chiva, C.; Vilaseca, M.; Giralt, E.; Albericio, F. J. Pept. Sci. 1999, 5, 131-140.

Todas las proporciones de solventes son volumen/volumen a menos que se indique de otra manera.

La eliminación del grupo Fmoc se puede llevar a cabo con piperidina-DMF (2:8, v/v) (1 x 2 min, 2 x 10 min). Los acoplamientos de Fmoc-aa-OH (4-5 equivalentes) y de ácidos en la posición 14 se pueden llevar a cabo con DIPCDI-HOBt (cantidades equimolares de cada uno respecto al componente carboxílico) o PyBOP-DIPEA (cantidad equimolar de PyBOP y cantidad doble de DIPEA) en DMF o DMF-tolueno (1:1) durante 90 minutos. Después del acoplamiento se llevan a cabo las pruebas de ninhidrina o cloranilo y si es positiva se repite el acoplamiento en las mismas condiciones, de otra manera el proceso se continúa. Se pueden llevar a cabo lavados entre los pasos de desprotección, acoplamiento, y, de nuevo, desprotección con DMF (5 x 0,5 min) y CH_2Cl_2 (5 x 0,5 min) usando por ejemplo cada vez 10 mL de solvente/g de resina.

La incorporación de Alloc-Val-OH (5 equivalentes) se puede llevar a cabo con cantidades equimolares de DIPCDI y DMAP al 10 %. Este acoplamiento se repite al menos dos veces.

La eliminación del grupo Alloc se puede llevar a cabo con $Pd(PPh_3)_4$ (0,1 equivalente) en presencia de $PhSiH_3$ (10 equivalentes), ver Gómez-Martínez, P.; Thieriet, N.; Albericio, F.; Guibé, F. J. Chem. Soc. Perkin I 1999, 2871-2874, y lavar la resina con dietilditiocarbamato de sodio en DMF 0,02 M (3 x 15 min).

El dipéptido Alloc-Phe-ZDhb-OH (4 equivalentes), que se preparó en solución a partir de Alloc-Phe-OH y H-Thr-OtBu con EDC·HCl, y posterior deshidratación y tratamiento con TFA, se puede acoplar con DIPCDI-HOAt (4 equivalente de cada uno) durante 5 horas a toda la noche. El uso de otros reactivos de acoplamiento basados en HOBt, tales como HBTU o DIPCDI-HOBt, ha llevado a incorporaciones incompletas del dipéptido.

Se puede llevar a cabo la deshidratación en fase sólida con EDC·HCl (cabodiimida soluble en agua, 20 equivalentes) en presencia de CuCl (12 equivalentes) en CH_2Cl_2-DMF (9:1) durante 7 días. Se ha usado EDC·HCl/CuCl por deshidratación en solución de un residuo de Thr en un fragmento de nisina (Fukase, K.; Kitazawa, M.; Sano, A.; Shimbo, K.; Horimoto, S.; Fujita, H.; Kubo, A.; Wakamiya, T.; Shibe, A. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1992, 65, 2227-2240) y en fase sólida para la preparación de dideshidropéptidos a partir de Thr, Ser, y fenilserina (Royo, M.; Jiménez, J.C.; López-Macià, A.; Giralt, E.; Albericio, F. Eur. J. Org. Chem. 2001, 45-48).

El corte del péptido protegido de la resina se puede conseguir mediante TFA-CH2Cl2 (1:99) (5 x 30 segundos).

El paso de ciclación se puede llevar a cabo con DIPCDI/HOBt/DIPEA en CH_2Cl_2. Estas condiciones evitan las reacciones secundarias: epimerización del residuo de Val, que está implicado en la activación, y trifluoroacetilación de la Phe o su sustituto.

La desprotección final se puede llevar a cabo con TFA-H_2O (95:5) durante 1 hora.

Se apreciará que la elección particular de grupos de protección no es crítica, y otras elecciones están ampliamente disponibles. Por ejemplo, los grupos tipo Bzl pueden sustituir a tBu/Boc; Boc en lugar de Fmoc; Fmoc en lugar de Alloc; resina Wang en lugar de clorotritilo.

Se dan más detalles de la síntesis en los ejemplos.

El proceso de esta invención se puede llevar a cabo a partir de materiales de partida de una manera enantiómero-, estereo- controlada y rápida, tomando las ventajas de la metodología de síntesis en fase sólida, donde la molécula en construcción se une a un soporte insoluble durante todas las operaciones de síntesis.

Las composiciones farmacéuticas del compuesto de la invención se pueden adaptar para la administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo por la vía oral (incluyendo gingiviomaxilar o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo gingiviomaxilar, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, poniendo en asociación el principio activo con el(los) soporte(s) o excipiente(s).

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas del compuesto de la invención incluyen líquidos (soluciones, suspensiones o emulsiones) con composición adecuada para la administración intravenosa, y puede contener el compuesto puro o en combinación con cualquier soporte u otros compuestos farmacológicamente activos. Se pueden encontrar más consejos respecto a las composiciones farmacéuticas en WO 02 361450.

De esta manera, una combinación de un agente tensoactivo no iónico y un ácido orgánico es adecuada para usar con un agente de carga para dar una forma liofilizada de un compuesto de la invención adecuada para reconstitución. La reconstitución se efectúa preferiblemente con una mezcla de solubilizador emulsionante, alcanol y agua.

La composición liofilizada preferiblemente comprende principalmente el agente de carga, tal como al menos el 90 % o al menos el 95 % de agente de carga. Ejemplos de agentes de carga son bien conocidos e incluyen sacarosa y manitol. Se pueden utilizar otros agentes de carga.

El agente tensoactivo no iónico en la composición liofilizada es preferiblemente un éster sorbitano, más preferiblemente un éster sorbitano de polietileno, tal como alcanoato sorbitano de polioxietileno, especialmente un mono-oleato sorbitano de polioxietileno, por ejemplo polisorbato 80. El agente tensoactivo no iónico normalmente comprende poco % de la composición, tal como del 0 al 5 % de la composición, por ejemplo del 2 al 3 o al 4 % de la composición.

El ácido orgánico en la composición liofilizada es normalmente un ácido alifático, preferiblemente un ácido hidroxicarboxílico y más preferiblemente un ácido hidroxipolicarboxílico, notablemente ácido cítrico. El ácido orgánico normalmente comprende poco % de la composición, tal como del 0 al 5 % de la composición, por ejemplo del 2 al 3 o al 4 % de la composición.

La cantidad de compuesto de la invención en la composición liofilizada es normalmente menor del 1 %, o con frecuencia menor del 0,1 %, de la mezcla. Una cantidad adecuada está en el intervalo de 50 a 200 µg, digamos alrededor de 100 µg, por 100 mg de composición.

El solubilizador emulsionante para el agente de reconstitución adecuadamente comprende un éster de polietilenglicol, notablemente un éster de un ácido graso, más preferiblemente un oleato de PEG tal como oleato de PEG-35. El solubilizador emulsionante es adecuadamente del 0 al 10 % del agente de reconstitución, normalmente alrededor del 3 al 7 %, digamos alrededor del 5 %. El alcanol es normalmente etanol, y es adecuadamente del 0 al 10 % del agente de reconstitución, normalmente alrededor del 3 al 7 %, digamos alrededor del 5 %. El resto del agente de reconstitución es agua, y da una solución reconstituida adecuada para la inyección intravenosa.

Pueden ser adecuadas diluciones adicionales de la solución reconstituida con solución salina al 0,9 % para infusión del compuesto de kahalalido. El equipo adecuado de infusión preferiblemente incluye un envase de vidrio, más que uno de polietileno. Los tubos son preferiblemente de silicona.

El agente de reconstitución preferido comprende entonces del 2 al 7 % digamos alrededor del 5 %, de solubilizador emulsionante; del 2 al 7 % digamos alrededor del 5 %, de alcohol; y el resto agua.

Las formulaciones pueden estar presentadas en envases unidosis o multidosis, por ejemplos ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en forma liofilizada que requiere sólo la adición del soporte líquido estéril, por ejemplo agua para las inyecciones, inmediatamente antes de su uso.

La administración del compuesto o composiciones de la presente invención es mediante infusión intravenosa. Se pueden usar tiempos de infusión de hasta 72 horas, más preferiblemente de 1 a 24 horas, con alrededor de 1 hora o alrededor de 3 horas lo más preferido. Los tiempos cortos de infusión que permiten que el tratamiento se lleve a cabo sin pernoctar en el hospital son especialmente deseables. Sin embargo, la infusión puede ser de alrededor de 24 horas o incluso más larga si se requiere.

La administración se realiza en ciclos, en el método de aplicación preferido, se da una infusión intravenosa de un compuesto de la invención a los pacientes la primera semana de cada ciclo, se deja que los pacientes se recuperen durante el resto del ciclo. La duración preferida de cada ciclo es de 1, 3 ó 4 semanas; se pueden dar ciclos múltiples

según se necesite. En un protocolo de dosificación alternativo, el compuesto de la invención se administra durante digamos alrededor de 1 hora durante 5 días consecutivos cada 3 semanas. Se pueden idear otros protocolos como variaciones.

Los retrasos de dosis y/o reducciones de dosis y ajustes de programa se realizan según se necesite dependiendo en la tolerancia individual del paciente de tratamientos, en particular se recomiendan reducciones de dosis para pacientes con niveles en suero más altos de lo normal de transaminasas hepáticas o fosfatasa alcalina.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento a un paciente humano afectado de cáncer, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto de la invención a una dosis por debajo de 1200 mcg/m2/día, preferiblemente por debajo de 930 mcg/m2/día y más preferiblemente por debajo de 800 mcg/m2/día. Adecuadamente la dosis es al menos de 320 mcg/m2/día. Preferiblemente la dosis está en el intervalo de 400-900 mcg/m2/día, preferiblemente 500-800 mcg/m2/día, más preferiblemente 600-750 mcg/m2/día. Especialmente preferidas son dosis de alrededor de 650-700 mcg/m2/día.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento a un paciente humano afectado de cáncer, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto de la invención diariamente durante 5 días a una dosis por debajo de 930 mcg/m2/día, seguido por un período de descanso de desde 1 hasta 4 semanas en las que no se administra el compuesto kahalalido. La dosis es preferiblemente de 650-750 mcg/m2/día, más preferiblemente alrededor de 700 mcg/m2/día. El tiempo de infusión está preferiblemente entre 1 y 24 horas, más preferiblemente entre 1 y 3 horas. Especialmente preferido es un tiempo de infusión de alrededor de 1 o alrededor de 3 horas. El período de descanso es preferiblemente 2-3 semanas, más preferiblemente alrededor de 2 semanas.

La presente invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento a un paciente humano afectado de cáncer, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto de la invención una vez a la semana a una dosis por debajo de 800 mcg/m2/día. La dosis es preferiblemente de 600-700 mcg/m2/día, más preferiblemente alrededor de 650 mcg/m2/día. El tiempo de infusión está preferiblemente entre 1 y 24 horas, más preferiblemente entre 1 y 3 horas.

Aunque anteriormente se han dado consejos sobre la dosificación, la dosis correcta del compuesto variará según la formulación particular, el modo de aplicación, y el sitio, huésped y tumor particular, a ser tratados. También se tendrán en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, afección del huésped, combinaciones de drogas, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. La administración se puede llevar a cabo de forma continua o periódica con la máxima dosis tolerada.

La presente invención se dirige particularmente al compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento a pacientes afectados con cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón no microcítico (NSCL), cáncer epitelial, cáncer pancreático y tumores que sobreexpresan el oncogen Her2/neu. Más preferentemente, se dirige al compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático y cáncer de próstata.

La presente invención también se dirige al compuesto de la presente invención para su uso en un método para tratar una enfermedad de la piel que implica la hiperproliferación de las células de la dermis en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz no tóxica de un compuesto de la invención. La enfermedad de la piel es preferiblemente soriasis. La presente invención se dirige preferentemente al tratamiento de pacientes humanos afectados por soriasis, en particular soriasis grave.

Los compuestos y composiciones de esta invención se pueden usar con otras drogas para proporcionar una terapia de combinación. Las otras drogas pueden formar parte de la misma composición, o ser proporcionadas como una composición separada para administrar al mismo tiempo o a un tiempo diferente. La identidad de las otras drogas no está particularmente limitada, aunque se prevé la combinación con otros agentes quimioterapéuticos, hormonales o anticuerpos. Las cantidades del compuesto de la invención y del otro agente u agentes farmacéuticamente activo(s) y los tiempos relativos de administración se seleccionarán para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

Ejemplos

Procedimientos Generales

La resina Cl-TrtCl, los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc, HOBt, HOAt fueron de ABI (Framingham, MA), Bachem (Bubendorf, Suiza), NovaBiochem (Läufelfingen, Suiza), los derivados de 4-MeHex de Narchem, HATU y otros derivados de guanidilación fueron de ABI (Framingham, MA) o se prepararon como en del Fresno, M.; El-Faham, A.; Carpino, L.A.; Royo, M.; Albericio, F, Organic Lett., 2000, 2, 3539-3542.

Los Alloc-aminoácidos se prepararon esencialmente como en Dangles et al., ver Dangles, O.; Guibé, F.; Balavoine, G.; Laviele, S.; Marquet A. J. Org. Chem. 1987, 52, 4984-4993 y Alloc-Z-Dhb-Phe-OH y kahalalido F como se describe en WO 01 58934, DIPFA, DIPCDI, EDC·HCl, piperidina, TFA fueron de Aldrich (Milwaukee, WI). DMF y CH_2Cl_2 fueron de SDS (Peypin, Francia). Acetronitrilo (grado HPLC) fue de Scharlau (Barcelona, España). Todos los reactivos y solventes comerciales se usaron como se recibieron con excepción de CH_2Cl_2, que se pasó a través de una columna de alúmina para eliminar los contaminantes ácidos.

Las síntesis en fase sólida se llevaron a cabo en jeringuillas de polipropileno (10-50 mL) equipadas con un disco poroso de polietileno. Los solventes y reactivos solubles se eliminaron por succión. La eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina-DMF (2:8, v/v) (1 x 2 min, 2 x 10 min). Los lavados entre los pasos de desprotección, acoplamiento, y de nuevo, desprotección se llevaron a cabo con DMF (5 x 0,5 min) y CH_2Cl_2 (5 x 0,5 min) usando cada vez 10 mL de solvente/g de resina. Las transformaciones y lavados de la síntesis de péptidos se realizaron a 25 ºC. Las síntesis llevadas a cabo en fase sólida se controlaron mediante HPLC de los intermediarios obtenidos después de cortar con TFA-H_2O (1:99) durante 1 minuto un alícuota de (aproximadamente 2 mg) peptidil-resina. Las columnas de HPLC de fase inversa [Nucleosil-C_{18} 4,6 x 250 mm, 10 µm (columna A); Nucleosil-C_4 4,6 x 250 mm, 10 µm (columna B) fueron de Sharlau (España); Symetry™ C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (columna C); Symetry300™ C_{18} 4,6 x 50 mm, 5 µm (columna D) fueron de Waters (Irlanda) y Zorbax SB C18 4,6 x 150 mm, 3,5 µm (columna E) fue de Agilent (EE.UU.)]. El HPLC analítico se llevó a cabo en un instrumento Waters que comprendía dos bombas de distribución de solvente (Waters 1525), inyector automático (Waters 717 automuestra), detector dual de longitud de onda (Waters 2487), y controlador de sistema (Breexe V3.20) y en un instrumento Agilent 1100 que comprendía dos bombas de distribución de solvente (G1311A), inyector automático (G1329A), DAD (G1315B). La detección UV fue a 215 ó 220 nm, y los gradientes lineales de CH_3CN (+0,036 % de TFA) en H_2O (+0,045 % de TFA) se corrieron en las siguientes condiciones:

Tabla I

Condiciones cromatográficas	Flujo (mL/min)	Gradiente (% de CH3CN)	Tiempo de carrera (min)
A	1,0	30 a 100	30
B	1,0	40 a 60	15
C	1,0	45 a 60	8
D	1,0	40 a 70	8
E	1,0	45 a 70	8
F	1,0	40 a 70	15
G	1,0	40 a 65	15
H	1,0	10 a 100	30
I	1,0	45 a 65	15
J	1,0	40 a 70	15
K	1,0	55 a 75	15
L	1,0	40 a 100	15
M	1,0	50 a 100	8
N	1,0	35 a 60	15
O	1,0	50 a 100	30
P	1,0	50 a 100	15
Q	1,0	Isocrático a 45	15
R	1,0	30 a 100	15
S	1,0	20 a 100	8
T	0,6	35 a 90	25
U	0,7	40 a 70	50
V	0,8	10 a 48 en 15 min e isocrático 30 min	45
W	1,0	10 a 70	50
X	1,0	10 a 48 en 15 min e isocrático 30 min	45
Y	0,8	10 a 60	50
Z	0,7	15 a 70	55
AB	0,8	10 a 60	55
AC	0,8	30 a 60	45
AD	0,8	10 a 48 en 10 min e isocrático 30 min	40
AE	1,0	45 a 90	25
AF	1,0	40 a 100	8

Los análisis de MALDI-TOF y ES-MS de muestras de péptidos se realizaron en un PerSeptive Biosystems Voyager DE RP, usando matriz DHB, y en un espectrómetro Waters Micromass ZQ y en un Agilent Ion Trap 1100 Series LC/MSDTrap. Las muestras de péptido-resina se hidrolizaron en HCl acuoso 12 N-ácido propiónico (1:1), a 155 ºC durante 1-3 horas y las muestras de péptido libre se hidrolizaron en HCl acuoso 6 N a 155 ºC durante 1 hora. Los análisis de aminoácidos posteriores se realizaron en un autoanalizador Beckman System 6300. La espectroscopia ^{1}H-RMN [1H, NOESY, TOCSY a (278K)] se realizó en un Varian Unity Plus (500 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón campo abajo de TMS. Las constantes de acoplamiento se expresan en hercios.

Los nombres de los análogos se nombran con relación al isómero 5-metilhexilo de kahalalido F de fórmula (I), indicando entre corchetes el residuo modificado; el sufijo “no” indica la eliminación del residuo natural de la secuencia.

Ejemplo 1

(4S)-MeHex-D-Val-ThrVal-D-Val-D-Pro-Orn-D-alo-Ile-ciclo[D-alo-Thr-D-alo-Ile-D-Val-Phe-(Z)Dhb-Val], [(4S)-MeHex^{14}]-Kahalalido F

(Compuesto de referencia 1)

Paso 1

H-D-Val-O-TrtCl-resina

Se colocó Cl-Trt-Cl-resina (1 g, 1,64 mmol/g) en una jeringuilla de 20 mL de polipropileno equipada con disco filtro de polietileno. La resina se lavó después con CH_2Cl_2 (5 x 0,5 min), y se añadió una solución de Fmoc-D-Val-OH (238 mg, 0,7 mmol, 0,7 equivalentes) y DIPEA (0,41 mL) en CH_2Cl_2 (2,5 mL), y la mezcla se agitó durante 15 min, después DIPEA (0,81 mL, 7 equivalentes total, 7 mmol) extra y la mezcla se agitó durante 45 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de MeOH (800 µL), después de una agitación de 10 minutos. Se sometió Fmoc-D-Val-O-TrtCl-resina a los siguientes lavados/tratamientos con CH_2Cl_2 (3 x 0,5 min), DMF (3 x 0,5 min), piperidina como se indica en los Procedimientos Generales, y DMF (5 x 0,5 min). La carga calculada mediante la determinación de Fmoc fue de 0,50 mmol/g.

Paso 2

Fmoc-D-alo-Ile-D-alo-Thr(Val-Alloc)-D-alo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina

Se añadieron de forma secuencial Fmoc-D-alo-Ile-OH (707 mg, 2 mmol, 4 equivalentes), Fmoc-D-alo-Thr-OH (grupo hidroxi libre) (683 mg, 2 mmol, 4 equivalentes), y Fmoc-D-alo-Ile-OH (707 mg, 2 mmol, 4 equivalentes) a la H-D-Val-O-TrtCl-resina obtenida anteriormente usando DIPCDI (310 µL, 2 mmol, 4 equivalentes) y HOBt (307 mg, 2 mmol, 4 equivalentes) en DMF (2,5 mL). En todos los casos, después de 90 minutos de acoplamiento, la prueba de la ninhidrina fue negativa. La eliminación del grupo Fmoc y los lavados se llevaron a cabo como se describe en los Procedimientos Generales. Se acopló Alloc-Val-OH (502 mg, 2,5 mmol, 5 equivalentes) con DIPCDI (387 mg, 2,5 mmol, 5 equivalentes) en presencia de DMAP (30,6 mg, 0,25 mmol, 0,5 equivalentes) y DIPEA (88 µL, 0,5 mmol, 1 equivalente) durante 45 minutos. Este acoplamiento se repitió en las mismas condiciones dos veces. Se trató una alícuota de la peptidil-resina con TFA y el HPLC (tR 7,8 min, condiciones S, columna D) del crudo obtenido después de la evaporación mostró una pureza de >98 %. ESMS, calculada para $C_{45}H_{63}N_5O_{11}$, 849,45. Determinada: m/z 850,1 $[M+H]^+$.

Paso 3

Fmoc-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-alo-Ile-D-alo-Thr(Val-Alloc)-D-alo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina.

El grupo Fmoc se eliminó y se añadieron de forma secuencial Fmoc-Orn(Boc)-OH (912 mg, 2 mmol, 4 equivalentes), Fmoc-D-Pro-OH (843 mg, 2,5 mmol, 5 equivalentes), y Fmoc-D-Val-OH (255 mg, 2,5 mmol, 5 equivalentes) a la peptidil-resina anterior (Paso 2) usando DIPCDI (310 µL, para 2,0 mmol y 4 equivalentes; y 388 µL, para 2,5 mmol y 5 equivalentes) y HOBt (307 mg, para 2 mmol y 4 equivalentes; y 395 mg, para 2,5 mmol y 5 equivalentes) durante 90 minutos. La prueba de la ninhidrina después de la incorporación de Orn y D-Pro fue negativa. El cloranilo después de la incorporación de D-Val fue ligeramente positivo y por lo tanto se llevó a cabo un reacoplamiento de este residuo con Fmoc-D-Val-OH (678 mg, 2,0 mmol, 4 equivalentes), DIPCDI (310 µL, 2,0 mmol, 4 equivalentes) y HOBt (307 mg, 2,0 mmol, 4 equivalentes) durante 90 minutos. Se trató una alícuota de la peptidil-resina con TFA y el HPLC (t_R 10,1 min, condiciones S, columna D) del crudo obtenido después de la evaporación mostró una pureza de >98 %. MALDI-TOF-MS, calculada para $C_{65}H_{97}N_9O_{16}$, 1259,71. Determinada: m/z 1282,16 $[M+Na]^+$.

Paso 4

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-alo-Ile-D-alo-Thr(Val-Alloc)-D-alo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina

Se eliminó el grupo Fmoc y se añadieron de forma secuencial Fmoc-D-Val-OH (678 mg, 2 mmol, 4 equivalentes), Fmoc-Thr(tBu)-OH (992 mg, 2,5 mmol, 4 equivalentes), Fmoc-D-Val-OH (678 mg, 2,0 mmol, 4 equivalentes), y (4S)-MeHex-OH (195 mg, 1,5 mmol, 3 equivalentes) a la peptidil-resina anterior (Paso 3) usando DIPCDI (233 µL, para 1,5 mmol y 3 equivalentes; 310 µL, para 2,0 mmol y 4 equivalentes; y 388 µL, para 2,5 mmol y 5 equivalentes) y HOBt (230 mg, para 1,5 mmol y 3 equivalentes; 307 mg, para 2 mmol y 4 equivalentes; y 395 mg, para 2,5 mmol y 5 equivalentes) durante 90 minutos. En todos los casos, después de 90 minutos de acoplamiento, la prueba de la ninhidrina fue negativa. La eliminación del grupo Fmoc y los lavados se llevaron a cabo como se describe en los Procedimientos Generales.

Paso 5

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-alo-Ile-D-alo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-Alloc)-D-alo-Ile-D-Val-O-TrtCl-resina.

El grupo Alloc se eliminó con $Pd(PPh_3)_4$ (58 mg, 0,05 mmol, 0,1 equivalentes) en presencia de $PhSiH_3$ (617 µL, 5 mmol, 10 equivalentes) en una atmósfera de Ar y se disolvieron Alloc-Phe-Z-Dhb-OH (666 mg, 2 mmol, 4 equivalentes) y HOAt (273 mg, 2 mmol, 4 equivalentes) en DMF (1,25 mL) y se añadieron a la peptidil-resina, después se añadió DIPCDI (310 µL, 2 mmol, 4 equivalentes) y la mezcla se agitó durante 5 horas, donde la prueba de la ninhidrina fue negativa. Después de lavar con DMF y CH_2Cl_2, se trató una alícuota de la peptidil-resina con TFA-H_2O (1:99) durante 1 minuto y el producto se caracterizó mediante MALDI-TOF-MS, calculada para $C_{88}H_{146}N_{14}O_{21}$, 1735,08. Determinada: m/z 1758,67 $[M+Na]^+$, 1774,62 $[M+K]^+$.

Paso 6

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-alo-Ile-D-alo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-alo-Ile-D-Val-OH.

Después de lavar con DMF y CH_2Cl_2, el grupo Alloc se eliminó con $Pd(PPh_3)_4$ (58 mg, 0,05 mmol, 0,1 equivalentes) en presencia de $PhSiH_3$ (617 µL, 5 mmol, 10 equivalentes) en una atmósfera de Ar. El péptido protegido se cortó de la resina mediante TFA-CH_2Cl_2 (1:99) (5 x 30 segundos). Se recogió el filtrado en H_2O (4 mL) y el H_2O se eliminó parcialmente en un rotavapor. Se añadió luego ACN para disolver el sólido que apareció durante la eliminación del H_2O, y la solución se liofilizó, para dar 639 mg (387 µmol, rendimiento del 77 %) del compuesto del título con una pureza >95 % comprobado por HPLC (Condición R, columna C, t_R 10,5 min).

Paso 7

(4S)-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-alo-Ile-ciclo(D-alo-Thr-D-alo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val).

El péptido protegido (Paso 6) (639 mg, 387 µmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (390 mL, 1 mM), y se añadieron HOBt (237 mg, 1,55 mmol) disuelto en el mínimo volumen de DMF para disolver HOBt, DIPEA (203 µL, 1,16 mmol, 3 equivalentes) y DIPCDI (240 µL, 1,55 mmol, 4 equivalentes). La mezcla se dejó agitar durante 1 hora, después se comprobó el curso del paso de ciclación mediante HPLC. El solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida. El péptido cíclico protegido se disolvió en TFA-H_2O (19:1, 85 mL) y la mezcla se dejó agitar durante 1 hora. El solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida, y se añadió dioxano (30 mL) y el solvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida (el proceso se repitió tres veces), después se añadió H_2O (40 mL) y se liofilizó. El producto crudo se purificó mediante HPLC (Kromasil C8 5 µm, 205 x 50 mm), isocrático de acetonitrilo al 44 % (+ 0,05 % de TFA) en agua (+ 0,05 % de TFA), 55 mL/h, detección a 220 nm, para dar el producto del título (192 mg, 0,13 mmol, rendimiento del 26 %, 92,3 %). MALDI-TOF-MS, calculada para $C_{75}H_{124}N_{14}O_{16}$, 1476,93. Determinada: m/z 1500,12 $[M+Na]^+$, 1515,97 $[M+K]^+$. El espectro de ^{1}H-RMN (2,5 mM, 500 MHz, H_2O-D_2O (9:1) del compuesto se indica en la Tabla II).

Tabla II

RESIDUO	N-H	Hα	Hβ	OTROS
(Z)-Dhb	9,59(s)	-	6,63 (q, J=7,5 Hz)	1,19 (d, γ-CH_3)
D-alo-Ile 1	8,82 (d, J=9,0 Hz)	4,42	1,87	1,25, 1,09, 0,82 (γ-CH_2, γ-CH_3, δ-CH_3)
L-Phe	8,75 (d, J=5,5 Hz)	4,63	3,08 (m)	7,31 (2H, Ar, t), 7,25 (3H, Ar, d)
D-alo-Thr	8,67 (d, J=9,0 Hz)	4,64	5,05 (m)	1,21 (γ-CH_3)
D-Val 3	8,13 (d, J=7,5 Hz)	4,33	2,01	0,90 (2 γ-CH_3)
L-Orn	8,29 (d, J=7,5 Hz)	4,31	1,66 (2H)	1,88 (γ-CH_2), 2,96 (bs, δ-CH_2), 7,56 (ε-NH_3^+)
D-alo-Ile 2	7,92 (d)	4,18	1,80	1,25, 1,09, 0,81 (γ-CH_2, γ-CH_3, δ-CH_3)
D-Val 5	8,01 (d)	4,08	2,07	0,87 (2 γ-CH_3)

L-Thr	8,19 (d, J=7,5 Hz)	4,29	4,14 (m)	1,13 (γ-CH_3)
D-Val 2	7,89 (d, J=7,5 Hz)	4,32	2,11	0,78 (γ-CH_3)
L-Val 14	8,04 (d)	4,10	2,07	0,90 (2 γ-CH_3)
L-Val 1	7,19 (d, J=9,0 Hz)	4,02	1,52	0,75 (γ-CH_3), 0,65 (d, γ-CH_3)
D-Pro	-	4,36	2,23, 1,99 (m, β-CH_2), 1,85 (m, γ-CH_2), 3,83 (1H, m, δ-CH_2), 3,64 (1H, m δ-CH_2)	
4(S)-MeHex	-	2,26 (2H)	1,57 (β-CH_2), 1,26, 1,10, 1,33, 0.79 (δ-CH_2, δ-CH_3, γ-CH, ε-CH_3)	

Ejemplo 2

Se sintetizó el análogo descrito en la Tabla III siguiendo procedimientos experimentales descritos en el ejemplo 1, excepto el paso indicado en la columna (Paso), donde el(los) residuo(s) (A) se cambiaron por otro(s) (B) o se eliminaron (ninguno).

Tabla III

Análogo	Compuesto Nº	Paso	Residuo cambiado (A)	Residuo incorporado (B)
[Orn^{11}]-KF	49	4	Fmoc-Val-OH 11	Fmoc-Orn-OH
			(4S)-MeHex 14	5-MeHex

Caracterización de los análogos de Kahalalido F

La caracterización se muestra en las tablas VI y VII. EM en la Tabla VI corresponde a MALDI-TOF y la masa exacta se calculó mediante Chemwind 6.0, y EM en la tabla VII corresponde a APCI en modo positivo.

Tabla VI

Análogo	Compuesto Nº	Cromatografía		t_R (min)	Masa exacta	Determinada
		Cond.	Columna			
[(4S)-MeHex^{14}]-KF	Compuesto de referencia 1	N	C	10,22	1.476,93	1.500,1/1.516,0
[Orn^{11}]-KF	49	Y	E	35,70	1.491,94	1.493,4/1.515,1/7 47,5

Ejemplo 17

Actividad biológica

La bioactividad de los compuestos de la presente invención se demuestra mediante los resultados en las tablas siguientes obtenidos según la metodología descrita como sigue:

La finalidad de este ensayo es detener el crecimiento de un cultivo de células tumorales "*in vitro*" por medio de una exhibición continua de las células a la muestra que se va a ensayar.

Líneas celulares

NOMBRE	ATCC Nº	ESPECIE	TEJIDO	CARACTERÍSTICAS
A-549	CCL-185	humana	pulmón	carcinoma de pulmón "NSCL"
SK-MEL-28	HTB-72	humana	melanoma	melanoma maligno
HT-29	HTB-38	humana	colon	adenocarcinoma de colon
LoVo	CCL-229	humana	colon	adenocarcinoma de colon
LoVo-Dox		humana	colon	adenocarcinoma de colon (MDR)
DU-145	HTB-81	humana	próstata	carcinoma de próstata, sin receptores de andrógenos
LNCaP	CRL-1740	humana	próstata	adenocarcinoma de próstata, con receptores de andrógenos
SK-BR-3	HTB-30	humana	mama	adenocarcinoma de mama, Her2/neu+ (efusión pleural)
IGROV-1		humana	ovario	adenocarcinoma de ovario
IGROV-ET		humana	ovario	adenocarcinoma de ovario caracterizado como células resistentes a ET-743
SK-OV-3	HTB-77	humana	ovario	adenocarcinoma de ovario (ascitis malignos)

HeLa	CCL-2	humana	cérvix	carcinoma epitelioide de cérvix
HeLa-APL	CCL-3	humana	cérvix	carcinoma epitelioide de cérvix, caracterizado como células resistentes a aplidina
K-562	CCL-243	humana	médula ósea	leucemia mielógena crónica
PANC-1	CCL-1469	humana	páncreas	carcinoma epitelioide del páncreas
HMEC-1		humana	endotelio	

Se ha adaptado un ensayo de tipo colorimétrico, usando la reacción de sulforodamina B (SRB) para una medida cuantitativa del crecimiento y viabilidad celulares [siguiendo la técnica descrita por Philip Skehan, et al. (1990), New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107- 1112].

Esta forma del ensayo emplea microplacas de cultivo celular de 96 pocillos de 9 mm de diámetro (Faircloth, 1988; Mosmann, 1983). La mayoría de las líneas celulares se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) derivadas de diferentes tipos de cánceres humanos.

Las células se mantienen en RPMI 1640 con SBF al 10 %, suplementado con penicilina 0,1 g/l y sulfato de estreptomicina 0,1 g/l y después se incuban a 37 ºC, CO_2 al 5 % y humedad del 98 %. Para los experimentos, las células se recogieron de cultivos subconfluentes usando tripsina y se resuspendieron en medio fresco antes de sembrar.

Las células se siembran en placas de microtitulación de 96 pocillos, a 5 x 103 células por pocillo en alícuotas de medio de 195 µL, y se deja que se adhieran a la superficie de la placa haciéndolas crecer en medio sin drogas durante 18 horas. Después, se añaden muestras en alícuotas de 5 µL que varían de 10 a 10-8 µg/mL, disueltas en DMSO:EtOH:PBS (0,5:0,5:99). Tras 48 horas de exposición, se mide el efecto antitumoral mediante la metodología SRB: las células se fijan añadiendo 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50 % (peso/volumen) e incubando durante 60 minutos a 4 ºC. Las placas se lavan con agua desionizada y se secan. Se añaden cien µL de solución SRB (al 0,4 % peso/volumen en ácido acético al 1 %) a cada pocillo de microtitulación y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se elimina la SRB no unida lavando con ácido acético al 1 %. Las placas se secan al aire y el colorante unido se solubiliza con tampón Tris. Se leen las densidades ópticas en un lector de placas espectrofotométrico automatizado a una única longitud de onda de 490 nm.

Se calculan los valores para la media +/- DE de datos a partir de pocillos por triplicado. Se pueden calcular algunos parámetros para respuesta celular: GI = inhibición de crecimiento, TGI = inhibición total de crecimiento (efecto citostático) y LC = muerte celular (efecto citotóxico).

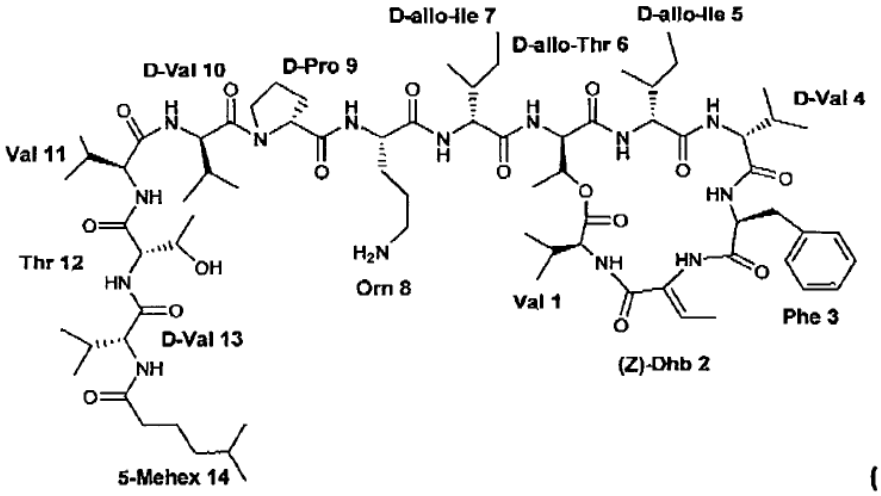
Las tablas VIII y IX ilustran los datos sobre la actividad biológica de los compuestos de la presente invención. El compuesto 1 se refiere al Compuesto de Referencia 1.

Tabla VIII: Datos de actividad (Molar)

		DU-145	**LN-caP**	**SKO V-3**	**IGROV**	**IGROV-ET**	**SK-BR-3**	**MEL-28**	**H-M EC-1**
1	GI50	3,27E-07	9,00E-07	-	1,58E-07	1,35E-07	4,34E-08	3,15E-07	-
	TGI	8,80E-07	2,14E-06	-	3,19E-07	2,89E-07	9,27E-08	4,10E-07	-
	LC50	2,54E-06	5,08E-06	-	6,41E-07	6,19E-07	4,69E-07	2,10E-06	-
		DU-145	**LN-caP**		**IGROV**	**IGROV-ET**	**SK-BR-3**	**MEL-28**	
49	GI50	1,09E-06	2,20E-06		1,27E-06	1,91E-06	1,94E-06		1,33E-06
	TGI	2,50E-06	6,70E-06		2,75E-06	5,15E-06	5,57E-06		2,50E-06
	LC50	5,75E-06	6,70E-06		5,97E-06	6,70E-06	6,70E-06		4,69E-06
		A-549	**K-562**	**PANC-1**	**HT-29**	**LOVO**	**LOVO-DOX**	**HELA**	**HELA-APL**
49	GI50	2,61E-06	1,50E-07	1,31E-06	1,58E-06	1,47E-06	3,22E-06	1,10E-06	1,07E-06
	TGI	6,70E-06	1,67E-06	3,09E-06	3,74E-06	3,80E-06	6,70E-06	2,20E-06	2,82E-06
	LC50	6,70E-06	6,70E-06	6,70E-06	6,70E-06	6,70E-06	6,70E-06	4,40E-06	5,95E-06

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto basado en la estructura de kahalalido F de fórmula 1, denominado KF



(1)

que es [Orn[11]]-KF, en el que el aminoácido indicado entre corchetes es la modificación introducida en la estructura de kahalalido F;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un soporte, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

3. Un compuesto o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso como medicamento.

4. Un compuesto o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento del cáncer.