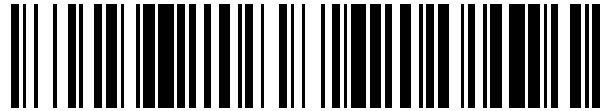


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 682**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 29/02** (2006.01)  
**A61P 9/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 12160556 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2481428**

54 Título: **Agentes de interrupción vascular activados por MMP**

30 Prioridad:

**12.04.2007 GB 0707034**

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

**09.06.2016**

73 Titular/es:

**INCANTHERA LIMITED (100.0%)  
76 King Street  
Manchester M2 4NH, GB**

72 Inventor/es:

**GILL, JASON;  
LOADMAN, PAUL;  
FALCONER, ROBERT;  
PATTERSON, LAURENCE;  
ATKINSON, JENNIFER y  
BIBBY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 573 682 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

Agentes de interrupción vascular activados por MMP

Campo de la Invención

5 La presente invención se relaciona con compuestos que se activan in vivo a partir de compuestos biológicamente inactivos relativamente, denominados "profármacos", con compuestos biológicamente activos relativamente. La invención también se relaciona con el uso de dichos compuestos en el tratamiento dirigido de cáncer.

Antecedente de la invención

10 La utilidad clínica de muchos compuestos antitumorales está restringida por su toxicidad hacia células sanas, lo que resulta en un índice terapéutico estrecho y posterior reducción en el beneficio del tratamiento. Por lo tanto, sería ventajoso dirigir el fármaco de forma selectiva al tumor y, en consecuencia reducir la toxicidad de tejido y los efectos secundarios normales. Un medio para aproximarse a este objetivo es el diseño de moléculas de profármaco que se dirigen específicamente a o se activan selectivamente en el tejido tumoral, lo que reduce los niveles sistémicos de fármaco activo y aumenta el índice terapéutico.

15 El crecimiento del tumor, supervivencia y diseminación de las células tumorales metastásicas es dependiente de la presencia de una red vascular que funciona dentro del tumor (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005)). Se ha demostrado que la interrupción de incluso una pequeña proporción de la vasculatura del tumor induce amplia muerte de tumor y retardo de metástasis, puesto que un único vaso sanguíneo es responsable de apoyar la supervivencia de muchas células tumorales. Las células endoteliales, que forman el componente principal de la vasculatura, son altamente dependientes del citoesqueleto de tubulina para su motilidad, invasión, adhesión, alineación y proliferación (Denekamp, J, Br J Cancer, 45, 136-139 (1982)). Los agentes que interrumpen la red de microtúbulos endoteliales por lo tanto provocan un colapso rápido en el flujo sanguíneo del tumor y un período prolongado de cierre vascular que culmina en una extensa necrosis de células tumorales (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Lippert JW, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007)).

25 La colchicina y sus análogos son agentes de interrupción vasculares potentes (VDA) que provocan hemorragia y posterior necrosis extensa en los tumores (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005)), como una consecuencia directa de la unión de tubulina e inducción de la despolimerización de los microtúbulos (Chaudri et al., J Mol Biol, 303, 679-692 (2000)). Sin embargo, la colchicina no ha mostrado valor intrínseco como un producto terapéutico anticancerígeno clínicamente aplicable debido a un alto nivel de toxicidad y consiguiente índice terapéutico muy estrecho (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Quinn et al., J Med Chem, 24, 636-639 (1981)). Los principales esfuerzos en varios laboratorios se han centrado en el desarrollo de pequeñas moléculas de VDA con potencial clínico, en particular ZD6126 (análogo de fosfato de N- acetilcolquinol) y combretastatina-A4-fosfato (JW Lippert, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007)), sin embargo, a pesar de mostrar potencia en evaluación preclínica y ensayos clínicos, se reportan cardiotoxicidad y efectos no deseados en la vasculatura normal para estos agentes (Lippert JW, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007); Beerepoot et al., J Clin Oncol, 24, 1491-1498 (2006); Rustin et al., J Clin Oncol, 21, 2815-2822 (2003)).

Los presentes inventores han desarrollado un sistema para superar el efecto tóxico de la administración sistémica de determinados agentes anticancerígenos potentes tales como agentes de interrupción vasculares.

Declaraciones de la invención

40 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un agente de interrupción vascular (VDA) asociado con un sitio de división proteolítica de MMP. El término "asociado con" en el contexto de la invención está destinado a incluir todos los significados de asociación directos e indirectos, de forma general covalentes, que incluyen, pero no se limitan a, entrecruzamiento químico o péptido de unión de enlace. Más específicamente la presente invención proporciona un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un agente de interrupción vascular (VDA) que es un agente anticancerígeno ligado a un péptido que comprende un sitio de división proteolítica de matriz de metaloproteinasas (MMP) que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-.

50 Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. También, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metal alcalino o alcalinotérreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

En un aspecto preferido la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I)

X – Y (I)

en donde X es el agente de interrupción vascular (VDA);

Y comprende el sitio de división proteolítica de matriz de metaloproteínasa (MMP).

5 Los compuestos de acuerdo con la invención proporcionan profármacos que se convierten a un VDA activo y potente dentro del ambiente del tumor mediante MMPs sobreexpresados. La activación selectiva de tumor de un profármaco de la invención aumenta los niveles de tumor, y disminuye los niveles sistémicos, del VDA e ingredientes activos opcionalmente adicionales por lo tanto aumentando en gran medida su índice terapéutico y eficacia.

10 Los VDA comprenden un sistema de anillos múltiples, por ejemplo un sistema de anillo fusionado o no fusionado bicíclico o tricíclico. Por lo tanto X incluye cualquier sistema de anillos múltiples de un VDA que es capaz de unirse a e interrumpir los vasos sanguíneos del tumor.

Los VDA son compuestos que interactúan directamente con la tubulina y microtúbulos en consecuencia intracelulares, lo que resulta en un efecto citostático o citotóxico. Los VDA se pueden dividir en tres clases:

(i) aquellos compuestos que interactúan con tubulina en los sitios de unión de colchicina sobre la tubulina;

15 (ii) aquellos compuestos que comparten un sitio de unión común sobre la tubulina con los alcaloides Catharan de esta manera (Vinca);

(iii) compuestos que promueven la formación de microtúbulos estables en una manera similar a paclitaxel, un diterpenoide de taxano novedoso aislado a partir de la corteza del tejo del Pacífico.

20 De esta manera, en la invención el VDA es un agente de unión de tubulina. Los agentes de unión de tubulina se pueden seleccionar del grupo que consiste de i) aquellos que interactúan con tubulina en los sitios de unión de colchicina: que incluyen pero no se limita a colchicina (que incluye análogos de colchicina tales como N-acetilcolquinol-O-fosfato (ZD6126) y ABT-751), colchicinas, combretaestatinas, fenestatina, podofilotoxinas, esteganacinas, amfetinila y estilbenos. y ii) aquellos que interactúan con el sitio de unión Vinca de tubulina: que incluyen pero no se limita a vincristina, vinblastina, vinflunina, maitansinoides, phomopson A, rizoxina, auriestatina (que incluye análogos de los mismos) y dolaestatina

25 En un aspecto muy preferido de la invención el VDA es un agente de unión de tubulina que interactúa con los sitios de unión de colchicina dentro de la tubulina.

Los derivados de colchicina pueden incluir, pero no se limitan a, azademetilcolchicina, azacolchicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina.

30 El VDA puede incluir agentes de unión de tubulina que incluyen combretaestatinas (por ejemplo combretaestatina A-4 3-0-fosfato), auriestatina (que incluye análogos de los mismos), dolaestatina; y flavenoides (por ejemplo factor de necrosis de tumor [alfa] y ácido 5,6-dimetilxantenona- 4-acético (DMXAA), ácido de flavona acético (FAA)). Por lo tanto en una realización alternativa de la invención el VDA es un combretaestatina.

La división proteolítica en el sitio de división de MMP por una MMP libera el VDA, y cualquier otro agente activo asociado con el sitio de división de MMP, en forma activa.

35 La familia de las MMP se divide en ocho grupos estructurales: cinco de las cuales son secretadas y tres son de tipo membrana (MI-MMP). Las MT-MMPs se localizan en la superficie celular.

Las MT-MMP se pueden agrupar en:

(i) MT-MMPs de tipo transmembrana de tipo I por ejemplo MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3- MMP) y MMP-24 (MT5-MMP);

40 (ii) grupo estructural anclado a glicosil fosfatidilinositol (GPI) de MT- MMPs por ejemplo MMP-17 (MT4-MMP) y MMP-25 (MT6-MMP);

(iii) clase de transmembrana tipo II por ejemplo MMP-23.

El sitio de división de MMP comprende una secuencia de péptidos que tiene un enlace de péptido, que es dividible por un MMP. Y es una secuencia de péptidos que comprende entre siete y veinte aminoácidos, por ejemplo entre

siete y diez aminoácidos (por ejemplo 7 o 8 aminoácidos). Los aminoácidos de la secuencia de péptidos puede incluir cualquier D- o L- aminoácido de ocurrencia natural o sintético, preferiblemente L- o combinaciones de D- y L- aminoácidos.

5 La invención también incluye análogos de péptidos, por ejemplo imitadores de péptido, de la secuencia de péptidos en la que, por ejemplo, un enlace amida se reemplaza con enlaces olefínicos, aminoácidos Na y C [alfa]-metilados, aminoácidos no naturales y otros métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos peptidomiméticos se utilizan en la técnica para mejorar la especificidad de la división por lo que sirven para disminuir la hidrólisis enzimática no deseada.

10 En una realización preferida de la invención el sitio de división proteolítica de MMP comprende una secuencia de aminoácidos (por ejemplo 6 a 10 aminoácidos) en la que uno o más aminoácidos en la secuencia a saber serina, treonina y/o tirosina se glicosilan para mejorar hidrofiliidad y como tal solubilidad. O-glicosilación de aminoácidos adecuados en la secuencia a saber serina, treonina y tirosina pueden mejorar la hidrofiliidad y como tal la solubilidad. Preferiblemente el sitio de división proteolítica de MMP comprende 8 aminoácidos.

15 El sitio de división proteolítica de las MM descrito aquí puede comprender la secuencia P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' en donde

P1 a P4 y P1' a P4', que puede ser la misma o diferente, son residuos de aminoácidos y en donde la división proteolítica tiene lugar entre los residuos P1 y P1'. Preferiblemente P1 y P1' son diferentes. Preferiblemente aún P1 a P4 son diferentes. Preferiblemente P1' a P4' son diferentes.

En una realización P1 es Gly y/o P1' es Hof.

20 El sitio de división proteolítica de MMP puede comprender la secuencia de aminoácidos (i)

-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- (i)

Como se describe aquí el sitio de división proteolítica de MMP comprende la secuencia de aminoácidos (ii)

-K-K-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- (ii)

25 en donde K representa un aminoácido que se puede seleccionar del grupo que consiste de, pero no se limita a, Cit, Gly, Glu y Pro.

Un sitio de división proteolítica de MMP descrito aquí comprende la secuencia de aminoácidos (iii)

-Glu-Pro-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- (iii)

En la presente invención el sitio de división proteolítica de MMP comprende la secuencia de aminoácidos (iv)

-Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- (iv)

30 En una realización la invención comprende un compuesto de la fórmula (I) en donde Y comprende un sitio de terminal C y un sitio de terminal N y en donde dicho sitio de terminal C se liga directa o indirectamente a X y dicho sitio de terminal N se liga directa o indirectamente a una unidad estructural adicional por ejemplo c o Z como se describe aquí adelante.

35 Una realización alternativa de la invención comprende un compuesto de la fórmula (I) en donde Y comprende un sitio de terminal C y un sitio de terminal N y en donde dicho sitio de terminal N se liga directa o indirectamente a X y dicho sitio de terminal C se liga directa o indirectamente a una unidad estructural adicional por ejemplo c o Z como se describe aquí adelante.

En una realización se proporciona un compuesto de la fórmula (I) en donde X es colchicina o un análogo de la misma y Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-.

40 En un aspecto preferido la invención proporciona un compuesto de la fórmula (II)

X - Y - c (II)

en donde X e Y son como se define aquí;

c es un grupo de extremo o "grupo de terminación de cadena". Se pueden utilizar grupos de terminación de cadena para finalizar una cadena de péptido en uso farmacéutico con el fin de prevenir la degradación no específica del péptido por ejemplo mediante enzimas diferentes de MMPs. c puede incluir cualquier unidad estructural apropiada sobre los terminales N o C que actúan como un grupo de bloqueo que incluye, pero no se limita a azúcares simples, D-aminoácidos, ácidos de prolina imino o derivados de fluoresceína.

5

La presente invención puede proporcionar adicionalmente un "ligador". El ligador se puede proporcionar en los terminales C y/o N de Y. Preferiblemente, el ligador se proporciona en el terminal C de Y. Preferiblemente, el ligador es continuo con la secuencia de aminoácidos de Y. El ligador puede incluir cualquier unidad estructural que se asocia con Y y que se puede eliminar químicamente, enzimáticamente o descomponer espontáneamente. El ligador puede consistir de un solo aminoácido (por ejemplo tirosina) o puede comprender una secuencia de aminoácidos. Cuando el ligador comprende una secuencia de aminoácidos, la secuencia puede proporcionar una región hidrófila que puede facilitar la división por una MMP en Y. La O-glicosilación de aminoácidos adecuados en la secuencia a saber, serina, treonina y tirosina puede aumentar la hidrofiliidad y como tal solubilidad.

10

De esta manera en un aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (III)

15 X-a-Y (III)

en donde X e Y son como se define aquí; y

a es un ligador en donde el ligador se asocia directa o indirectamente con X.

En una realización la invención proporciona un compuesto de la fórmula (IV)

X - a - Y - c (IV)

20 en donde X, a, Y y c son como se define aquí.

En un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un "separador", que puede ser el mismo que, o diferente de, el ligador descrito aquí. El separador se puede proporcionar en el terminal C y/o N de Y. Preferiblemente se proporciona el separador en el terminal N de Y y sirve para evitar la extracción no deseada de c durante la síntesis. El separador puede estar directamente o indirectamente asociado con Y. El separador puede incluir cualquiera de un solo aminoácido (por ejemplo, β-alanina), secuencia de aminoácidos, un grupo succinilo. Por lo tanto, la invención proporciona preferiblemente un compuesto de fórmula (V)

25

X - Y - b - c (V), donde

X, Y, y c son como se definen aquí;

b es un separador como se define aquí.

30 En una realización adicional la invención proporciona un compuesto de la fórmula (VI)

X - a - Y - b - c (VI)

en donde X, Y, a, b y c son como se define aquí.

En una realización de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (VI) en donde X es colchicina (o un análogo de la misma), Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-, a es tirosina, b es alanina y c es fluoresceína o un derivado de la misma.

35

En un segundo aspecto de la invención se proporciona un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la fórmula (VII)

X-Y-Z (VII)

en donde X e Y son como se define aquí; Z es un agente anticancerígeno.

40 Preferiblemente Z es un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste de un agente de interrupción vascular (preferiblemente diferente a X), un antimetabolito (por ejemplo 5-fluorouracilo), un agente citotóxico o antiproliferativo (por ejemplo antraciclina (por ejemplo doxorubicina), alcaloides Vinca, taxano, nucleótido citotóxico),

un biotoxina, producto radioterapéutico, agente hormonal o cualesquier productos o agentes naturales conocidos por inducir un efecto citotóxico, citostático, anti-angiogénico o de interrupción vascular.

En un aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (VIII)

X-a-Y-Z (VIII)

5 en donde X, a, Y y Z son como se define aquí.

En un aspecto muy preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (IX)

X-a-Y-b-Z (IX)

10 en donde X, a, Y, b y Z son como se define aquí. En este aspecto de la invención, el propósito del separador b es la de convertir la amina de terminal N de Y en un ácido carboxílico para permitir la unión de un compuesto Z en donde Z lleva una amina libre (por ejemplo, cuando Z es doxorubicina). Cuando Z lleva un ácido carboxílico libre, no se requiere b.

En una realización preferida de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (VII) en donde X es colchicina (o un análogo de la misma) y Z es doxorubicina. Preferiblemente aún Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg- Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-.

15 La extensión de la protección incluye productos falsificados o fraudulentos que contienen o indican contener un compuesto de la invención con independencia de si, de hecho, contienen dicho compuesto y con independencia de si cualquiera de tales dichos están contenidos en una cantidad terapéuticamente efectiva.

20 Se incluyen en el alcance de la protección paquetes que incluyen una descripción o instrucciones que indican que el paquete contiene una especie o formulación farmacéutica de la invención y un producto que es o comprende, o pretende ser o comprender, dicha formulación o especies. Dichos paquetes pueden ser, aunque no necesariamente, falsificados o fraudulentos.

Un aspecto adicional de esta descripción proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con la invención, el proceso comprende las etapas de

i) proporcionar un soporte sólido unido a X;

25 ii) unir opcionalmente un ligador al terminal C o N de X;

iii) adherir residuos de aminoácidos por etapas al terminal C o N de X, o el ligador adherido a X en (ii), para proporcionar la secuencia de péptidos Y que contiene la secuencia de división proteolítica de MMP;

30 iv) opcionalmente adherir un grupo terminal C al respectiva terminal de C o N respectivo de Y para proporcionar un compuesto de fórmula (II) o (IV). En un proceso preferido el soporte sólido es cualquier soporte polimérico tal como cualquier resina con base en poliestireno basado o con base en PEG, por ejemplo, resinas a base de tritilo.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un sitio de división proteolítica de MMP en la activación específica de sitio de un VDA. El término "sitio de activación específica", como se utiliza aquí significa, en términos generales y no se limita a, la activación de un VDA por el sitio de división específico en el sitio de división proteolítica de MMP. Se espera que el sitio de división específico en el sitio de división proteolítica tenga lugar simultáneamente con la liberación y, por tanto, la activación de la VDA.

Composiciones farmacéuticas y usos

40 En otros aspectos, la invención proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describió anteriormente, para uso en medicina. En aspectos adicionales, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto como se describió anteriormente. La formulación puede contener por lo menos un componente farmacéuticamente aceptable adicional, por ejemplo un excipiente, diluyente o portador. Preferiblemente, la formulación está destinada para administración parenteral.

La invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención. En una realización, el compuesto es de fórmula (VII).

En un aspecto preferido de la invención dicha composición incluye un portador farmacéuticamente aceptable o diluyente.

Las composiciones de la invención normalmente se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" es aquella cantidad de una composición que sola, o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada. Cuando se administran, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de forma rutinaria de sal, agentes reguladores, conservantes, portadores compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos (por ejemplo, cisplatino, carboplatino; ciclofosfamida; melfalán; carmustina; metotrexato; 5-fluorouracilo; citarabina; mercaptopurina; daunorrubicina; doxorubicina; epirubicina; vinblastina; vincristina; dactinomicina, mitomicina C, taxol; L-asparaginasa; G-CSF; etopósido; mesilato de deferoxamina;; colchicina y camptotecina).

Las composiciones de la invención se pueden administrar por cualquier ruta convencional, que incluye inyección o por infusión gradual en el tiempo. La administración puede, por ejemplo, ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica. En el caso de tratamiento de una enfermedad particular, tal como cáncer, la respuesta deseada es inhibir la progresión de la enfermedad. Esto puede implicar sólo ralentizar la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferiblemente, implica la detención de la progresión de la enfermedad de forma permanente. Esto se puede monitorizar por métodos de rutina conocidos en la técnica.

La administración de las composiciones a mamíferos distintos a los humanos, (por ejemplo para propósitos de prueba o con propósitos terapéuticos veterinarios), se lleva a cabo bajo sustancialmente las mismas condiciones como se describió anteriormente. Un sujeto, como se utiliza aquí, es un mamífero, preferiblemente un humano, e incluye un primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden combinar, si se desea, con un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza aquí significa uno o más rellenos compatibles sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para administración en un humano. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes reguladores adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal. Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como jarabe, elixir o una emulsión.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación se puede formular de acuerdo con métodos conocidos utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente parenteralmente aceptable o disolvente no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio solvente o de suspensión. Para este propósito se puede utilizar aceite fijo suave incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se pueden utilizar en la preparación de inyectables. La formulación de portador adecuada para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

En un aspecto de la invención, se pueden utilizar los compuestos de acuerdo con la invención para tratar una enfermedad o afección asociada con tejido que expresa una MMP, particularmente un cáncer.

La invención proporciona un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto el método comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la invención. En un uso preferido el sujeto es humano.

5 Como se utiliza aquí, el término 'cáncer' se refiere a células que poseen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento celular de rápida proliferación. Se entiende que el término incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de  
 10 invasividad. El término "cáncer" incluye enfermedades malignas de origen epitelial, endodérmico y mesenquimal, particularmente carcinomas y sarcomas, tales como aquellos que afectan al sistema respiratorio (boca, nariz, tráquea, pulmón), tracto gastrointestinal (lengua, esófago, estómago, intestino delgado, colon, hígado, páncreas, vesícula biliar, recto), sistema endocrino (tiroides, hipófisis, glándulas suprarrenales), tracto genitourinario (vejiga urinaria, riñón), sistema reproductivo (mama, ovarios, útero, cuello uterino, próstata, pene, escroto, testículos), piel (melanocitos, epidermis, endodermis), sistema nervioso (cerebro, médula espinal, células gliales, neuronas) y el sistema linfoide.

15 El término "carcinoma" es reconocido en la técnica y se refiere a enfermedades malignas de origen epitelial, que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema endocrino, carcinomas del tracto genitourinario, carcinomas de piel, y carcinomas del sistema reproductivo. El término "carcinoma" también incluye "adenocarcinomas", que se refieren a los carcinomas derivados de tejido glandular, "carcinomas epidermoides", en referencia a los carcinomas de origen epidermoide, y "carcinosarcoma", en referencia a tumores compuestos de tejido carcinomatoso y sarcomatoso. Ejemplos de carcinomas incluyen aquellos que se forman de los epitelios del cuello uterino, próstata, mama, nariz, cabeza y cuello, cavidad oral, esófago, estómago, hígado, páncreas, colon, ovario, vejiga urinaria y pulmón, particularmente carcinoma no microcítico de  
 20 pulmón.

25 El término "sarcoma" es reconocido en la técnica y se refiere a enfermedades malignas de los tejidos blandos o el tejido conjuntivo o de apoyo, que incluyen hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo liso, músculo esquelético, vaina del nervio, vasos sanguíneos, mesotelio, y estroma gastrointestinal. Otros tipos de cáncer incluyen "leucemias" que se refieren a tumores derivados de células blancas de la sangre, y "linfomas", refiriéndose a los tumores del sistema linfoide.

30 Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención se puede administrar en combinación, ya sea de forma secuencial o en un tiempo similar posteriormente, como un agente anticancerígeno que incluye, pero no se limita a, un antimetabolito (por ejemplo 5-fluorouracilo), un agente citotóxico o antiproliferativo (por ejemplo antraciclina, alcaloides Vinca, taxano, nucleótido citotóxico), una biotoxina, producto radioterapéutico, agente hormonal o cualesquier productos o agentes naturales conocidos por inducir un efecto citotóxico, citostático, anti-angiogénico o de interrupción vascular.

35 Como se utiliza aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula que se va a tratar, y se puede llevar a cabo para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica.

40 En un aspecto adicional la invención proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.

45 En un aspecto de la presente invención se pueden utilizar los compuestos o composiciones de la invención para tratar un trastorno inflamatorio y/o una respuesta inflamatoria. De esta manera, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la invención.

50 El trastorno inflamatorio se puede seleccionar del grupo que consiste de que consiste de aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis, gota, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, poli- y dermatomiositis, vasculitis, tendinitis, sinovitis, endocarditis bacteriana, periodontitis, osteomielitis, psoriasis, neumonía, alveolitis fibrosante, bronquitis crónica, bronquiectasia, enfisema, silicosis, neumoconiosis, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre y miastenia gravis, mastitis, laminitis, laringitis, colecistitis crónica, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad inflamatoria de mama. En una realización, el trastorno inflamatorio puede ser el resultado del rechazo de tejidos o de órganos después de trasplante. En realizaciones particulares, el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste de aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis, sepsis y poliartritis.

55 Se pueden utilizar los compuestos de la invención para tratar falla cardiaca. También se proporciona un uso de un compuesto como se describe aquí para la fabricación de un medicamento para tratar falla cardiaca.

En una realización de la presente invención los compuestos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de una herida (por ejemplo úlceras, lesiones cutáneas, que incluyen cortes o quemaduras). De esta manera la



invención proporciona un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para tratar una herida en un sujeto, el tratamiento comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la invención. En un método preferido de la invención dicho sujeto es humano.

5 También se pueden utilizar los compuestos de la invención para tratar afecciones y trastornos asociados con menstruación.

Además, se proporciona un paquete o kit de partes que comprende:

(1) un compuesto o composición descrita aquí; junto con

(2) instrucciones para utilizar el compuesto en un método o uso descrito aquí.

10 El paquete definido aquí puede comprender más de una unidad de dosificación con el fin de proporcionar una dosificación repetida. Si más de una unidad de dosificación está presente, dichas unidades pueden ser iguales, o pueden ser diferentes en términos de dosis de la composición de compuesto y/o forma física.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta especificación, los términos “comprenden” y “contienen” y variaciones de las palabras, por ejemplo “que comprende” y “comprende”, significa “que incluyen, pero no se limitan a”, y no pretende (y no lo hace) excluir otras unidades estructurales, aditivos, componentes, enteros o etapas.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se utiliza el artículo indefinido, la especificación se debe de entender como contemplando la pluralidad así como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

20 Los rasgos, enteros, características, compuestos, unidades estructurales químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito aquí a menos que sean incompatibles con los mismos.

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo solo con referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 es una gráfica que muestra el metabolismo del profármaco-1 versus tiempo en tejidos de tumor y no tumor ex vivo;

25 La Figura 2 es una gráfica que muestra la acumulación y niveles de profármaco-1 en un ratón que tiene tumor luego de administración intraperitoneal;

La Figura 3 es una gráfica que demuestra los niveles de VDA que se acumulan luego de administración intraperitoneal del profármaco-1 a ratones que tienen tumor;

30 La Figura 4 es una gráfica que muestra el metabolismo diferencial del profármaco-2 en homogenatos de tumor que expresan altos niveles de MT1-MMP (HT1080) versus homogenatos de tumor que expresan bajos niveles de MT1-MMP (MCF-7);

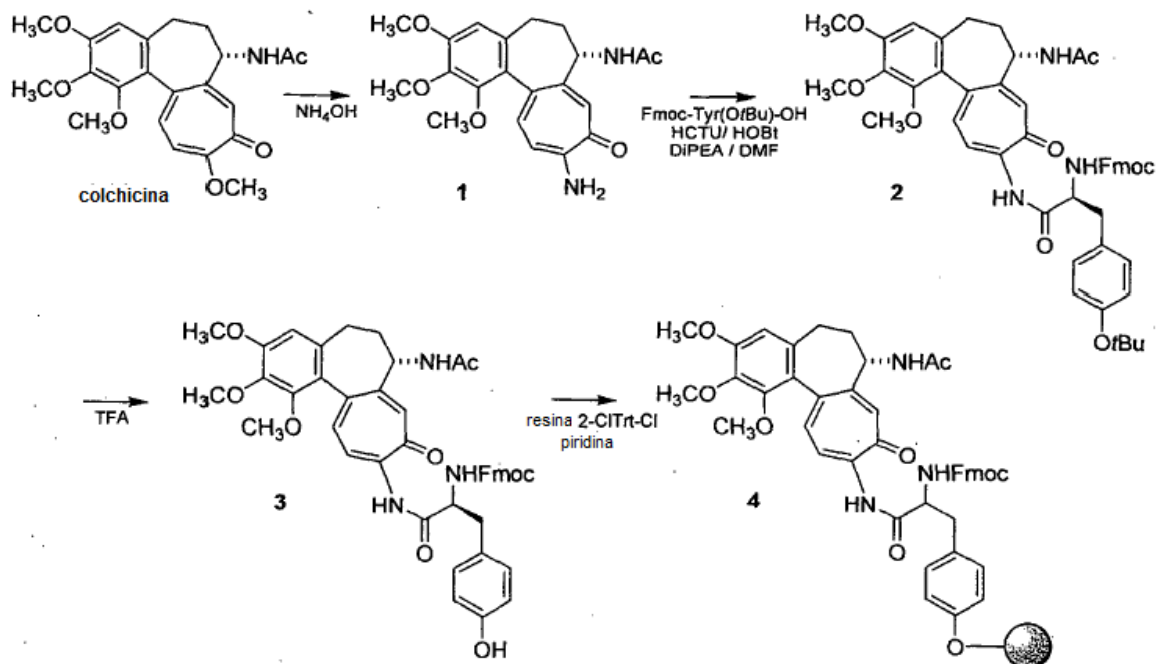
La Figura 5 es una gráfica que muestra acumulación y niveles de profármaco-2 en ratones que tienen tumor HT1080 luego de administración intraperitoneal;

La Figura 6 es una gráfica que demuestra niveles de VDA que se acumulan luego de administración intraperitoneal del profármaco-2 a ratones que tienen tumor HT1080.

## 35 EJEMPLO

Materiales y métodos

Síntesis de derivado de colchicina inmovilizado



## Síntesis de 1:

Se agrega solución de amoníaco (35%, 15 mL) a colchicina (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 eq) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. El producto crudo se lava con  $\text{KHSO}_4$  (1 M, aq), se seca con  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y se concentra bajo presión reducida. Se purifica posteriormente mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (elución de gradiente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /metanol 95:5 a 10:1) para dar 1 como un sólido amarillo (427 mg, 1.11 mmol, 59%).

$^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), 7.99 (1 H, amplio s, NH), 7.56 (1 H, d, J 2.1, C8-H), 7.32 (1H, d, J 10.7, C11-H), 6.88 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 6.52 (1 H, s, C4-H), 6.03 (2 H, amplio s,  $\text{NH}_2$ ), 4.68 (1 H, ddd, J 12.6, 6.5 y 6.5, C7-H), 3.93 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.60 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.47 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5- $\text{CH}_2$ ), 2.35 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5- $\text{CH}_2$ ), 2.29-2.23 (1 H, m, C6- $\text{CH}_2$ ), 1.98 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.90-1.88 (1 H, m, C6- $\text{CH}_2$ ); ES m/z (%) 385 [ $\text{M}^+ + \text{H}$ ] (100).

## Síntesis de 2:

Se agregan HCTU (642 mg, 1.55 mmol, 1.50 eq) y diisopropiletilamina (DiPEA, 516  $\mu\text{L}$ , 404 mg, 3.11 mmol, 3.00 eq) a una solución de Fmoc-tyr(tBu)-OH (714 mg, 1.55 mmol, 1.50 eq) en DMF (10 mL). Después de agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos, se agrega 1 (398 mg, 1.04 mmol, 1.00 eq) a la solución. La mezcla de reacción se agita a 50° C durante 22h. El DMF se elimina en vacío y el aceite resultante se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). La fase orgánica se lava con  $\text{KHSO}_4$  (ac., 2 x 20 mL), se seca con  $\text{MgSO}_4$  y se concentra bajo presión reducida. El producto crudo se purifica mediante cromatografía flash (elución de gradiente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /metanol 100:0 a 99:1 a 98:2) para dar 2 como un sólido amarillo (530 mg, 642  $\mu\text{mol}$ , 67%).

$^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), 10.42 (1 H, amplio s, NH), 9.02 (1 H, d, J 10.7, C11-H), 7.75 (2 H, d, J 7.2, C23-H, C24-H), 7.54 (2 H, d, J 7.2, C20-H, C27-H), 7.45 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 7.39 (2 H, dd, J 7.2 y 7.2, C22-H, C25-H), 7.29 (2 H, dd, J 6.6 y 6.6, C21-H, C26-H), 7.19 (1H, amplio s, C8-H), 7.03 (2 H, d, J 7.9, C14-H, C17-H), 6.81 (2 H, d, J 7.9, C15-H, C16-H), 6.50 (1 H, s, C4-H), 5.88 (1 H, amplio s, NH), 5.25 (1 H, amplio s, C12-H), 4.73-4.67 (1 H, m, C7-H), 4.43 (1 H, dd, J 10.0 y 7.6, C18- $\text{CH}_2$ ), 4.28 (1 H, dd, J 10.0 y 7.2, C18- $\text{CH}_2$ ), 4.16 (1 H, dd, J 7.2 y 6.19, C19-H), 3.93 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.62 (3 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.21 (1 H, dd, J 13.1 y 4.8, C13- $\text{CH}_2$ ), 3.11 (1 H, dd, J 13.1 y 5.5, C13- $\text{CH}_2$ ), 2.53 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5- $\text{CH}_2$ ), 2.40 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5- $\text{CH}_2$ ), 2.22-2.15 (1 H, m, C6- $\text{CH}_2$ ), 1.88 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.80 (1 H, ddd, J 11.5, 11.3 y 6.9, C6- $\text{CH}_2$ ), 1.22 (9 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); ES m/z (%) 826 [ $\text{M}^+$ ] (100).

## Síntesis de 3:

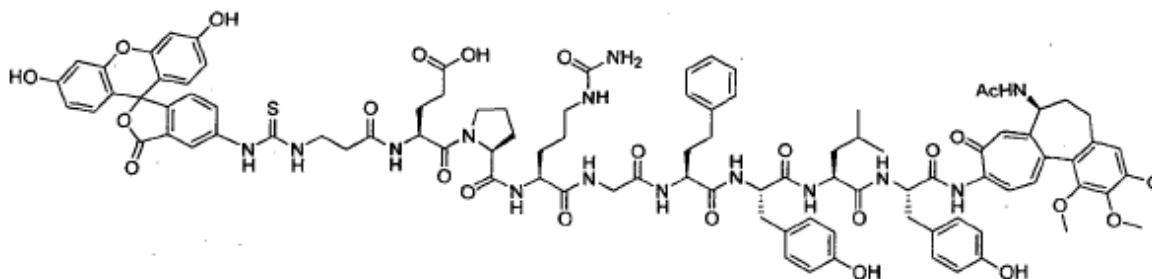
Se agrega TFA (2 mL) a una solución de 2 (486 mg, 589  $\mu\text{mol}$ , 1.00 eq) y la mezcla de reacción se agita durante 20 min. El TLC indica conversión cuantitativa para el producto. El producto se concentra bajo presión reducida, con coevaporación con tolueno para dar 3 en rendimiento cuantitativo.

$^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), 10.08 (1 H, amplio s, NH), 8.99 (1 H, d J 10.7, C11-H), 7.71 (2 H, d, J 6.2, C23-H, C24-H), 7.55 (1 H, s, C8-H), 7.49 (2 H, dd, J 6.5 y 6.5, C20-H, C27-H), 7.41 (1 H, d, J 10.2, C10-H), 7.33 (2 H, dd, J 6.2 y 6.2, C22-H, C25-H), 7.26-7.21 (2 H, m, C21-H, C26-H), 6.91 (2 H, d, J 8.3, C14-H, C17-H), 6.56 (2 H, d, J 7.2, C15-H, C16-H), 6.45 (1 H, s, C4-H), 5.93 (1 H, amplio s, NH), 5.28 (1 H, s, NH), 4.95-4.90' (1 H, m, C12-H), 4.60 (1 H, ddd, J 11.7, 5.8 y 6.9, C7-H), 4.39 (1 H, dd, J 8.9 y 8.6, C18-CH<sub>2</sub>), 4.29-4.24 (1 H, m, C18-CH<sub>2</sub>), 4.12 (1 H, dd, J 6.9 y 6.9, C19-H), 3.90 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.54 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.08 (2 H, d, J 5.2, C13-CH<sub>2</sub>), 2.44 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5-CH<sub>2</sub>), 2.33-2.26 (1 H, m, C5-CH<sub>2</sub>), 2.15-2.09 (1 H, m, C6-CH<sub>2</sub>), 1.82 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.75-1.69 (1 H, m, C6-CH<sub>2</sub>); ES m/z (%) 770 [M<sup>+</sup>] (100).

#### Preparación de 4:

Resina de cloruro de 2-Clorotritilo (Novabiochem, malla 100-200 m, sustitución  $1.4 \text{ mmol g}^{-1}$ , 589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eq) se suspende en una solución de 3 (589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eq), dimetilaminopiridina (10 mg, 76.5  $\mu\text{mol}$ , 0.01 eq), DiPEA (247 mg, 1.913 mmol, 333  $\mu\text{L}$ , 2.50 eq) y piridina (241 mg, 3.061 mmol, 248  $\mu\text{L}$ , 4.00 eq) en THF (10 mL) y se agita durante 6 horas a 50° C. La resina posteriormente se filtra y se lava profundamente con THF. La resina luego se finaliza al lavar la resina cuidadosamente con metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{DiPEA}$  17:2:1, 100 mL). La resina 4 se seca durante la noche sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Peso de resina seca: 593 mg (carga 56%).

#### Procedimiento general para síntesis de profármacos activados con endopeptidasa



#### 5 fluo-bala-glu-pro-cit-gly-hof-tyr-leu-tyr-colch

Como un ejemplo, el conjugado de péptido 5 se sintetiza utilizando síntesis de péptido en fase sólida convencional, a partir de derivado de colchicina inmovilizado 4, utilizando una estrategia con base en Fmoc.

Se logran ácidos de síntesis de péptido de estrategia  $\text{N}\alpha\text{-Fmoc}$  manualmente utilizando resina derivada de 2-clorotritilo 4. La resina se hincha profundamente en DMF, seguido por eliminación del grupo protector  $\text{N-Fmoc}$  mediante tratamiento con 20% v/v de piperidina en DMF (3 x 3 min). Todos los acoplamientos se realizan en DMF, empleando 2.5 veces de exceso molar de aminoácidos protegidos de  $\text{N}\alpha\text{-Fmoc}$  (con grupos de protección de cadena lateral apropiados), y activados utilizando HCTU/HOBt/DiPEA. Se realizan desprotecciones de  $\text{N}\alpha\text{-Fmoc}$  utilizando 20% de piperidina en DMF (3 x 3 min). El éxito de acoplamientos y desprotecciones se monitoriza utilizando la prueba de Kaiser con basr rn ninhidrina. Se repiten los acoplamientos no exitosos. Después de la desprotección de  $\text{N}\alpha\text{-Fmoc}$  final, la cadena de péptido se finaliza con isotiocianato de fluoresceína (2.50 eq, en la presencia de DiPEA, 1.50 eq). El éxito de esta reacción también se monitoriza por la prueba de Kaiser.

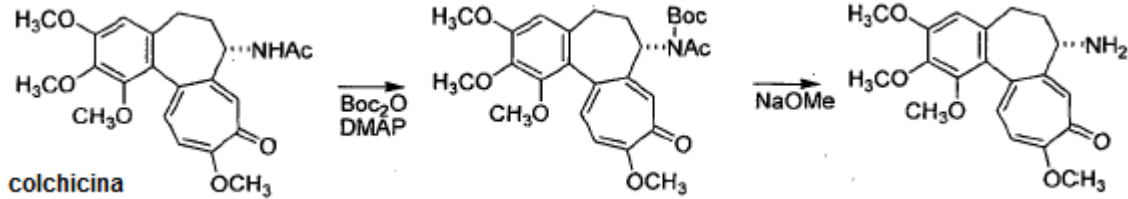
Un residuo de  $\beta$ -alanina adicional se incorpora en la secuencia para superar la incompatibilidad del enlace de tiourea y las condiciones ácidas de la división (la tiourea se puede reorganizar, y el carbono carbonilo del enlace amida anterior se puede someter a ataque nucleófilo por la función similar sulfhidrilo así formada. Esto conduce a la división del enlace amida, con la formación concomitante de una tiazolinona cíclica. LA tiazolinona se puede someter a redistribución en presencia de ácido acuoso para formar una tiohidantoína).

Sobre la terminación de la secuencia, la resina se lava (DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) y se seca en vacío sobre KOH a peso constante. Los péptidos se dividen a partir de la resina mediante acidólisis leve utilizando TFA- $\text{H}_2\text{O}$  - triisopropilsilano 95:2.5:2.5 durante 2 h a temperatura ambiente, con desprotección de cadena lateral simultánea. Luego de división, el TFA se elimina bajo presión reducida. El producto crudo se extrae en 95% ácido acético acuoso y se liofiliza. El péptido crudo se analiza posteriormente utilizando HPLC de fase inversa y se purifica utilizando HPLC preparativo (pureza >97%). Las fracciones puras se combinan y se liofilizan. Se confirma la identidad mediante espectrometría de masas.

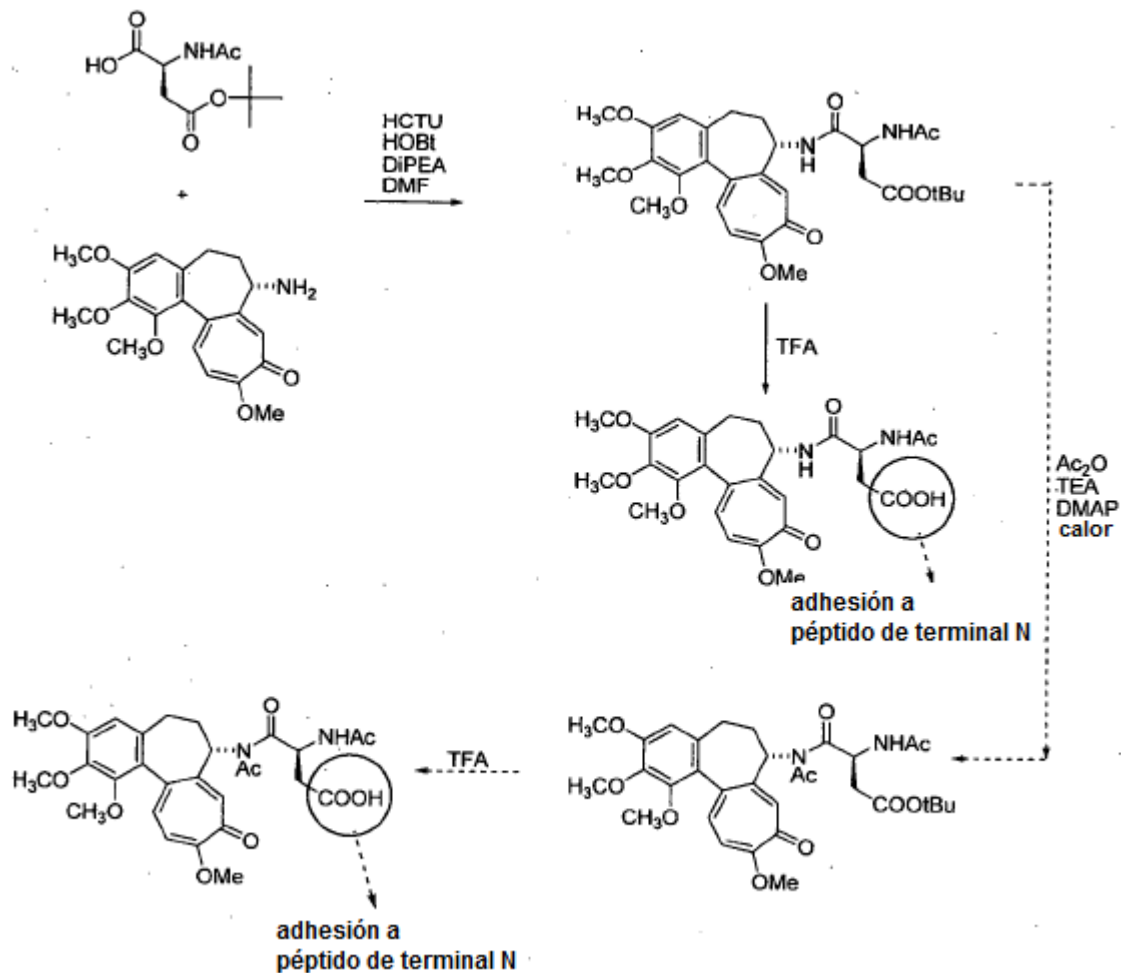
Adhesión potencial de la colchicina progenitora a una secuencia de péptidos es a través del anillo B

Para permitir la adhesión de una unidad estructural de colchicina a través del péptido de terminal N, se utilizará la siguiente estrategia. La amina de anillo B se puede desenmascarar utilizando métodos publicados. La acilación con ácido aspártico introducirá un ácido carboxílico en la molécula (desde la cadena lateral de aminoácido) lo que permite la conjugación con la amina libre en el péptido de terminal N (véase adelante).

5



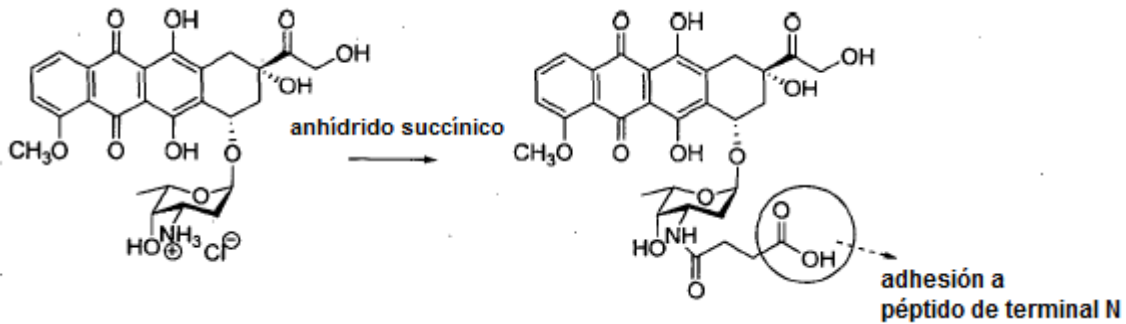
También se examinará la acetilación del enlace de amida, para evaluar si la colchicina progenitora se libera después de activación de MMP y posterior degradación de exopeptidasa.



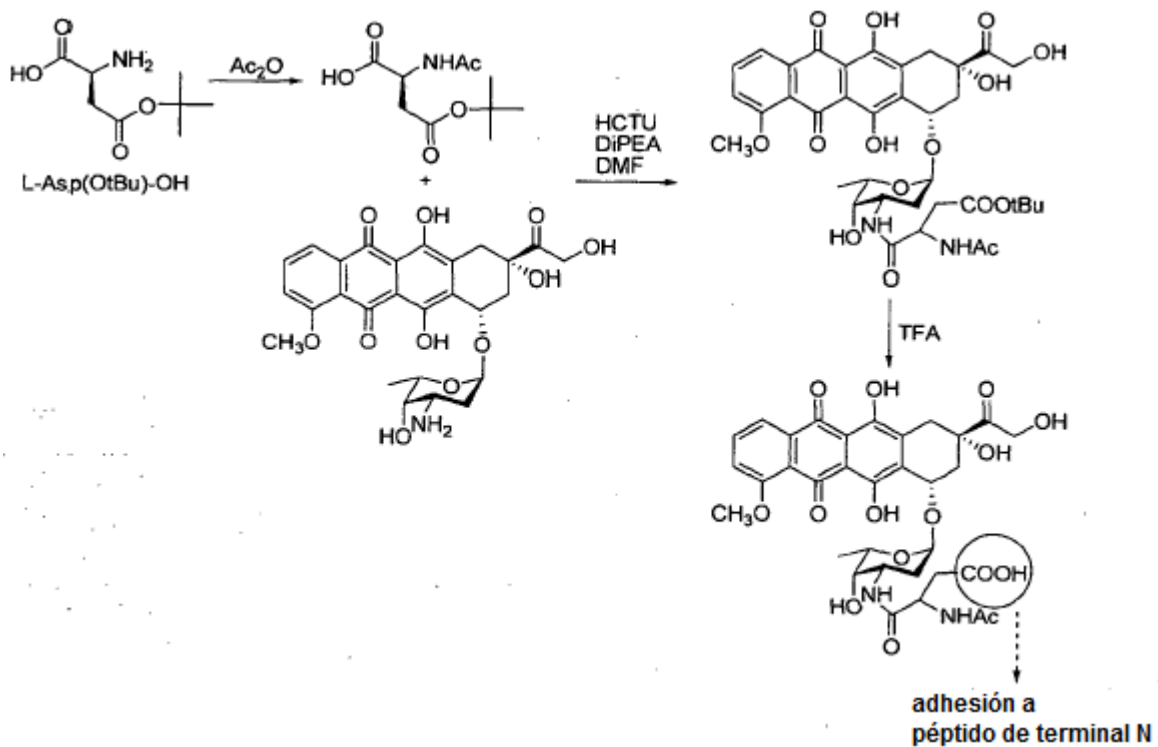
Estrategias para adhesión de doxorubicina a una secuencia de péptidos

- 10 Para permitir la adhesión de doxorubicina a través del péptido de terminal N (siguiendo la síntesis de péptidos utilizando la resina derivada de colchicina inmovilizada descrita anteriormente) primero se debe modificar para introducir un ácido carboxílico. Ejemplos incluyen reacción con anhídrido succínico (estrategia 1, adelante). Sin embargo, al utilizar la cadena lateral de ácido aspártico (ambos aminoácidos naturales), como se muestra adelante (estrategia 2) un aminoácido natural (en oposición a una entidad química extraña) se libera sobre el metabolismo:

- 15 Estrategia 1: (separador de succinilo)



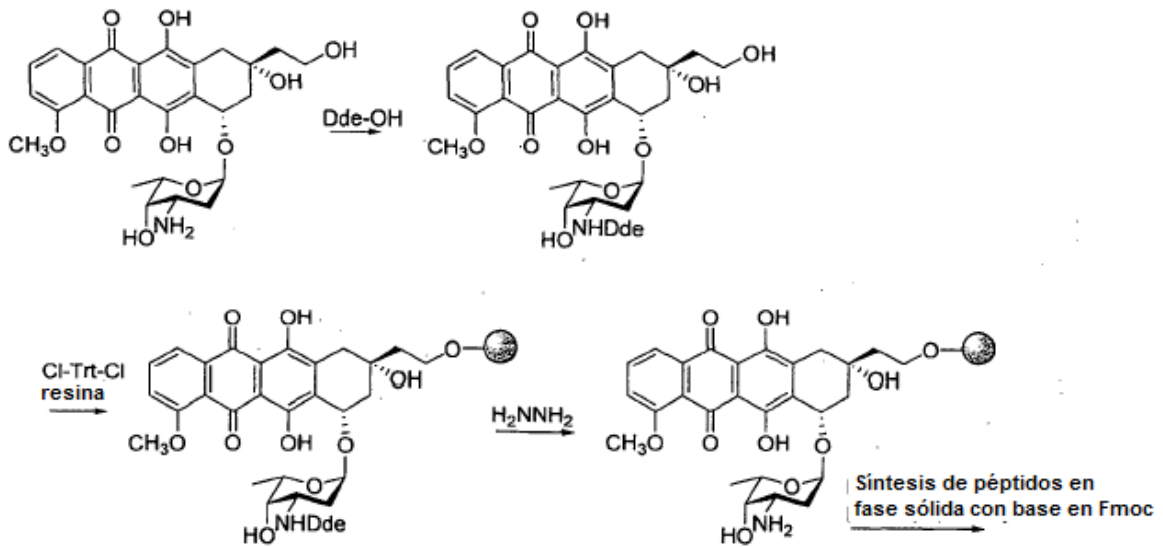
Estrategia 2: (separador de aminoácidos)



5 Enlace de doxorubicina de terminal C

La protección del grupo amina de la doxorubicina con Dde (un grupo protector utilizado comúnmente en la química de péptidos y por nuestro grupo) permitiría la inmovilización del agente sobre una resina a base de tritilo (o lo contrario). La eliminación posterior del grupo Dde sería desenmascarar la amina, lo que permite que se construya una secuencia de péptidos a partir de este punto (es decir, a través del terminal C). La síntesis en fase sólida con base en Fmoc estándar produciría una secuencia de péptidos. Un VDA apropiadamente derivado podría luego ser conjugado a través del terminal N. La división de la resina y la purificación se describen como anteriormente.

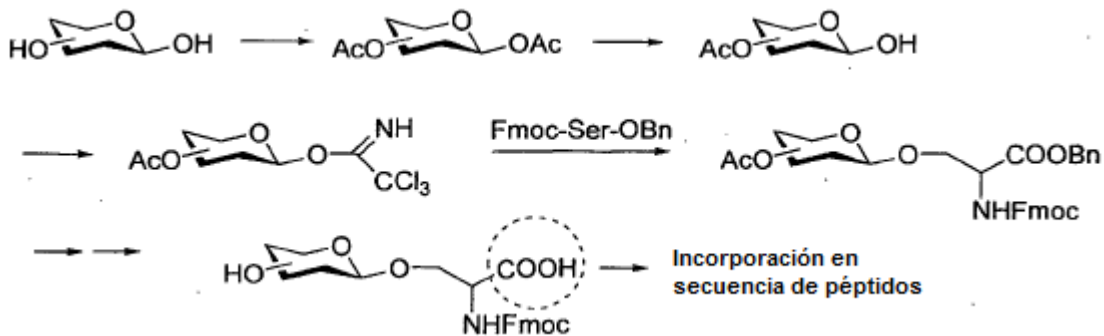
10



Incorporación de aminoácidos glicosilados (para mejorar las propiedades fisicoquímicas)

Los aminoácidos con funcionalidad de la cadena lateral apropiada (por ejemplo, serina, tirosina, treonina) se pueden glicosilar (con mono-, di- o trisacáridos) para producir péptidos con solubilidad acuosa mejorada. Dicha unidad estructural derivada de carbohidrato se podría utilizar en lugar de serina, por ejemplo (véase el esquema adelante).

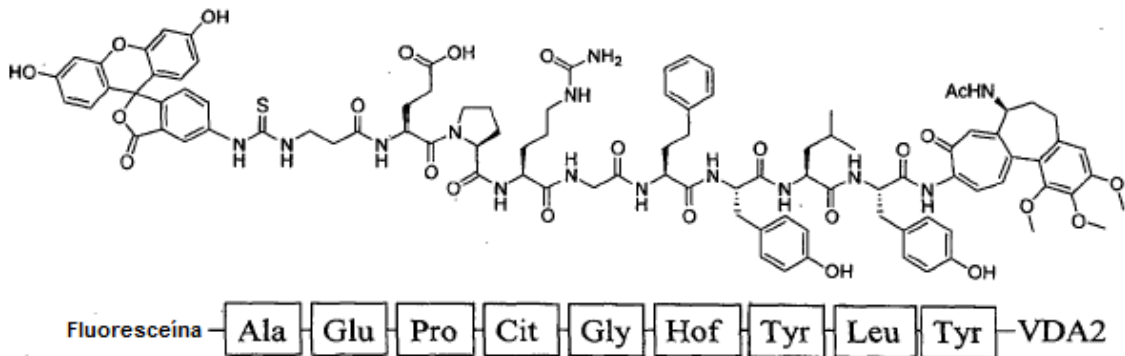
5



Resultados

1) Profármaco activado con MMP (compuesto i) - pan MMP dirigido

Estructura:



10

(Hof = homofenilalanina; Cit = citrulina)

a) El Profármaco-1 se ha cribado utilizando plasma de ratón normal, homogenato de hígado normal de ratón y homogenato de modelo de tumor humano experimental (xenoinjerto HT1080; conocido por expresar la mayoría de MMPs) ex vivo. La división del profármaco y el metabolismo se detectaron utilizando LC/MS/MS.

5 a. El Profármaco-1 era estable en el plasma e hígado, soportando la estabilidad sistémica de estos productos terapéuticos (Figura 1).

b. El Profármaco-1 se metabolizó en homogenato de tumor, soportando la activación de estos productos terapéuticos en los tumores que expresan MMPs (Figura 1).

10 b) El Profármaco-1 se dividió rápidamente a la glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) mediante por lo menos MMP-2, MMP-9, MMP-10 y MMP-14 recombinante. Demostrado por LC/MS/MS y espectrometría de masas (datos no mostrados)

c) El Profármaco-1 se administró en vivo a través de la ruta intraperitoneal a ratones que llevan modelo de tumor HT1080 subcutáneo (expresión de la mayoría de las MMP). Se recogieron plasma, tejidos y tumores a intervalos regulares de dosificación posterior. Los niveles de profármaco y VDA2 se evaluaron mediante LC/MS/MS.

a. El Profármaco-1 se acumuló y se detectó en todos los tejidos analizados (Figura 2).

15 b. se observaron niveles más altos de profármacos-1 en el tumor (Figura 2).

c. Profármaco-1 no detectable después de 24 horas después de dosificación. (Figura 2)

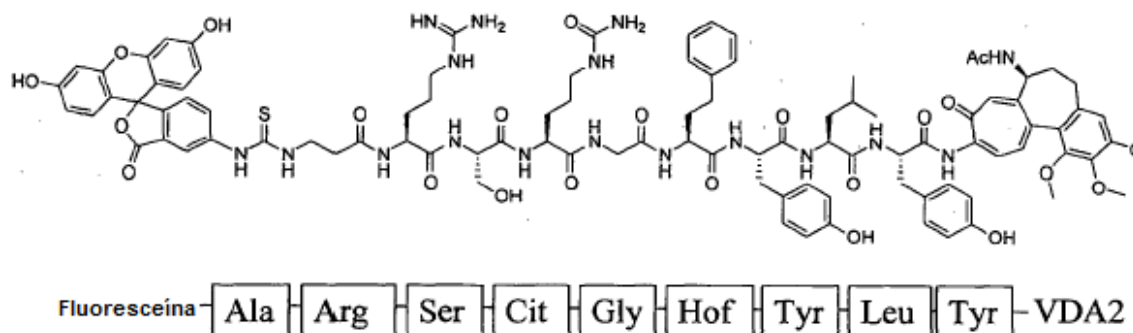
d. El VDA2 era detectable en niveles bajos en tejidos normales luego de administración del profármaco-1 (Figura 3)

e. Los niveles VDA2 se detectaron en altos niveles en el tejido tumoral luego de administración de profármaco-1 (Figura 3)

20 f. El VDA2 todavía era detectable en niveles elevados en el tumor y fue indetectable en tejidos normales después de 24 horas después de dosis con profármaco-1 (Figura 3)

2) Profármaco activado con MMP (compuesto i) objetivado a MMPs de tipo membrana(MT-MMP)

Estructura:



25 d) El compuesto 1 se modificó con el fin de cambiar la MMP-dirigida del compuesto de ser pan-MMP a MT-MMP selectiva (profármaco-2)

a. La arginina se incorporó en lugar del ácido glutámico en la posición P4

b. La Prolina se eliminó y reemplazó con serina en la posición P3

30 e) El Profármaco-2 se ha filtrado utilizando plasma de ratón normal, homogenato normal de hígado de ratón y homogenatos de modelo de tumor humano experimentales que demuestran alta expresión de MT1-MMP (MMP-14) y actividad (HT1080) y baja expresión y actividad de MT1-MMP (MCF-7) ex vivo. La división del profármaco-2 y el metabolismo se detectaron utilizando LC/MS/MS.

- a. El Profármaco-2 permaneció intacto en el plasma soportando la estabilidad sistémica de este producto terapéutico.
- b. El Profármaco-2 se mantuvo estable en homogenatos de hígado de murino
- 5 c. El Profármaco-2 se metabolizó rápidamente en homogenato de tumor que expresa altos niveles de MT-MMP (HT1080) en relación con homogenato de tumor que expresa bajos niveles de MT-MMP (MCF7) (Figura 4).
- d. Estos datos apoyan la estabilidad sistémica de este profármaco y la selectividad de activación por MT-MMP.
- f) El Profármaco-2 se divide diferencialmente por MMPs como se muestra por LC/MS/MS y espectrometría de masas (datos no mostrados)
- a. Se divide rápidamente a glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) por MMP-14 recombinante.
- 10 b. Se divide lentamente en la homofenilalanina-tirosina (Hof-Tyr) mediante MMP-2 recombinante. Demostrando diferente división a aquella observada con profármaco-1.
- c. El Profármaco-2 no se dividió por la MMP-9 recombinante, en contraste con el profármaco-1
- d. Estos datos apoyan la división selectiva de MMP del profármaco 2
- 15 g) El Profármaco-2 se administró in vivo a través de la ruta intraperitoneal a ratones con modelo de tumor HT1080 subcutáneo (MT1-MMP positivo). Se recogieron plasma, tejidos y tumores a intervalos regulares después de dosificación. Los niveles de profármaco-2 y VDA2 se evaluaron mediante LC/MS/MS.
- a. El Profármaco-2 se acumuló y detectó en todos los tejidos analizados (Figura 5).
- b. Se observaron más altos niveles de profármacos-2 en el tumor (Figura 5).
- c. El hígado fue representativo de todos los tejidos normales analizados. (Figura 5)
- 20 d. El VDA2 fue indetectable en plasma luego de administración de profármaco-2 (Figura 6)
- e. Se detectaron altas concentraciones de VDA2 en el tumor luego de administración del profármaco-2 (Figura 6)
- f. Los niveles de VDA2 en tumor eran 10 veces mayor que los detectados en tejidos normales después de administración de profármaco-2 (Figura 6)
- 25 g. Los altos niveles de profármaco-2 y VDA2 eran aún detectables en el tumor 48 horas después de administración posterior.

Listado de secuencias

- <110> University of Bradford
- <120> compuestos
- <130> 0459P/WO
- 30 <140> PCT/GB2008/001043
- <141> 2008-03-27
- <150> UK0707034.5
- <151> 2007-04-12
- <160> 5
- 35 <170> PatentIn version 3.3



<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (1)..(1)

10 <223> X es citrulina

<400> 1

**Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
**1 5**

<210> 2

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

20 <221> X

<222> (3)..(3)

<223> X es citrulina

<400> 2

**Glu Pro Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
**1 5**

25 <210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (3)..(3)

5 <223> X es citrulina

<400> 3

**Arg Ser Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
**1 5**

<210> 4

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

15 <221> X

<222> (4)..(4)

<223> X es citrulina

<400> 4

**Ala Glu Pro Xaa Gly Phe Tyr Leu Tyr**  
**1 5**

20 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<220>

<221> X

<222> (4)..(4)

<223> X es citrulina

<400> 5

Ala Arg Ser Xaa Gly Phe Tyr Leu Tyr  
1 5

**REIVINDICACIONES**

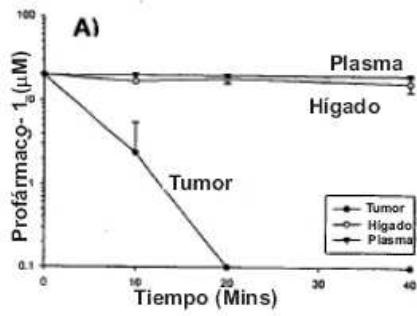
1. Un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un agente de interrupción vascular (VDA) que es un agente anticancerígeno ligado a un péptido que comprende un sitio de división proteolítica de matriz de metaloproteinasa (MMP) que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el compuesto es de fórmula (I)
- X – Y (I)
- en donde
- X es el VDA; y
- Y es el sitio de división proteolítica de MMP.
- 10 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el VDA tiene efecto citostático o citotóxico.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el VDA es
- i) un análogo de colchicina, colchicina, combretaestatina, fenestatina, podofilotoxina, esteganacina, amfetinila, estilbena o flavonoide, o
- ii) una vincristina, vinblastina, vinflunina, maitansinoide, phomopson A, rizoxina, auriestatina, auriestatina análogo o dolaestatina.
- 15 5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un grupo de terminación de cadena sobre el péptido que comprende un sitio de división proteolítica de MMP que previene la degradación no específica del péptido.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto es de fórmula (II)
- 20 X-Y-c (II)
- en donde X es el VDA,
- Y es el sitio de división proteolítica de MMP y c es un grupo de terminación de cadena seleccionado de azúcares simples, D-aminoácidos, ácidos de prolina imino, fluoresceína o derivados de fluoresceína.
- 25 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde un agente anticancerígeno adicional se liga al péptido que comprende un sitio de división proteolítica de MMP.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el agente anticancerígeno adicional se selecciona del grupo que consiste de 5- fluorouracilo, antraciclina, doxorubicina, alcaloides Vinca, taxano y un nucleótido citotóxico, y preferiblemente en donde el agente anticancerígeno es doxorubicina.
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el compuesto es de fórmula (VII)
- 30 X-Y-Z (VII)
- en donde X es el VDA,
- Y es el sitio de división proteolítica de MMP y
- Z es el agente anticancerígeno.
- 35 10. Un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en medicina.
11. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y por lo menos un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable adicional.

12. Un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en un método para tratar cáncer, un trastorno inflamatorio, falla cardíaca o heridas.

13. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección seleccionada de cáncer, un trastorno inflamatorio, falla cardíaca y heridas.

5

Figura 1



Figuras 2 y 3

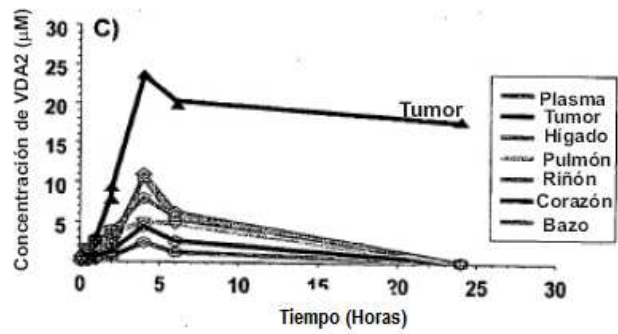
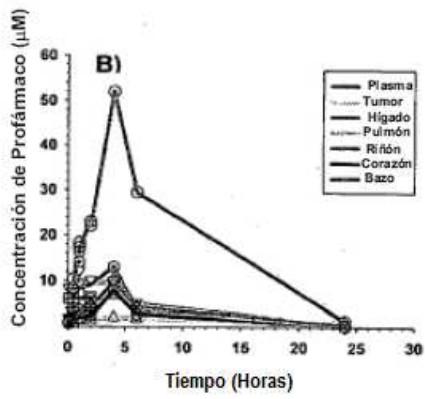
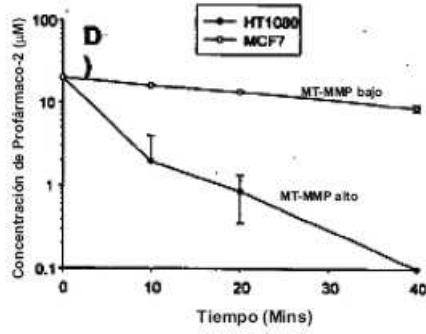


Figura 4



Figuras 5 y 6

