

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 393**

51 Int. Cl.:

**C07D 493/04** (2006.01)

**A61K 31/34** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2002 E 10010826 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2327705**

54 Título: **Las podofilotoxinas como agentes antiproliferativos**

30 Prioridad:

**03.12.2001 DE 10160515**

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

**10.09.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM CHARITÉ DER  
HUMBOLDT- UNIVERSITÄT ZU BERLIN (100.0%)  
Technologietransferstelle  
10098 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**GAEDICKE, GERHARD;  
LODE, HOLGER N. PROF. DR. MED. y  
WRASIDLO, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 545 393 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

Las podofilotoxinas como agentes antiproliferativos

Los lignanos como la podofilotoxina y sus metabolitos y precursores forman parte de la vía de los fenilpropanoides y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Algunos de ellos, en particular la podofilotoxina, son conocidos por sus propiedades anticancerosas, antifúngicas y antimicrobianas. La podofilotoxina se extrajo por primera vez en forma de resina del podófilo o «manzana de mayo» (*Podophyllum peltatum*) y de especies del género *Linum* como *Linum album*, *Linum flavum* y *Linum nodiflorum*, siendo utilizada por médicos de algunas zonas del sur de EE. UU. A finales del siglo XIX como tratamiento contra las verrugas genitales, vinculadas con ciertos tipos de cáncer por su etiología ligada al virus del papiloma humano (HPV). La podofilotoxina ha acaparado especial interés como molécula originaria de fármacos quimioterapéuticos como el etopósido, el tenipósido y el etopofós, todos ellos inhibidores de la topoisomerasa II. En la actualidad, la demanda de podofilotoxina excede con mucho las existencias mundiales, que resultan insuficientes debido al lento crecimiento de las plantas silvestres y a su sobreexplotación. A fin de compensar las escasas existencias de podofilotoxina se han intentado cultivar células de *Podophyllum peltatum* y de *Linum album* con un éxito relativo. Los derivados semisintéticos etopósido y tenipósido son importantes fármacos antitumorales que si bien gozan de amplio uso adolecen de varias limitaciones, como son la escasa hidrosolubilidad, la inactivación metabólica y el desarrollo de resistencia farmacológica. Para superar tales limitaciones numerosos laboratorios han sintetizado derivados de la podofilotoxina (Yin et al., *acta pharm. Sinica* 1993, 28,758-761, Wang et al., *acta chem. Sinica* 1992, 50, 698-701, Chang et al., *J. med. chem.* 1994, 37446-442, Pelter et al., *J. nat. prod.* 1994, 57, 1598-1602). Sin embargo, ninguno ha demostrado mejorar sustancialmente la eficacia ni los efectos secundarios.

El etopósido es un fármaco antitumoral muy eficaz utilizado comúnmente contra una gran diversidad de tumores, entre ellos algunos pediátricos como los linfomas linfáticos agudos, el rhabdomyosarcoma y el neuroblastoma, así como en los tipos de cáncer de adulto más frecuentes. Asimismo, se emplea en los regímenes de acondicionamiento que preceden al trasplante de médula ósea. Con todo, el uso terapéutico del etopósido se ve limitado por su toxicidad, básicamente consistente en mielodepresión.

Uno de los mayores obstáculos para lograr una quimioterapia eficaz en el cáncer en general y en la leucemia de alto riesgo en particular radica en vencer la multiresistencia farmacológica. La mayoría de pacientes responde inicialmente al tratamiento con combinaciones de varios quimioterápicos. Pero la poliquimioterapia puede promover la aparición de clones de células multiresistentes (MDR) que siguen proliferando en presencia de agentes citotóxicos (Dalton WS. *Mechanism of drug resistance in hematologic malignancies Semin Hematol.* 1997;34:3-8). La reducción de la quimiosensibilidad en esos clones celulares exigiría la administración de citostáticos en cantidades que exceden la dosis máxima tolerada *in vivo*. Uno de los mecanismos de resistencia mejor conocidos de la leucemia y del carcinoma es la expulsión del fármaco mediada por la glucoproteína-p, que es el producto del gen de multiresistencia farmacológica 1 (MDR-1, *Multidrug resistance-1*), lo cual ha demostrado estar asociado con un desenlace negativo (Hunault M, Zhou D, Delmer A, et al. *Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognosis significance for in vivo drug resistance to induction treatment. Ann Hematol.* 1997;74:65-71; Marie JP, Zhou DC, Gurbuxani S, Legrand O, Zittoun R. *MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. Eur J Cancer.* 1996;32A:1034-1038.)

Desde la introducción de la poliquimioterapia se han concebido diversas estrategias para evitar o burlar la resistencia farmacológica. Las estrategias para vencer la resistencia en los pacientes giran en torno a: (I) La posología, esto es, el tratamiento prolongado con dosis bajas como en el caso de los antifolatos en la leucemia recidivante o la administración de dosis altas a corto plazo, p. ej. antifolatos con posterior rescate con folato en el osteosarcoma; (II) El tratamiento de combinación con sensibilizantes químicos como los inhibidores del MDR-1 en el caso de resistencia mediada por dicho gen; y (III) La combinación de quimioterapia con sensibilizantes no químicos como por ejemplo radioterapia, hipertermia u oxígeno hiperbárico (Dalton WS. *Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies. Semin Hematol.* 1997;34:3-8; Joel SP, Slevin ML. *Schedule-dependent topoisomerase II-inhibiting drugs. Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;34 Suppl:S84-S88; Ishikawa T, Kuo MT, Furuta K, Suzuki M. *The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design. Clin Chem Lab Med.* 2000;38:893-897.)

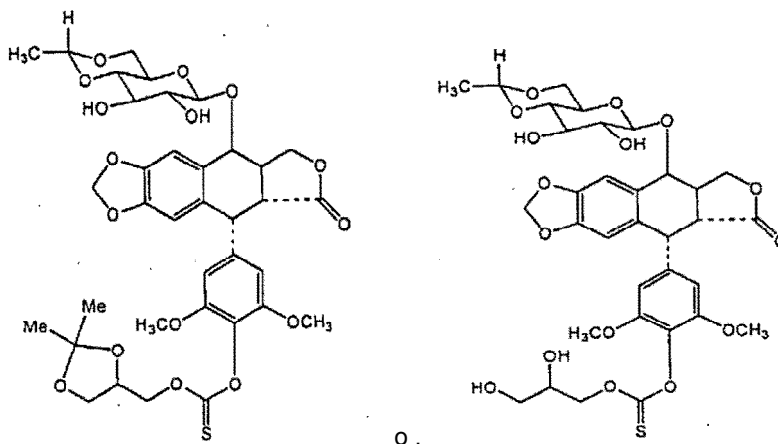
Son contadas las tentativas de modificar directamente el agente citostático con el fin de hallar análogos que burlen activamente los mecanismos de resistencia farmacológica, como un análogo desaminado de la doxorubicina (Solary E, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W, Pommier Y. *Hydroxyrubicin, a deaminated derivative of doxorubicin, inhibits mammalian DNA topoisomerase II and partially circumvents multidrug resistance. Int J Cancer.* 1994;58:85-94.), y derivados beta-amino del etopósido (Zhang YL, Guo X, Cheng YC, Lee KH. *Antitumor agents. 148. Synthesis and biological evaluation of novel 4 beta-amino derivatives of etoposide with better pharmacological profiles. J Med Chem.* 1994;37:446-452; Zhang YL, Shen YC, Wang ZQ, et al. *Antitumor agents, 130. Novel 4 beta-arylamino derivatives of 3',4'- didemethoxy-3',4'-dioxo-4-deoxypodophyllotoxin as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. J Nat Prod.* 1992;55:1100-1111.). Así pues, posibles soluciones contra los fracasos vinculados al MDR son el diseño racional de fármacos que no resulten afectados por los mecanismos del MDR y que estén dotados de una toxicidad sistémica reducida a la par que una potencia antitumoral incrementada.

- La resistencia contra el etopósido tiene lugar en distintos niveles celulares, pues implica la regulación a la baja de la enzima diana, la topoisomerasa II, la regulación a la baja de los mecanismos proapoptóticos o la regulación al alza de los mecanismos antiapoptóticos como la bcl-2, así como el aumento del metabolismo y/o de la expulsión del fármaco de la célula a través de sistemas de transporte. La activación de tales sistemas de transporte acaba generando con frecuencia resistencia cruzada contra otros citostáticos, tal y como se ha observado en la multirresistencia farmacológica mediada por MDR-1, MRP o LRP (Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 1993;53:747-754; Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1295-1302; Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1461:347-357.) Un importante mecanismo de resistencia farmacológica, confirmado en neoplasias hematológicas, consiste en la sobreexpresión del producto del gen *MDR-1*, la glucoproteína-p. Así pues, los intentos por vencer la resistencia farmacológica mediada por sistemas de transporte básicamente se han centrado hasta el momento en la modulación de la expresión del *MDR-1* (Liu C, Qureshi IA, Ding X, et al. Modulation of multidrug resistance gene (*mdr-1*) with antisense oligodeoxynucleotides. *ClinSci (Colch).* 1996;91:93-98.) o en la administración conjunta de inhibidores de *MDR-1* como la ciclosporina (Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, et al. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. *Lancet.* 1992;340:255-259.), el verapamilo (Joly P, Lallemand A, Oum'Hamed Z, Trentesaux C, Idoine O, Desplaces A. Effects of verapamil and S9788 on *MDR-1* mRNA expression studied by in situ hybridization. *Anticancer Res.* 1996;16:3609-3614.) o el valsopodar (Tai HL. Technology evaluation: Valsopodar, Novartis AG. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2:459-467.), todos los cuales han demostrado una eficacia limitada en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Estas proteínas de transporte de membrana expulsan una gama sorprendentemente amplia de sustratos dotados de estructuras completamente distintas, posiblemente debido al hecho de que los metabolitos abundantes como el glucurónido, el glutatión o el sulfato son reconocidos específicamente en lugar de los diversos fármacos (Zhu BT. A novel hypothesis for the mechanism of action of P-glycoprotein as a multidrug transporter. *Mol Carcinog.* 1999;25:1-13.). Por consiguiente, tales mecanismos de resistencia se asemejan al sistema de la ubiquitina, en que una plétora de proteínas completamente distintas son «marcadas» por las ubiquitinas y, de ese modo, son reconocidas y degradadas por los proteosomas. Las modificaciones del fármaco que interfieran con el «marcaje» molecular permitirán obtener nuevas moléculas que no podrán ser eliminadas por las células tumorales resistentes a múltiples fármacos.
- Se han intentado sintetizar derivados del etopósido que mejoren la especificidad de las dianas en los tejidos destinatarios. EP0423747 describe la síntesis de profármacos glucosil-etopósido que por la acción de conjugados enzimáticos específicos del tumor pueden ser descompuestos en la fracción farmacológicamente activa, el etopósido, y en el residuo glucosílico, es decir, que gracias a los conjugados enzimáticos propios del tumor, el fármaco solo se activa en el sitio de acción preferido (véase también US4975278). Shabatet et al. (PNAS, vol. 98, 13, 7528-7533) describen la síntesis de un sistema de anticuerpo-profármaco basado en el etopósido en que el grupo OH 4'-fenólico queda enmascarado por un compuesto de carbamato aldólico. Sin embargo, dicho profármaco solo no mostraba ninguna actividad antitumoral, a no ser que se combinara con un anticuerpo catalítico 38C2, que activa el profármaco para dar etopósido. Los profármacos descritos por Shabat et al. solo son activados por reacciones retro-Michael/retro-aldólicas que no se dan en la naturaleza. Solo enzimas artificiales como el anticuerpo catalítico 38C2 pueden catalizar la conversión. La manipulación y el uso de un profármaco así resultan aún más difíciles porque además es necesario aplicar simultáneamente el anticuerpo catalítico para que catalice la conversión en el fármaco activo. Por lo tanto, ninguno de los susodichos profármacos derivados han resultado particularmente útiles para el tratamiento de los susodichos cánceres.
- Se han sintetizado profármacos de diversos agentes antitumorales con el propósito de mejorar su biodisponibilidad, farmacocinética e hidrosolubilidad. WO99/30561 describe un profármaco basado en nucleótidos en el que la liberación y la activación del componente farmacológico tiene lugar por la hidrólisis del enlace éster que une el componente nucleotídico con el componente farmacológico.
- La patente US 4.975.278 describe un método para la liberación de fármacos citotóxicos en células tumorales consistente en la administración de un conjugado de anticuerpo-enzima específico de tumor que se une a las células tumorales, con la administración adicional de un profármaco que en presencia de la enzima unida al anticuerpo se convierte en un fármaco citotóxico activo en el área del tumor. Este concepto ha sido usado con etopósido-4'-fosfato o con 7-(2'-aminoetilfosfato)-mitomicina. Pero de nuevo, la utilidad ha sido escasa hasta el momento.
- W094/13324 describe la conversión de fármacos en profármacos al convertir sus correspondientes grupos funcionales en derivados 1-O-alkil-, 1-O-acil-, 1-S-acil- y 1-S-alkil-sn-glicero-3-fosfato. Ninguno de los profármacos dados a conocer en el documento W094/13324 ha resultado particularmente eficaz en el tratamiento del cáncer.
- W098/13059 presenta profármacos que comprenden un péptido protegido por el extremo amino-terminal que actúa como sustrato para una peptidohidrolasa situada en la superficie de una célula metastásica. Los fármacos anticancerosos usados habitualmente con ese fin son: doxorubicina, taxol, camptotecina, mitomicina C o esperamicina. La peptidohidrolasa que hidroliza el sustrato del profármaco normalmente es la catepsina B.
- La patente de EE. UU. N.º 5.977.065 describe profármacos de actinomicina D, doxorubicina, mitomicina C o mostaza de nitrógeno derivados de la reacción con 4-nitrobenzilcloroformiato.

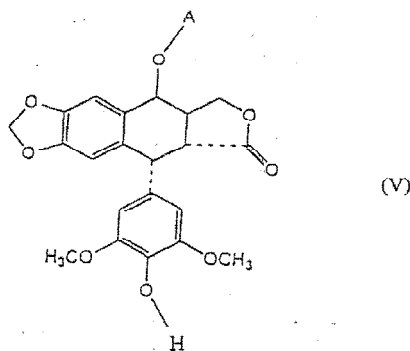
La solicitud de patente europea EP 0320988 de Bristol-Myers Company da a conocer 4'-ésteres, 4'-carbonatos y 4'-carbamatos de glucósidos de 4'-dimetilepipodofilotoxina sobre los cuales describe cierta actividad antitumoral en animales. Los compuestos dados a conocer en EP 0320988 son incapaces de vencer la multirresistencia farmacológica.

5 Nicolaou (Nature 1993, 364, 464) y Niethammer et al. (Bioconj. Chem. 2001, 3, 414) describen un profármaco de paclitaxel bloqueado en el grupo hidroxilo del C7 con una cadena lateral de dihidroxipropilo que puede ser escindida por hidrólisis mediante un mecanismo de liberación lenta dependiente del pH. El profármaco resultante mostró ciertas ventajas en relación con el fármaco original por ser más hidrosoluble y tener una dosis máxima tolerada (DMT) tres veces mayor. El paclitaxel es un agente antitumoral especialmente utilizado en los tumores de mama, pulmón y ovario. Promueve la polimerización irreversible de la tubulina, lo cual interrumpe la división de la célula al detener el ciclo celular en la fase premitótica G2. Un segundo mecanismo citotóxico del paclitaxel consiste en fomentar la activación del TNF-alfa, fenómeno ajeno a la polimerización de los microtúbulos. Los profármacos de paclitaxel descritos en las publicaciones citadas son inestables en solución acuosa y se hidrolizan espontáneamente. Por consiguiente, la utilidad de los profármacos descritos por Niethammer et al. es muy escasa. Hasta ahora no se han descrito profármacos del etopósido cuya eficacia sea notablemente mejor y sus efectos secundarios mucho más reducidos que los de la molécula originaria. En consecuencia, uno de los objetivos de la presente invención ha sido proporcionar un profármaco de podofilotoxinas que reduzca sustancialmente las reacciones adversas en el paciente. Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar profármacos de podofilotoxinas que sean estables en soluciones acuosas, y que pese a ello no requieran la aplicación de anticuerpos catalíticos para la conversión en el fármaco activo. Otro objetivo más de la invención es proporcionar profármacos de podofilotoxinas que hagan posible la liberación lenta del fármaco en la zona de acción pretendida, es decir, en un tumor. Otro objetivo de la presente invención consiste en ofrecer profármacos de podofilotoxinas que sean capaces de vencer la multirresistencia farmacológica que suele encontrar la molécula originaria del fármaco. Además, otro objetivo ha sido proporcionar un método para la preparación de tales profármacos y una composición farmacéutica con ellos, así como proporcionar posibles usos para dichos profármacos y dicha composición farmacéutica.

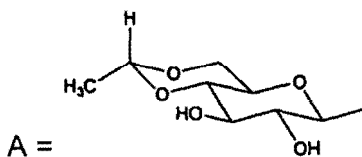
Este objetivo se logra mediante la invención, tal y como aparece definida en las reivindicaciones adjuntas. En particular la invención concierne a las podofilotoxinas:



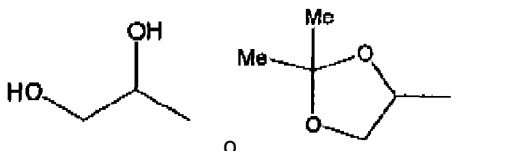
30 Los objetivos de la presente invención también se logran mediante un método para la preparación de una podofilotoxina, caracterizado porque: a) un compuesto como el representado por la fórmula V



en qué A es



, se hace reaccionar con un haloformiato  $W-(C=X)-(Y)-(CH_2)_n-Z$ , en el que  $X=S$ ,  $Y=O$ ,  $n = 1$  y  $Z$  es



, y  $W$  es Cl, F, Br o I,

5 o

b) caracterizado porque un compuesto como el representado por la fórmula V se hace reaccionar con fosgeno o triclorometilcloroformiato, para dar el producto intermedio 4'-fenol cloroformiato, haciéndose reaccionar este producto intermedio con un alcohol o tiol de la fórmula ZYH, para dar el tiocarbonato correspondiente,  $Y=S$ , y siendo  $Z$  como se define en a).

10 Preferentemente el compuesto que se representa con la fórmula V se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo consistente en solcetalcloroformiato y PEG-cloroformiato.

En una forma de realización del método acorde con la presente invención, el producto resultante del método descrito anteriormente se hidroliza.

15 Los objetivos de la presente invención también se alcanzan mediante una composición farmacéutica que comprende una podofilotoxina acorde con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los objetivos de la presente invención también se alcanzan mediante el uso de una podofilotoxina acorde con la presente invención o de una composición farmacéutica acorde con la presente invención destinadas a la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares, en donde, preferiblemente, el trastorno proliferativo celular afecta a un niño, un adolescente o un adulto.

20 Con el fin de crear profármacos hidrolíticamente activados del etopósido VP-16 como moléculas precursoras inactivas que se activaran mediante hidrólisis, se sintetizaron derivados del grupo hidroxifenólico en 4'. Estudios precedentes han podido demostrar que este grupo hidroxifenólico en 4' es sumamente importante para la actividad citotóxica del etopósido, puesto que un enlace estable condensado con ese grupo OH reducía la citotoxicidad más de tres órdenes de magnitud ( $> 3 \log$ ) (Shabat D, Lode HN, Perlt U, et al. In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:7528-7533.). Sin embargo, los profármacos descritos por Shabat eran ineficaces para conferir citotoxicidad y no mostraban ninguna actividad antitumoral a no ser que se combinaran con el anticuerpo catalítico 38C2 que los activaba para dar el fármaco activo. Los profármacos descritos por Shabat et al. solo son activados por reacciones retro-Michael-retro-aldólicas que no se dan en la naturaleza, por lo que es preciso añadir un anticuerpo catalítico o enzimas específicamente adaptadas que sean capaces de catalizar la conversión. En cambio, los profármacos de la presente invención son activados por una sencilla reacción de hidrólisis, pese a lo cual permanecen estables en una amplia gama de valores de pH presentes en condiciones fisiológicas normales.

35 A diferencia del paclitaxel, las podofilotoxinas y en especial el etopósido, son inhibidores de la topoisomerasa II, con una amplia gama de aplicaciones en neoplasias malignas humanas, tanto tumores sólidos como leucemias, que difieren del campo de aplicaciones del paclitaxel. Por ejemplo, el etopósido se emplea como tratamiento contra la leucemia linfática aguda, la leucemia mieloide aguda, el neuroblastoma y el rabdomiosarcoma. A diferencia de los profármacos de paclitaxel presentados en las publicaciones mencionadas anteriormente (en particular Niethammer et al.), los profármacos de la presente invención son mucho más estables en soluciones acuosas bajo condiciones fisiológicas, pese a lo cual pueden ser hidrolizados fácilmente por cambios de pH apropiados. Sin pretender limitarse a la teoría, actualmente se cree que una razón para esa estabilidad inesperada es la naturaleza hidrófoba de la parte «sur» de la molécula (el anillo fenólico), combinada con la «cavidad» hidrófoba que forman en la posición 4' los dos grupos metoxi vecinos emplazados en las posiciones 3' y 5'.

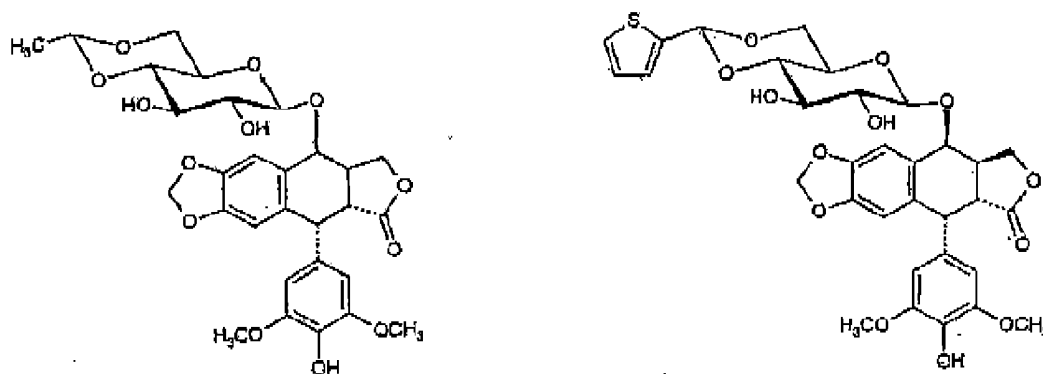
45 Así pues, el diseño racional de profármacos del VP-16 activados por hidrólisis entraña la modificación del grupo hidroxifenólico en 4' químicamente reactivo para adaptarlo específicamente a un efecto deseado. Según la naturaleza de la modificación química, es posible hacer que la activación del profármaco ocurra a una velocidad dependiente del pH conveniente. Los profármacos de la presente invención permanecen estables en un amplio

intervalo de valores de pH, pero aun así pueden ser activados por un cambio adecuado del pH, así como en condiciones fisiológicas con la presencia de enzimas naturales, como por ejemplo las carboxilesterasas. Esto se mostrará pormenorizadamente más adelante.

5 Así pues, sorprendentemente el diseño racional permitió descubrir que era posible producir profármacos del etopósido activados por hidrólisis que conservan la plena actividad antitumoral contra células tumorales multirresistentes en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «proteínas y péptidos dotados de la función de búsqueda de receptores asociados con células tumorales» designa cualquier proteína o péptido que es capaz de unirse a un receptor que está asociado con células tumorales.

10 «Porciones dirigidas a receptores de mamífero» son grupos capaces de unirse a receptores de mamífero. «Proteínas, péptidos y miméticos no peptídicos que inhiben receptores de factores de crecimiento» designa cualquier proteína, péptido o compuesto de molécula pequeña no peptídico que es capaz de inhibir un receptor de factor de crecimiento mediante cualquier mecanismo, en particular al unirse al mismo. «Etopósido y tenipósido» designa compuestos con la fórmula



15 y cualquier forma protonada de los mismos. El término «funcionalidad» designa cualquier porción o grupo químico que permite que la molécula a la que está ligado sufra una reacción química.

Ahora se hace referencia a las figuras, en las cuales

20 La figura 1 presenta un esquema de la síntesis de ProVP-16I y II,  
 La figura 2 muestra la conversión del ProVP16I en ProVP-16II y en VP-16,  
 La figura 2 muestra los perfiles de citotoxicidad de ProVP-16I y II en comparación con el del VP-16,  
 La figura 4 presenta el efecto de Pro VP-16I y II en células MOVP-3 multirresistentes a fármacos,  
 La Figura 5 muestra la inducción de la apoptosis por ProVP-16I y II en células resistentes, y  
 La Figura 6 presenta la toxicidad y la respuesta antitumoral en ratones tratados con ProVP-16II.

25 Con más detalle, las figuras son como sigue:

30 La figura 1 presenta un esquema de la síntesis y de la activación de ProVP-16 I y II, La síntesis de ProVP-16 I implica la reacción de solcetalcloroformiato con VP-16, tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. El compuesto ProVP-16 II es sintetizado a partir del ProVP-16 I mediante hidrólisis ácida con la eliminación de 2,2-dihidroxipropano. La activación de ProVP-16 II en VP-16 tiene lugar con la eliminación de glicerol y dióxido de carbono.

35 La Figura 2 muestra la conversión de ProVP16 I en ProVP-16 II y VP-16. El ProVP-16 I se incubó en THF/HCl al 2% y periódicamente se analizaron muestras con HPLC en los momentos indicados (A). La activación hidrolítica del ProVP-16 II se determinó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en los niveles de pH indicados (B). El ProVP-16 I (3 mM) se incubó en soluciones de PBS y periódicamente se analizaron muestras con HPLC. El porcentaje de conversión se calculó a partir de las áreas bajo la curva calculadas con la integración de los picos.

40 La Figura 3 muestra los perfiles de citotoxicidad correspondientes a ProVP-16 I y II comparados con el de VP-16. El efecto citotóxico de ProVP-16 I y II se evaluó con un panel de estirpes celulares con determinaciones por triplicado de las concentraciones  $CI_{50}$  de ambos profármacos en cada estirpe celular (A). La citotoxicidad de los profármacos respecto a la de VP-16 se calculó del modo siguiente:  $CI_{50}$  de VP-16 dividida por la  $CI_{50}$  de ProVP-16 I o II. Las barras representan los valores medios  $\pm$  DE. Las diferencias entre ProVP-16 I o II y VP-16 resultaron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) en todas las estirpes celulares salvo la NXS2. Las estrellas indican las estirpes celulares con expresión amplificada del MDR-1.

La cinética de liberación lenta de la citotoxicidad por parte del ProVP-16 I activado hidrolíticamente se

determinó con células Molt-3 (B).  $10^4$  células por pocillo se incubaron en concentraciones crecientes de ProVP-16 I y de VP-16 ( $10^{-10}$  M a  $10^{-6}$  M) en placas de 96 pocillos. En los momentos indicados se determinó la viabilidad celular por triplicado con el ensayo con XTT, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de viabilidad se calculó a partir de las mediciones de la densidad óptica a 450 nm según la fórmula siguiente:  $DO_{450 \text{ muestra}} \div DO_{450 \text{ sin tratar}} \times 100\%$ . Los resultados se representaron gráficamente como función semilogarítmica de la concentración de fármaco.

La figura 4 expone el efecto de ProVP-16 I y II en células MOVP-3 multirresistentes a fármacos. La recién creada estirpe de células MOVP-3 resistentes al VP-16 fue analizada para determinar la expresión del gen MDR-1 (A), la resistencia contra la citotoxicidad generada por el VP-16 (B) y la resistencia cruzada contra fármacos que actúan contra el MDR-1 que son sustratos conocidos de la glucoproteína-p (C). La expresión génica del MDR-1 se determinó mediante el análisis por RT-PCR del ARN total aislado de las células MOVP-3 y Molt-3 (6A). La expresión de GAPDH se empleó como control para comprobar la integridad del ADNc. La resistencia de las células MOVP-3 contra el VP-16 se calculó a partir de las concentraciones  $CI_{50}$  según la fórmula  $CI_{50 \text{ MOVP-3}} \div CI_{50 \text{ Molt-3}}$  ( $n=3$ ), y los resultados se compararon con los efectos observados con ProVP-16 I y II (6B). Las diferencias halladas entre las células Molt-3 y MOVP-3 obtenidas con el VP-16 fueron estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ), a diferencia de lo sucedido con ProVP-16 I y II ( $p>0,05$ ). (6C) La resistencia cruzada de las células MOVP-3 contra los fármacos MDR-1 (doxorrubicina, melfalán, vinblastina y paclitaxel) se calculó a partir de los valores de  $CI_{50}$  ( $n=3$ ), tal y como se describe en (6B). Los resultados correspondientes a los fármacos no MDR-1 (MTX, 5-FU, genisteína, caliqueamicina  $\theta$ , ProVP-16 I) se muestran como controles. Todas las diferencias halladas correspondientes a los fármacos MDR-1 entre las células MOVP-3 y Molt-3 fueron estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ), a diferencia de lo observado con los fármacos no MDR-1 ( $p>0,05$ ).

La Figura 5 muestra la inducción de la apoptosis por parte de ProVP-16 I y II en células resistentes. El efecto de ProVP-16 I y II ( $5 \times 10^{-7}$  M) sobre el ciclo celular fue analizado en células Molt-3 (A) y MOVP-3 (B) y los resultados se compararon con los del VP-16 ( $5 \times 10^{-7}$  M). Las células se recolectaron en los momentos indicados ( $n=3$ ), se fijaron y tiñeron con yoduro de propidio para ser analizadas por FACS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. A partir de los histogramas de ADN se calcularon los porcentajes de células en preG1 (células en apoptosis).

La Figura 6 presenta la toxicidad y la respuesta antitumoral en ratones tratados con ProVP-16 II. A ratones A/J ( $n=6$ ) se les inyectó ProVP-16 II (20 y 60 mg/kg) y VP-16 (20 mg/kg) por vía i.p. los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11, así como VP-16 (60 mg/kg) los días 1, 3 y 5 (A). El peso corporal de cada roedor se determinó a lo largo del tiempo y se calculó como porcentaje del peso total medido el día 0. Los episodios reflejados en las gráficas de Kaplan-Meier son todos aquellos definidos por una pérdida de peso corporal superior al 20%.

El efecto antitumoral del tratamiento con ProVP-16 II se determinó en un modelo de xenoinjerto multirresistente a fármacos (B,C). A ratones SCID ( $n=7$ ) se les inyectaron  $5 \times 10^5$  células MOVP-3 por vía s.c. y se establecieron tumores primarios de  $250 \text{ mm}^3$  de tamaño medio 55 días después de la inoculación. El tratamiento consistió en inyecciones i.p. de Pro VP-16 II (45 y 15 mg/kg), VP-16 (15 mg/kg) y disolvente los días 55, 57, 59, 69, 71, 87 y 90 después de la inoculación de las células tumorales. El crecimiento del tumor se controló con mediciones con microcalibre y el tamaño del tumor se calculó según lo descrito en Materiales y Métodos (B). Las diferencias halladas entre los grupos experimentales de animales tratados con ProVP-16 II (45 y 15 mg/kg) y los grupos de control (disolvente y VP-16) resultaron estadísticamente significativas ( $p<0,001$  después del día 63) (B). El peso corporal de los animales tratados se determinó a lo largo del tiempo como porcentaje del peso corporal en el día 57 (C).

Al término del experimento terapéutico, los tumores subcutáneos restantes fueron extirpados y analizados por RT-PCR para determinar la expresión génica de MDR-1 excepto en los ratones tratados con 45 mg/kg que no mostraron tumor residual. Las señales representativas de tumor halladas en cada grupo aparecen representadas y comparadas con las de las células VCR-100 que expresaban el MDR-1, que actuaron como control positivo. La presencia de señales de 229 o 127 pb indica la expresión de MDR-1.

Sorprendentemente, las podofilotoxinas de la presente invención han resultado ser especialmente eficaces en la mediación de la citotoxicidad. Se sintetizaron varios derivados del etopósido y se determinó con claridad su mecanismo de activación por hidrólisis (véanse los ejemplos a continuación). Un dato importante es que los profármacos permanecieron estables en condiciones fisiológicas de tamponamiento (pH). Ya se ha demostrado que un profármaco del etopósido dotado de un enlazante carbamato estable que bloquea el grupo 4' hidroxilo del VP-16 es completamente estable en condiciones fisiológicas de tamponamiento (Shabat D, Lode HN, Pertl U, et al. In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:7528-7533.). En contraste con los profármacos activados por hidrólisis de la presente invención, ejemplificados por ProVP-16 I y II, el profármaco con carbamato se diseñó para ser activado únicamente mediante catálisis de la reacción retroaldólica retro-Michael mediada por el anticuerpo catalítico 38C2, una reacción que no se da en la naturaleza. Cabe subrayar que a diferencia de los profármacos de la presente invención este profármaco con carbamato resultó ineficaz a la hora de generar citotoxicidad contra todas las estirpes de células tumorales investigadas, lo cual demuestra el papel crucial del grupo 4'-hidroxilo del VP-16 como centro biológicamente relevante capaz de inducir la citotoxicidad. El centro activo de los profármacos descritos

en la presente memoria también está bloqueado, pero los profármacos comprendidos por la presente invención dotados de su mecanismo de activación por hidrólisis propician la citotoxicidad con suma eficacia. La naturaleza atóxica de los ProVP-16 I y II no convertidos queda demostrada por el mecanismo de liberación lenta evidenciado en las células Molt-3 (Fig. 3) y por la ausencia de efectos citotóxicos de ambos profármacos hasta 12 h después de la incubación, en contraste con el VP-16. El incremento estable de la actividad citotóxica con el tiempo mostrado por ambos derivados del VP-16 demuestra claramente que los novedosos compuestos de la presente invención son en un principio estables y atóxicos y que después se activan en el seno de las células diana. El mecanismo de liberación lenta observado *in vitro* explica asimismo el drástico descenso de la toxicidad sistémica en ratones, tal y como demuestra el caso de ProVP-16 II, cuya dosis máxima tolerada resultó más de tres veces superior que la del compuesto originario (Fig. 6).

La caracterización en profundidad de los profármacos acordes con la presente invención reveló una potencia superior a la del VP-16 en algunas estirpes de células cancerosas. En células con expresión amplificada del gen MDR-1 (VCR 100, ADR 5000 y SW480) los profármacos acordes con la presente invención manifestaron una eficacia más de tres órdenes de magnitud mayor (3 log) (Fig. 4). Este es un incremento raramente alcanzado por los moduladores del MDR-1 (Dalton WS. Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 1997;34:3-8; Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, et al. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. *Lancet.* 1992;340:255-259; Joly P, Lallemand A, Oum'Hamed Z, Trentesaux C, Idoine O, Desplaces A. Effects of verapamil and S9788 on MDR-1 mRNA expression studied by *in situ* hybridization. *Anticancer Res.* 1996;16:3609-3614; Tai HL. Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2:459-467; Kang Y, Perry RR. Effect of alpha-interferon on P-glycoprotein expression and function and on verapamil modulation of doxorubicin resistance. *Cancer Res.* 1994;54:2952-2958; Hofmann J, Gekeler V, Ise W, et al. Mechanism of action of dexniguldipine-HCl (B8509-035), a new potent modulator of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:603-609.)

Por otra parte, ensayos funcionales demuestran que los profármacos acordes con la presente invención inhiben la salida de sustrato mediada por MDR1. Por consiguiente, parece que los nuevos profármacos inhiben la función de la glucoproteína-p del MDR-1, lo que explica la excelente actividad contra estirpes celulares cancerosas que expresan dicho gen. Es importante destacar que este drástico efecto *in vitro* también se traduce en una regresión duradera de los tumores primarios establecidos en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de leucemia de linfocitos T farmacorresistente (Fig. 6). En dicho modelo, la expresión del gen MDR-1 aparece amplificada de modo estable con una resistencia 100x contra el VP-16 *in vitro* (Fig. 4), lo que supone la completa ausencia de efecto terapéutico del VP-16 en la dosis máxima tolerada (Fig. 6). Resulta interesante que en ese modelo de estimulación que exhibe una resistencia farmacológica artificialmente alta, el tratamiento con los profármacos acordes con la presente invención pudiera inducir una intensa respuesta antitumoral (Fig. 6). Esto reviste especial relevancia puesto que esa elevada amplificación del MDR-1 raramente se observa en los pacientes sometidos a poliquimioterapia, incluso en aquellos con recidivas tumorales (Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. Expression of *mdr1*, *mrp*, topoisomerase II alpha/beta, and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol.* 1995;89:356-363; Beck JF, Bohnet B, Brugger D, et al. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 1998;18:701-705.)

Un hallazgo importante de este estudio es la eficaz respuesta antitumoral observada en modelos de multirresistencia farmacológica con los profármacos de la presente invención en condiciones *in vitro* e *in vivo*, lo cual apunta a que el tratamiento con ellos propiciará una mejora significativa respecto a la quimioterapia con las podofilotoxinas ordinarias.

Los ejemplos siguientes pretenden ser meramente ilustrativos, sin limitar el alcance de la presente invención.

Ya se ha demostrado que el VP-16 es completamente estable en condiciones fisiológicas de tamponamiento (Shabat D, Lode HN, Pertl U, et al. *In vivo* activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:7528-7533.). En contraste con los profármacos activados por hidrólisis de la presente invención, ejemplificados por ProVP-16 I y II, el profármaco con carbamato se diseñó para ser activado únicamente mediante catálisis de la reacción retroaldólica retro-Michael mediada por el anticuerpo catalítico 38C2, una reacción que no se da en la naturaleza. Cabe subrayar que a diferencia de los profármacos de la presente invención este profármaco con carbamato resultó ineficaz a la hora de generar citotoxicidad contra todas las estirpes de células tumorales investigadas, lo cual demuestra el papel crucial del grupo 4'-hidroxilo del VP-16 como centro biológicamente relevante capaz de inducir la citotoxicidad. El centro activo de los profármacos descritos en la presente memoria también está bloqueado, pero los profármacos comprendidos por la presente invención dotados de su mecanismo de activación por hidrólisis propician la citotoxicidad con suma eficacia. La naturaleza atóxica de los ProVP-16 I y II no convertidos queda demostrada por el mecanismo de liberación lenta evidenciado en las células Molt-3 (Fig. 3) y por la ausencia de efectos citotóxicos de ambos profármacos hasta 12 h después de la incubación, en contraste con el VP-16. El incremento estable de la actividad citotóxica con el tiempo mostrado por ambos derivados del VP-16 demuestra claramente que los novedosos compuestos de la presente invención son en un principio estables y atóxicos y que después se activan en el seno de las células diana. El mecanismo de liberación lenta observado *in vitro* explica asimismo el drástico descenso de la toxicidad sistémica en ratones, tal y como demuestra el caso de ProVP-16 II, cuya dosis máxima



tolerada resultó más de tres veces superior que la del compuesto originario (Fig. 6).

La caracterización en profundidad de los profármacos acordes con la presente invención reveló una potencia superior a la del VP-16 en algunas estirpes de células cancerosas. En células con expresión amplificada del gen MDR-1 (VCR 100, ADR 5000 y SW480) los profármacos acordes con la presente invención manifestaron una eficacia más de tres órdenes de magnitud mayor (3 log) (Fig. 4). Este es un incremento raramente alcanzado por los moduladores del MDR-1 (Dalton WS. Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 1997;34:3-8; Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, et al. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. *Lancet.* 1992;340:255-259; Joly P, Lallemand A, Oum'Hamed Z, Trentesaux C, Idoine O, Desplaces A. Effects of verapamil and S9788 on MDR-1 mRNA expression studied by *in situ* hybridization. *Anticancer Res.* 1996;16:3609-3614; Tai HL. Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2:459-467; Kang Y, Perry RR. Effect of alpha-interferon on P-glycoprotein expression and on verapamil modulation of doxorubicin resistance. *Cancer Res.* 1994;54:2952-2958; Hofmann J, Gekeler V, Ise W, et al. Mechanism of action of dexniguldipine-HCl (B8509-035), a new potent modulator of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 1995;49:603-609.).

Por otra parte, ensayos funcionales demuestran que los profármacos acordes con la presente invención inhiben la salida de sustrato mediada por MDR1. Por consiguiente, parece que los nuevos profármacos inhiben la función de la glucoproteína-p del MDR-1, lo que explica la excelente actividad contra estirpes celulares cancerosas que expresan dicho gen. Es importante destacar que este drástico efecto *in vitro* también se traduce en una regresión duradera de los tumores primarios establecidos en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de leucemia de linfocitos T farmacorresistente (Fig. 6). En dicho modelo, la expresión del gen MDR-1 aparece amplificada de modo estable con una resistencia 100x contra el VP-16 *in vitro* (Fig. 4), lo que supone la completa ausencia de efecto terapéutico del VP-16 en la dosis máxima tolerada (Fig. 6). Resulta interesante que en ese modelo de estimulación que exhibe una resistencia farmacológica artificialmente alta, el tratamiento con los profármacos acordes con la presente invención pudiera inducir una intensa respuesta antitumoral (Fig. 6). Esto reviste especial relevancia puesto que esa elevada amplificación del MDR-1 raramente se observa en los pacientes sometidos a poliquimioterapia, incluso en aquellos con recidivas tumorales (Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. Expression of *mdr1*, *mrp*, topoisomerase II alpha/beta, and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol.* 1995;89:356-363; Beck JF, Bohnet B, Brugger D, et al. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 1998;18:701-705.).

Un hallazgo importante de este estudio es la eficaz respuesta antitumoral observada en modelos de multiresistencia farmacológica con los profármacos de la presente invención en condiciones *in vitro* e *in vivo*, lo cual apunta a que el tratamiento con ellos propiciará una mejora significativa respecto a la quimioterapia con las podofilotoxinas ordinarias.

Los ejemplos siguientes pretenden ser meramente ilustrativos, sin limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo de referencia 1

**Materiales:** El hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio (XTT), el VP-16, el solcetal, los disolventes orgánicos y el metosulfato de fenazina (PMS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania). Los reactivos para el cultivo celular, las enzimas de restricción y otros reactivos de biología molecular eran de Life Technologies (Karlsruhe, Alemania).

**Células:** Las estirpes celulares tumorales se sembraron en RPMI, con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Nalm-6, Reh, 15 Molt-3, Jurkat, HL-60, K562, HeLa, CEM, A2780, SW480) o en DMEM, con SFB al 10% (NXS2, SK-N-SH, HT-29) en presencia de 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) y se multiplicaron en condiciones estándares de cultivo tisular (CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C). Todas las estirpes celulares se obtuvieron de ATCC, Rockville, MD, EE. UU. excepto la NXS2 que había sido descrita previamente (Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *Journal of the National Cancer Institute.* 1997;89:1586-1594.) y las VCR100, ADR5000 y A2780 que fueron amablemente facilitadas por James Beck, Greifswald, Alemania (Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. Expression of *mdr1*, *mrp*, topoisomerase II alpha/beta, and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol.* 1995;89:356-363; Beck JF, Bohnet B, Brugger D, et al. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 1998;18:701-705.). A partir de células Molt-3 se generó una subestirpe llamada MOV-3 resistente al etopósido mediante la exposición continua a cantidades crecientes de VP-16. Al cabo de seis meses, las células MOV-3 eran estables y se multiplicaban en presencia de VP-16 1 µM; se usaron para más experimentos *in vitro* e *in vivo*.

**Ratones:** Los ratones A/J hembra y los ratones C.B-17/lcrCrl-scid BR FOX CHASE™ de 8 semanas de edad se adquirieron de Charles River Laboratories, Sulzfeld, Alemania. Permanecieron estabulados en la colonia de ratones libres de patógenos de la institución en grupos de 8 individuos. Dispusieron de alimento a voluntad, en concreto pienso de laboratorio estándar para ratones. Los experimentos con animales se efectuaron de acuerdo con la guía alemana para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio, la «Tierschutzgesetz».

**Química analítica de los proetopósidos:** La síntesis de proetopósidos y el análisis por HPLC se han descrito previamente, Wrasidlo W, Schroeder U, Bernt K, et al. Synthesis, hydrolytic activation and cytotoxicity of etoposide prodrugs. Bioorg Med Chem Lett. 2002; 12: 557-560, que se incorpora como referencia en su totalidad.

5 **Aislamiento del ARN, transcripción inversa y amplificación por PCR:** El aislamiento del ARN total de la célula, la síntesis del ADNc y las condiciones de la RT-PCR habían sido descritas previamente (Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. Journal of the National Cancer Institute. 1997; 89: 1586-1594.). La amplificación del gen MDR-1 humano se llevó a cabo con el cebador directo 5' GGA GAG ATC CTC ACC AAG CG 3' y con el cebador reverso 5' GTT GCC AAC CAT AGA TGA AGG 3' durante 35 ciclos (15 s a 96°C, 30 s a 60°C, 90 s a 72°C), dando lugar a un  
10 fragmento de 229 pb denominado MDR-1. La detección de alta sensibilidad se logró mediante amplificación anidada de 1,0 µl de MDR-1 después de 21 ciclos con el cebador directo 5' GCT CAG ACA GGA TGT GAG TT 3' y el cebador reverso 5' CTG GGT AAT TAC AGC AAG CC 3' durante 30 ciclos para crear un fragmento de 127 pb. La integridad del ADNc se comprobó mediante la amplificación de la glicerol-aldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) con el cebador directo 5' CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG 3' y el cebador reverso 5' 50 GGC AGT GAT GGC  
15 ATG GAC TG 3' durante 25 ciclos, dando lugar a un fragmento de 358 pb. La especificidad de todos los fragmentos se verificó mediante secuenciación.

**Ensayo funcional con JC-1:** Para la tinción, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron con PBS que contenía JC-1 monomérico, según se había descrito previamente (Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Marie JP. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia. Blood. 2001;97:502-508.). En resumen,  $5 \times 10^5$  células/ml se incubaron con JC-1 monomérico 0,1 µM a 37°C durante 15 minutos y, posteriormente, se incubaron con y sin etopósido y Pro-VP-16 I y II. Como controles positivos algunas muestras se incubaron con ciclosporina A 2 µM (datos no mostrados). La fluorescencia de las células se registró con un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson) y en el análisis del colorante monomérico las señales del JC-1 se detectaron en el canal FL1 (filtro de 530 nm).  
20

25 **Transfección estable del MDR-1:** El ADNc del MDR-1 fue proporcionado amablemente en un plásmido pUC por C. Baum, de la Universidad de Hamburgo. Para la expresión en mamíferos, el ADNc del MDR-1 se clonó en el plásmido de expresión eucariota bicistrónico pIRESpuro con dianas de restricción para NotI y BamHI. El pMDR-IRESpuro se transfectó en células Molt-3 mediante electroporación (960 µF, 250 V). Las células transfectadas estables se seleccionaron con 300 ng/ml de puromicina. La expresión del MDR-1 se determinó mediante análisis FACS (FACS-calibur, Becton Dickinson, Bedford, MA, EE. UU.) con un AcM específico contra el MDR-1 en concentración 1 µg/ml (C. Baum, Universidad de Hamburgo).  
30

**Ensayo de citotoxicidad:** La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo con XTT tetrazolio/formazano según lo descrito con anterioridad (Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KID, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988;48:4827-4833.). En breve, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano con una densidad de  $10^4$ /pocillo en 100 µl de medio y se expusieron a concentraciones de fármaco que variaban entre  $10^{-4}$  y  $10^{-12}$  M. En los momentos indicados (6-72 h), la viabilidad celular se evaluó añadiendo 50 µl de reactivo XTT (1 mg/ml en RPMI sin suero) activado con PMS al 0,2% v/v (1,5 mg/ml en PBS) incubado a 37°C durante 4 h. Las placas se analizaron en un lector de microplacas Thermomax (Molecular Devices) a 450 nm. Los valores de densidad óptica (DO) se representaron como una función de la concentración de fármaco y las curvas se integraron con el software Softmax para obtener los valores de concentración  $CI_{50}$ .  
35  
40

**Análisis del ciclo celular:** Las distintas fases del ciclo celular se determinaron en un ensayo estándar con yoduro de propidio. En resumen, las células se sembraron en placas de 24 pocillos ( $10^5$ /pocillo) y se incubaron con VP-16 o ProVP-16 I y II. En los momentos indicados las células se recogieron y se fijaron en 4,5 ml de etanol (75%, -20°C) durante al menos 12 h (4°C). Las células se lavaron con PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en 250 µl de PBS que contenía ARNasa (0,3 mg/ml) y yoduro de propidio (50 µg/ml) y se incubaron a oscuras (30 min., TA). Los histogramas de ADN que definen las distintas fases del ciclo celular se determinaron subsiguientemente por duplicado mediante análisis FACS y los resultados medios se expresaron en forma de porcentaje.  
45

**Estudios de toxicidad en ratones:** Primero se prepararon soluciones madre de etopósido y proetopósido 10 mM con cremophor/etanol 50:50 v/v que después se diluyeron hasta la concentración final con PBS (pH 7,4). A ratones A/J de 8 a 10 semanas de edad se les inyectó por vía i.p. 20 mg/kg o 60 mg/kg de etopósido o de proetopósido, o bien un control de disolvente (DMSO al 25%, etanol al 12,5%, cremophor al 12,5%, PBS al 50%), los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. El VP-16 (60 mg/kg) se inyectó sólo los días 1, 3 y 5. Los pesos corporales y la supervivencia se verificaron a lo largo del tiempo.  
50

55 **Efecto antitumoral en un modelo de xenoinjerto de leucemia de linfocitos T:** Se indujeron tumores primarios mediante la inyección de  $5 \times 10^6$  células MOVp3 en 100 µl de PBS (pH 7,4) en la piel del costado izquierdo de cada ratón SCID. 55 días después de la inyección podían palparse los tumores primarios establecidos. Los ratones (n=8) recibieron por inyección intraperitoneal disolvente (DMSO al 25%, etanol al 12,5%, cremophor al 12,5%, PBS al 50%), VP-16 (15 mg/kg) y Pro VP-16 II (15 y 45 mg/kg) en un volumen total de 200 µl. Cada ratón recibió un total de  
60 7 inyecciones los días 55, 57, 59, 69, 71, 87 y 90 después de la inoculación de las células tumorales. El tamaño del

tumor primario se determinó a lo largo del tiempo mediante mediciones con microcalibre y los volúmenes se calcularon de acuerdo con:  $\frac{1}{2} \times \text{anchura}^2 \times \text{longitud}$ . El peso corporal se midió con una balanza digital estándar.

**Estadísticas:** La significación estadística de las diferencias halladas entre los grupos experimentales de animales se determinó con la prueba de la t de Student bilateral. Los hallazgos se consideraron significativos si los valores bilaterales de p eran  $<0,01$ .

**Química de la activación de los profármacos de etopósido:** Con el fin de confirmar que ProVP16-I y II son en efecto profármacos, primero se determinaron sus características de activación *in vitro* mediante HPLC (Fig. 1, 2). La conversión de ProVP-16 I en ProVP-16 II y la posterior liberación de VP-16 siguen un mecanismo de activación bifásico (Fig. 1). En primer lugar, el ProVP-16 I se convierte en ProVP-16 II con la eliminación de 2,2-dihidroxiopropano en menos de 2 h con algo de degradación (alrededor del 10%) del resto glucosídico en condiciones ácidas (THF, HCl 2N) (Fig. 2A). En segundo lugar, el ProVP-16 II se hidroliza en VP-16 bajo condiciones de pH básico con la eliminación de glicerina (Fig. 1, 2B). En todos los experimentos las curvas de conversión-tiempo mostraron una cinética de primer orden. Es importante señalar que en condiciones fisiológicas de tamponamiento (PBS, pH 7,4, 37°C), el ProVP-16 II permanece estable con una velocidad de conversión  $<5\%$  entre 5 y 18 h. El ProVP-16 I es completamente estable sin conversión medible en PBS (pH 7,4, 37°C) y, a diferencia del ProVP-16 II, también es inerte en condiciones básicas (pH  $\leq 10,0$ ). Esta inusual estabilidad hidrolítica del ProVP-16 I se atribuye a la naturaleza hidrófoba de toda la región sur de la molécula y, en menor medida, al impedimento estérico generado por los dos grupos metoxi en orto que rodean el grupo carbonato.

La utilidad de los profármacos acordes con la presente invención también salta a la vista por el hecho de que son activados –hidrolizados– en presencia de enzimas presentes en la naturaleza, pero permanecen estables en soluciones acuosas en un amplio intervalo de valores de pH.

La activación de ProVP-16 I y II tiene lugar en presencia de suero, con semividas de conversión de 750,8 min y 56,1 min, respectivamente. La carboxilesterasa de hígado porcino también cataliza la conversión de ProVP-16 I y II en VP-16, con semividas de conversión de 14,2 min y 514,1 min, respectivamente. Estos hallazgos indican claramente la activación enzimática de los profármacos a pH 7,4 por mediación de las carboxilesterasas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de la hidrólisis de los profármacos de etopósido

Compuesto	Medios (37°C $\pm$ 0,5)	Ph ( $\pm$ 0,1)	$k_{\text{obs}}$ ( $10^{-3}\text{-min}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$t_{1/2}$ (minutos)
Profármaco I	Tampón PBS	5,0-10,0	Sin conversión	-
2		11,8	8,333 $\pm$ 0,50	83,16
	Suero humano	7,3	0,923 $\pm$ 0,046	750,8
	Esterasa <sup>b</sup>	7,3	48,89 $\pm$ 3,62	14,17
Profármaco II	Tampón PBS	5,0-7,3	Sin conversión	-
3		8,0	3,201 $\pm$ 0,428	216,49
		8,8	7,142 $\pm$ 0,351	97,03
		10,5	100,01 $\pm$ 12,72	6,93
	Suero humano	7,3	12,36 $\pm$ 0,965	56,07
	Esterasa	7,3	1,348 $\pm$ 0,081	514,10

a) media  $\pm$  DE

b) carboxilo éster hidrolasa de hígado porcino

#### Ejemplo de referencia 2

**Actividad de ProVP-16 I y II contra estirpes celulares de leucemia y cáncer:** La citotoxicidad de ambos proetopósidos se puso a prueba en un conjunto de estirpes de células tumorales haciendo uso del ensayo de antiproliferación con el colorante vital XTT (Fig. 3A). En la mayoría de las estirpes de células tumorales humanas estudiadas, ambos proetopósidos fueron sustancialmente más activos que el compuesto original, con valores de  $CI_{50}$  1000 veces inferiores en el caso de las células SW480 de carcinoma de colon, entre 100 y 1000 veces inferiores con las HT-29 de carcinoma de colon, las ADR5000 de carcinoma ovárico y las HL-60 de preleucemia de linfocitos B, entre 10 y 100 veces inferiores con las HeLa de carcinoma de cuello uterino, las A2780 de carcinoma ovárico, las K562 de leucemia mielóide crónica, las Jurkat de leucemia de linfocitos T y las SK-N-SH de neuroblastoma, y entre 2 y 10 veces menores con las Molt-3 de leucemia de linfocitos T, las Reh y Nalm-6 de preleucemia de linfocitos B, las VCR100 de leucemia linfoblástica T y las CEM de leucemia linfoblástica T. Sólo tres estirpes celulares, la NXS2 de neuroblastoma murino (Fig. 3A), la CHO de ovario de hámster chino y la Hamms de carcinoma de colon humano, respondieron igual de bien al etopósido que a los proetopósidos. Dos estirpes celulares, la ADR5000 resistente a la doxorubicina y la VCR100 resistente a la vincristina, ambas con expresión amplificada del MDR-1, mostraron un potencial citotóxico superior con ambos proetopósidos que las respectivas estirpes parentales no resistentes A2780 y CEM.

La evolución temporal de la acción citotóxica del Pro-VP16 I se siguió con células de leucemia de linfocitos T Molt-3 (Fig. 3B). Los resultados indican un inicio retardado de la actividad citotóxica del ProVP-16 I, que no da comienzo

hasta 24 h después de la incubación. En ese momento, el efecto citotóxico del VP-16 original ya estaba casi completamente desatado. El efecto citotóxico del ProVP-16 I resultó completo entre 48 y 72 h después de la incubación ( $CI_{50}$   $1,0 \times 10^{-8}$ ) y superó el del VP-16 ( $CI_{50}$   $6,5 \times 10^{-8}$  M). Se observaron resultados similares con el ProVP-16 II (datos no mostrados). Estos hallazgos indican que la actividad citotóxica de ProVP-16 I y II responde a un mecanismo de liberación lenta, cosa que concuerda plenamente con el concepto de profármaco.

#### Ejemplo de referencia 3

**Efecto de ProVP-16I y II en células multirresistentes a fármacos:** A tenor del hallazgo de que ProVP-16 I y II también son más eficaces que el VP-16 en estirpes celulares que expresan el MDR de modo natural (Fig. 3), la cuestión planteada fue si ambos profármacos podrían vencer la MDR artificial en condiciones *in vitro*. Con este propósito, a partir de la estirpe celular MDR-1 negativa Molt-3 se generó un subclón resistente, el MOVP-3 (Fig. 4A). La expresión del ARNm del MDR-1 en las células MOVP-3 se determinó por RT-PCR (Fig. 4A) mientras que la expresión proteica incrementada del MDR-1 sobre la superficie celular se verificó mediante análisis FACS con el anticuerpo monoclonal UIC2. Los exhaustivos análisis de expresión génica en que también se examinaron MRP, LRP, las topoisomerasas I, II $\alpha$  y II $\beta$  así como Bax y Bcl-2 (datos no mostrados) revelaron que la única diferencia que explica la farmacoresistencia de las células MOVP-3 respecto a las Molt-3 es la expresión de MDR-1. Este extremo quedó confirmado por la caracterización funcional de la subestirpe, que reveló una resistencia 100 veces mayor contra el etopósido, con valores  $CI_{50}$  de  $2 \times 10^{-6}$  M en las células MOVP-3 frente a  $2 \times 10^{-8}$  M en las células Molt-3 (Fig. 4B). Sin embargo, las células MOVP-3 mantuvieron casi íntegramente su sensibilidad hacia ProVP-16 I y II sin que las células parentales Molt-3 y las farmacoresistentes MOVP-3 manifestaran diferencias significativas entre sí en cuanto a la citotoxicidad del proetopósido, con valores  $CI_{50}$  de  $2 \times 10^{-8}$  M con ambos profármacos en ambas estirpes. Resultados similares se obtuvieron en células Molt-3 tras su transfección estable con ADNc del MDR-1 por medio del pMDR-IRESpuo (Molt-3/MDR-1), que acabó generando en ellas multirresistencia contra etopósido, doxorubicina, taxol y vinblastina (datos no mostrados). Las células Molt-3/MDR-1 también permanecieron completamente sensibles a ProVP-16 I y II. Los controles transfectados de forma estable con un vector vacío (pIRESpuo) o un vector que contenía GFP no revelaron resistencia a ninguno de los fármacos probados.

Por otra parte, el tipo de resistencia de la subestirpe MOVP-3 se caracterizó evaluando el alcance de la resistencia cruzada. Las células MOVP-3 mostraron resistencia cruzada contra todos los fármacos de tipo MDR-1 (etopósido, doxorubicina, paclitaxel y vinblastina) pero no contra los fármacos no MDR-1 (MTX, 5-FU, genisteína y caliqueamicina  $\theta$ ) (Fig. 4C). En resumen, estos hallazgos demuestran claramente que ProVP-16 I y II pueden vencer la multirresistencia farmacológica derivada de MDR-1 en condiciones *in vitro*.

En el ensayo funcional de MDR-1 con el colorante JC-1, puede demostrarse el aumento del flujo de salida del JC-1 en las células MOVP-3 respecto a las controles Molt-3, tal y como indica el descenso de la señal en FL-1 en la subestirpe resistente frente a las células parentales Molt-3 (Fig. 4D). Ese descenso se abolió mediante la coincubación con Pro-VP-16 I  $3 \times 10^{-4}$  M (Fig. 4D) el cual inhibió la salida facilitada por el MDR-1 a lo largo de un amplio intervalo de concentración hasta  $10 \times 10^{-6}$  M (datos no mostrados). Resulta destacable que el VP-16 administrado en concentraciones equimolares fuera incapaz de modular la función del MDR-1, a tenor de lo que indicaba la señal del JC-1, en nada distinta a la de los controles de PBS. Estos hallazgos señalan claramente que el diseño del profármaco disminuye directamente la salida de sustrato mediada por MDR-1.

Para evaluar el mecanismo citotóxico mediado por ProVP-16 I y II en las células MOVP-3 multirresistentes a fármacos, se analizó el efecto de ambos fármacos sobre el ciclo celular en concentraciones que variaban entre 10 nM y 1  $\mu$ M y se comparó con lo que sucedía en las células parentales Molt-3. La Figura 5 muestra resultados típicos obtenidos con los profármacos a 0,5  $\mu$ M. En concreto, células MOVP-3 (Fig. 5 B) y Molt-3 (5 A) asincrónicas se incubaron con VP-16, ProVP-16 I y II durante 72 h. Periódicamente se analizó en qué momento del ciclo celular se hallaban las células en momentos indicados. Los resultados indican claramente que ambos, Pro VP-16 I y II, tanto a 0,5  $\mu$ M (Fig. 5B) como en todo el intervalo de concentración (10 nM a 1  $\mu$ M) (datos no mostrados) son muy eficaces para inducir un incremento estable del pico de pre-G1 en las células MOVP-3 al cabo de 24 h, característico de la apoptosis. En contraste con los profármacos, el VP-16 no consiguió inducir con eficacia la apoptosis, lo cual concuerda con su eliminación por la acción del MDR-1 y con la incapacidad de éste último para eliminar a ProVP-16 I y II. La inducción de la apoptosis también quedó demostrada en las células parentales Molt-3 en todo el intervalo de concentración (0,5  $\mu$ M, Fig. 5A). Se demostró que el VP-16 inducía la apoptosis en las células Molt-3 con una magnitud similar a la de ProVP-16 I y II. En conjunto, estos resultados parecen indicar que ProVP-16 I y II no son sustratos de MDR-1.

#### Ejemplo de referencia 4

**Toxicidad y eficacia *in vivo* de ProVP-16 II en un modelo de xenoinjerto de leucemia de linfocitos T multirresistente a fármacos:** A partir de los hallazgos *in vitro* que no revelaron diferencias entre ProVP-16 I y II, se seleccionó a ProVP-16 II para los experimentos *in vivo* por su mayor hidrosolubilidad. En primer lugar se determinó la toxicidad sistémica de ProVP-16 II en ratones A/J (n=6) a los que se inyectó por vía i.p. VP-16 y ProVP-16 II (Fig. 6A). Todos los ratones que recibieron 20 mg/kg de VP-16 sobrevivieron con una pérdida de peso media del 10%. En cambio, 5/6 ratones tratados con 60 mg/kg de VP-16 mostraron una pérdida de peso >20%. Estos hallazgos contrastan vivamente con los resultados obtenidos con ProVP-16 II. En ese caso, la administración de 20 y 60 mg/kg

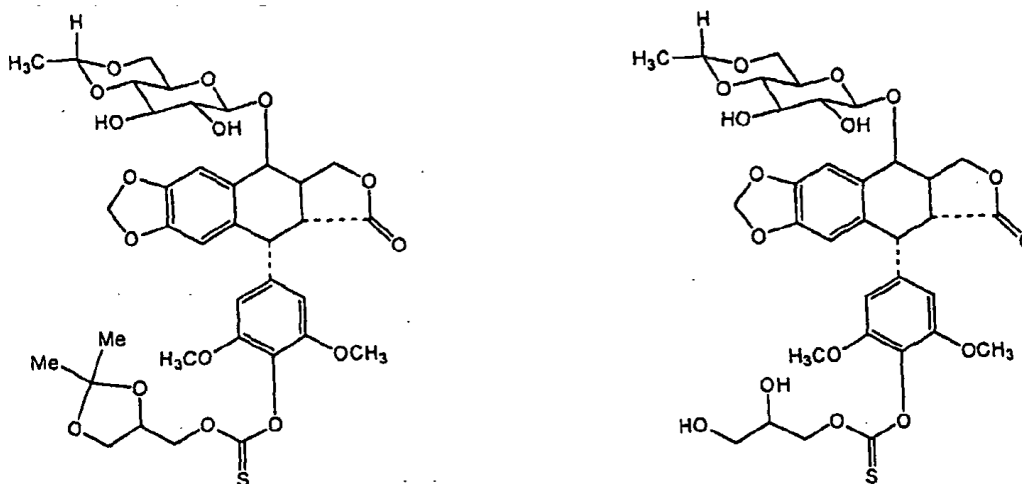
5 de ProVP-16 II resultó bien tolerada, sin muertes en ningún grupo experimental. Solo los ratones que recibían 60 mg/kg de ProVP-16 II experimentaron una pérdida de peso transitoria de <10% en contraste con los receptores de 20 mg/kg de Pro VP-16 II, que mantuvieron su peso corporal medio estable. Así pues, la dosis máxima tolerada definida por la disminución del peso corporal <20% se estableció en 20 mg/kg para el VP-16 y en 60 mg/kg para el ProVP-16 II, lo cual concuerda con la disminución de la toxicidad sistémica como mínimo en un factor de tres lograda por el diseño del profármaco.

10 En segundo lugar, con un modelo de xenoinjerto de leucemia de linfocitos T multirresistente a fármacos se determinó el efecto antitumoral de ProVP-16 II y se comparó con el de VP-16. Se indujeron tumores primarios establecidos mediante la inyección s.c. de  $5 \times 10^6$  células MOV-3 multirresistentes a fármacos y el crecimiento del tumor se siguió a lo largo de un período de 105 días. El tratamiento se inició 55 días después de la inoculación de las células tumorales por inyección i.p., con un tamaño medio del tumor de  $250 \text{ mm}^3$ . Las dosis de VP-16 (15 mg/kg) y de ProVP-16 II (15 y 45 mg/kg) se seleccionaron a partir de los resultados de la Fig. 6A a fin de reducir más la toxicidad sistémica. El tratamiento con 45 mg/kg de ProVP-16 II indujo la regresión de los tumores primarios establecidos en 7/7 animales diez días después del inicio del tratamiento, regresión que permaneció estable más de 15 2 meses (Fig. 6B). Este tratamiento resultó bien tolerado, con una pérdida de peso transitoria de apenas el 6% (Fig. 6C). Este hallazgo contrastó con el observado en los ratones tratados con 15 mg/kg de VP-16, que no mostraron respuesta antitumoral y experimentaron un crecimiento continuo de los tumores primarios idéntico al de los ratones de control tratados únicamente con disolvente. Los ratones tratados con 15 mg/kg de VP-16 también manifestaron una toxicidad significativa, con una pérdida de peso transitoria del 20% de media (Fig. 6C). En cambio, los ratones 20 que recibieron 15 mg/kg de ProVP-16 II no mostraron una pérdida de peso apreciable (Fig. 6C) y presentaron una reducción drástica del crecimiento de los tumores primarios en contraste con los ratones tratados con la cantidad equivalente de 15 mg/kg de VP-16. A fin de determinar si la expresión de MDR-1 permanecía estable en el transcurso del experimento, se aisló ARN de explantes tumorales el día 105; todos los tumores investigados revelaron una señal del MDR-1 en la RT-PCR (Fig. 6D).

25 Las características de la presente invención divulgadas en la memoria descriptiva, en las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos pueden, tanto separadamente como en cualquiera de sus combinaciones, ser fundamentales para llevar a cabo la invención en sus diversas formas.

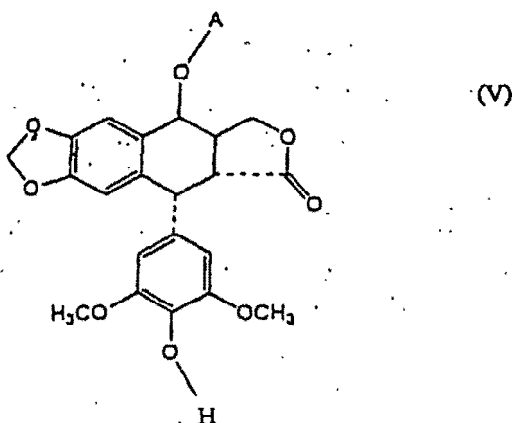
REIVINDICACIONES

1. Una podofilotoxina seleccionada del grupo que comprende

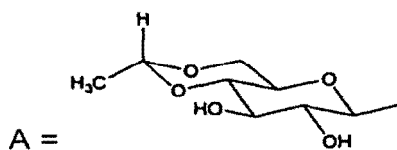


2. Método para la preparación de una podofilotoxina acorde con la reivindicación 1, caracterizado por

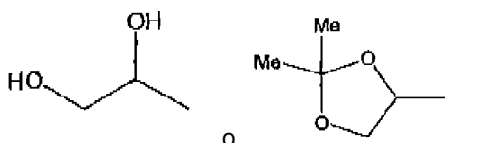
5 a) un compuesto con la fórmula (V)



En qué A es



, se hace reaccionar con un haloformiato  $W-(C=X)-(Y)-(CH_2)_n-Z$ , en el que  $X=S$ ,  $Y=O$ ,  $n = 1$  y  $Z$  es



y W es Cl, F, Br o I,

b) caracterizado porque un compuesto como el representado por la fórmula V se hace reaccionar con fosgeno o triclorometilcloroformiato, para dar el producto intermedio 4'-fenol cloroformiato, haciéndose reaccionar dicho producto intermedio con un alcohol o tiol de la fórmula ZYH, para dar el tiocarbonato correspondiente,  $Y=S$ , y siendo Z como se define en a).

3. Método acorde con la reivindicación 2, caracterizado porque el compuesto que se representa con la fórmula V se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo consistente en solcetalcloroformiato y PEG-cloroformiato.
4. Método para preparar una podofilotoxina acorde con la reivindicación 1, caracterizado porque el producto resultante de cualquiera de las reivindicaciones 2-3 se hidroliza.
- 5 5. Composición farmacéutica que comprende a) una podofilotoxina acorde con la reivindicación 1, y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una podofilotoxina acorde con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica acorde con la reivindicación 5 para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares.
- 10 7. Una podofilotoxina o una composición farmacéutica acorde con la reivindicación 6, caracterizada porque el trastorno proliferativo celular afecta a un niño, un adolescente o un adulto.

Fig. 1

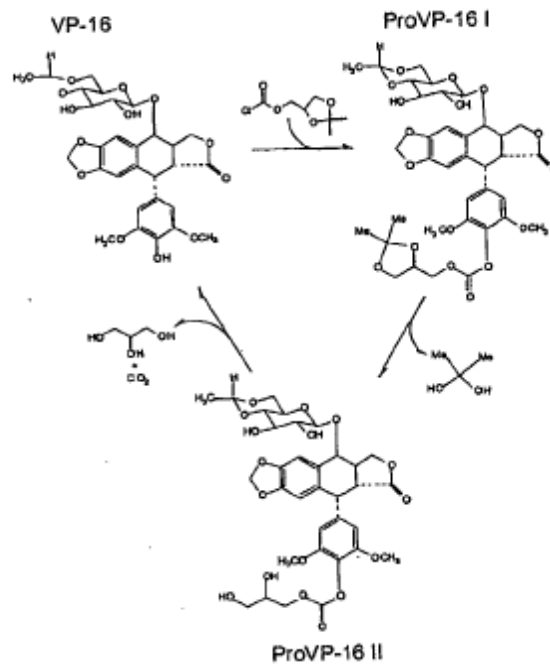




Fig . 2

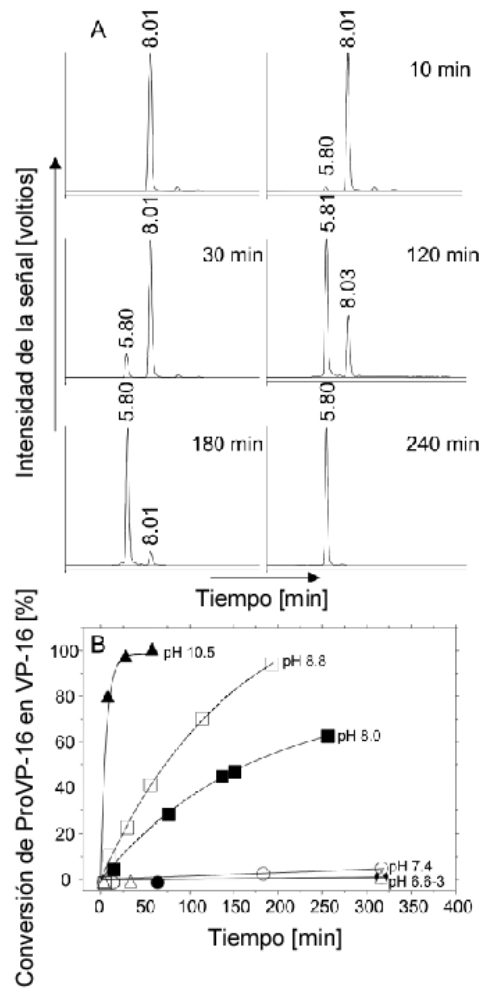


Fig . 3

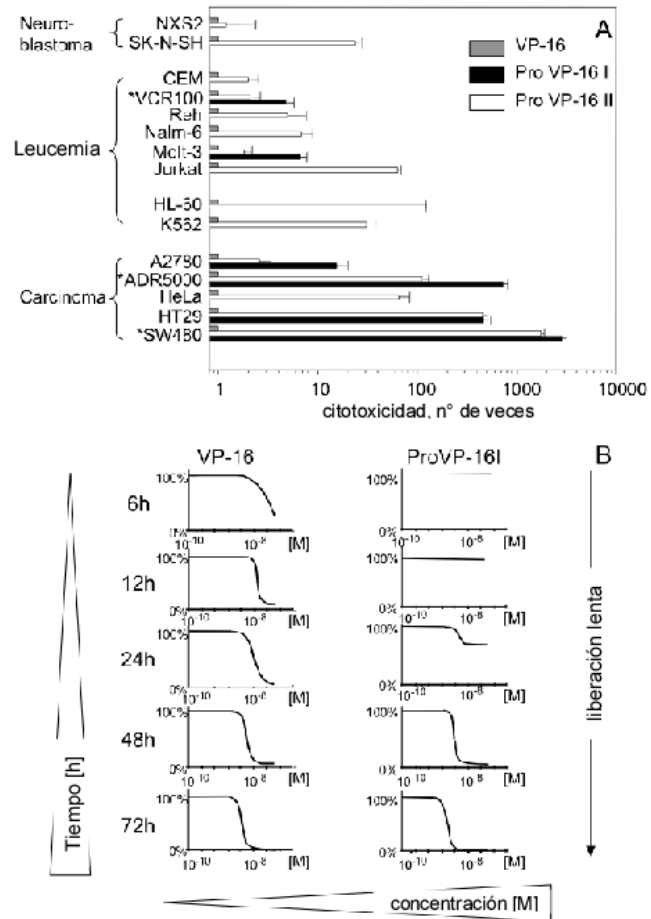


Fig . 4

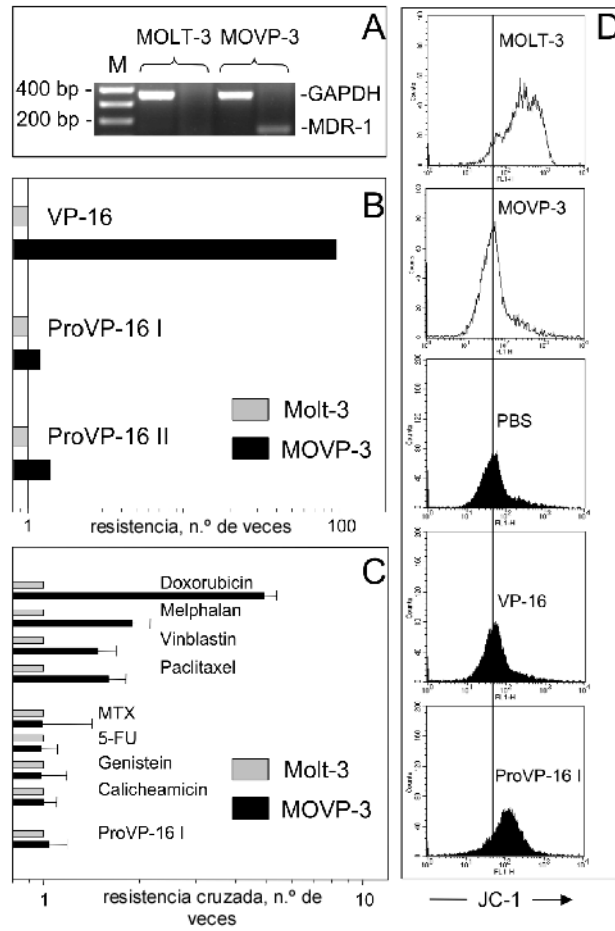


Fig . 5

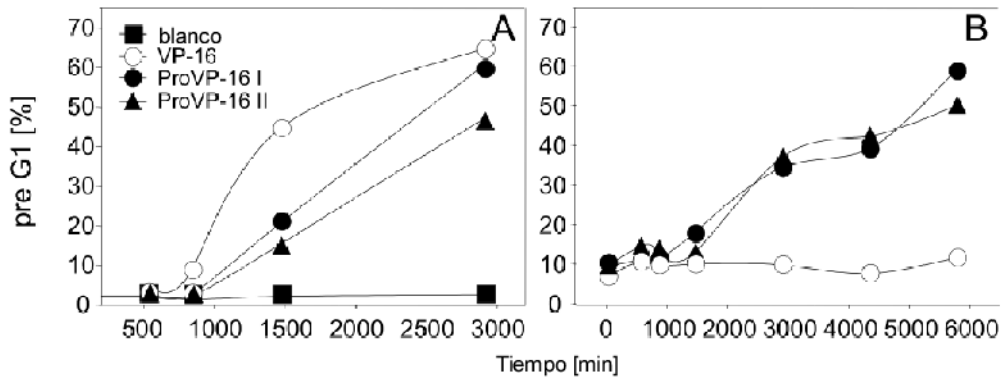


Fig. 6

