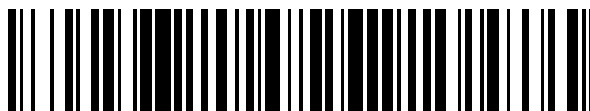


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 168**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/65** (2007.01)

**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 12160565 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018** **EP 2481429**

54 Título: **Secuencia de escisión específica de MMP-14**

30 Prioridad:

**12.04.2007 GB 0707034**

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

**25.09.2018**

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 2 683 168 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

Secuencia de escisión específica de MMP-14

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos que se activan in vivo a partir de compuestos relativamente inactivos biológicamente, los llamados "profármacos", a compuestos relativamente biológicamente activos. La invención también se refiere al uso de tales compuestos en el tratamiento específico de cáncer.

Antecedentes de la invención

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

15 El crecimiento del tumor, la 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 Cáncer, 5, 423-435 (2005)). Se ha demostrado que la interrupción de incluso una pequeña proporción de la vasculatura del tumor induce la muerte de gran rango del tumor y el retraso de la 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, unión, alineación y proliferación (Denekamp, J, Br J Cancer, 45, 136-139 (1982)). Los agentes que interrumpen la red de microtúbulos endoteliales causarían por lo tanto un colapso rápido en el flujo sanguíneo del tumor y un período prolongado de parada vascular, culminando en una extensiva necrosis de células tumorales (Tozer et al., Nat Rev Cáncer, 5, 423-435 (2005); Lippert JW, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007)).

25 La colchicina y sus análogos son potentes agentes disruptores vasculares (VDA) causando hemorragia y posterior necrosis extensiva en los tumores (Tozer et al., Nat Rev Cáncer, 5, 423-435 (2005)), como una consecuencia directa de la tubulina de unión y la inducción de la despolimerización de los microtúbulos (Chaudhry et al., J Mol Biol, 303, 679-692 (2000)). Sin embargo, la colchicina no muestra el valor intrínseco como terapéutico clínicamente aplicable al cáncer debido a un alto nivel de toxicidad y por consiguiente un índice terapéutico muy estrecho (Tozer et al, Nat Rev Cáncer, 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 VDA con potencial clínico, en particular ZD6126 (análogo de fosfato de N-acetil colquinol) y combretastatina-A4-fosfato (JW Lippert, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007) ), sin embargo, a pesar de mostrar la potencia en los ensayos de evaluación clínicos y preclínicos, se reportan para estos agentes tanto cardiotoxicidad como efectos indeseables sobre la vasculatura normal (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)). Albright C, Mol Cancer Ther, 4, 751-760 (2005) divulgan profármacos de doxorubicina activados por MMP. Nagase H, Biopolymers, 40, 399-316 (1996) divulga varias secuencias de péptidos escindibles por MMP. Los presentes inventores han desarrollado un sistema para superar el efecto tóxico de la administración sistémica de determinados agentes anticancerosos potentes tales como agentes disruptores vasculares.

Declaraciones de la invención

40 La invención, se refiere a un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un agente disruptor vascular (VDA) asociado con un sitio de escisión proteolítica MMP. El término "asociados con" en el contexto de la invención pretende incluir todos los medios directos e indirectos de asociación, en general, covalente, incluyendo, pero no limitado a, entrecruzamiento químico o enlace de unión peptídico. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos que comprende -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- como un sitio de escisión específico de MMP-14. La presente invención también proporciona un profármaco que comprende un compuesto biológicamente activo asociado con un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de MMP que comprende la secuencia de aminoácidos Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu.

50 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Además, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinotérreos o alcalinos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

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



donde

X puede ser un agente de interrupción vascular (VDA);

Y comprende un sitio de escisión proteolítica de metaloproteinasas de matriz (MMP).

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

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

10 Los VDA son compuestos que interactúan directamente con la tubulina y los 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 la tubulina en el sitio de unión de la colchicina sobre la tubulina;

(ii) aquellos compuestos que comparten un sitio de unión común en tubulina con los alcaloides de *Catharanthus (Vinca)*;

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

Así, en un aspecto preferido de la invención el VDA es un agente de unión a tubulina. El agente de unión a tubulina puede ser seleccionado del grupo que consiste en i) aquellos que interactúan con la tubulina en el sitio de unión de la colchicina: incluyendo pero no limitado a la colchicina (incluyendo análogos de la colchicina, tales como N-acetilcolchicol-O-fosfato (ZD6126) y ABT-751), colchicina, combretastatinas, fenstatina, podofilotoxinas, esteganalisis, anfetamina y estilbenos, y ii) los que interactúan con el sitio de unión Vinca de tubulina: incluyendo, pero no limitado a, vincristina, vinblastina, vinflunina, maitansinoides, phomopson A, rizoxina, auristatina (incluyendo análogos de los mismos) y dolastatina.

20 En un aspecto aún preferido de la invención el VDA es un agente de unión a tubulina que interactúa con el sitio de unión de la colchicina dentro de la tubulina.

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

30 El VDA puede incluir agentes de unión a tubulina incluyendo combretastatinas (por ejemplo, combretastatina A-4 3-O-fosfato), auristatina (incluyendo análogos de los mismos), dolastatina; y los flavonoides (por ejemplo, factor a de necrosis del tumor y ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), ácido acético de flavona (FAA)). Por lo tanto, en una realización alternativa de la invención, el VDA es una combretastatina.

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

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

Las MT-MMP pueden seleccionarse del grupo que consiste en

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

40 (ii) grupo estructural anclado a glicosilfosfatidilinositol (GPI) de MT-MMP, por ejemplo, la MMP-17 (MT4-MMP) y MMP-25 (MMP-MT6);

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

45 El sitio de escisión de MMP comprende una secuencia de péptidos que tienen un enlace peptídico que es escindible por una MMP. Y es una secuencia peptídica que comprende entre siete y veinte aminoácidos, por ejemplo entre siete y diez aminoácidos (por ejemplo 7 u 8 aminoácidos). Los aminoácidos de la secuencia de péptidos pueden incluir cualquiera D- de origen natural o sintético de aminoácidos D- o L-, preferiblemente L- o combinaciones de aminoácidos D- y L-.

La invención también incluye análogos peptídicos, por ejemplo péptidos miméticos, de la secuencia peptídica en la que, por ejemplo, un enlace amida se reemplaza por enlaces olefinicos, aminoácidos metilados con Na y C[alfa], aminoácidos no naturales y otros enfoques conocidos en la técnica. Tales enfoques peptidomiméticos se usan en la

técnica para potenciar la especificidad de la escisión, sirviendo de este modo para disminuir la hidrólisis enzimática no deseada.

5 En una realización preferida de la invención, el sitio de escisión proteolítica MMP comprende una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, 6 a 10 aminoácidos) en el que uno o más aminoácidos en la secuencia a saber, serina, treonina y/o tirosina están glicosilados para mejorar la hidrofobicidad y, como tal, la solubilidad. La O-glicosilación de aminoácidos adecuados en la secuencia a saber, serina, treonina y tirosina puede aumentar la hidrofobicidad y como tal la solubilidad. Preferiblemente, el sitio de escisión proteolítica MMP comprende 8 aminoácidos.

Los sitios de escisión proteolítica de MMP que se describen en este documento pueden comprender la secuencia

P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'

10 en la que P1 a P4 y P1' a P4', que pueden ser iguales o diferentes, son residuos de amino ácido y en donde la escisión proteolítica se lleva a cabo entre los residuos P1 y P1'. Preferiblemente P1 y P1' son diferentes. Preferiblemente todavía P1 a P4 son diferentes. Preferiblemente P1' a P4' son diferentes.

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

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

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

Como se describe en el presente documento el sitio de escisión proteolítica MMP comprende la secuencia de aminoácidos (ii)

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

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

Un sitio de escisión proteolítica MMP comprende la secuencia de aminoácidos (iii)

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

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

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

25 Una realización la invención comprende un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende un sitio C-terminal y un sitio de N-terminal y en el que dicho sitio C-terminal está directa o indirectamente enlazada a X y dicho sitio N-terminal está enlazado directa o indirectamente a una unidad estructural adicional, por ejemplo, C o Z como se describe en el presente documento a continuación.

30 Una realización alternativa de la invención comprende un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende un sitio C-terminal y un sitio de N-terminal y en el que dicho sitio de N-terminal está directa o indirectamente enlazado a X y dicho sitio C-terminal está directa o indirectamente enlazado a una unidad estructural adicional, por ejemplo, C o Z como se describe en el presente documento a continuación.

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

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

X-Y-c (II)

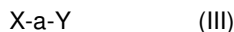
en la que X e Y son como se definen en el presente documento;

40 c es un grupo terminal o "grupo de protección". Los grupos de protección se pueden usar para tapar una cadena peptídica en uso farmacéutico con el fin de evitar la degradación no específica del péptido, por ejemplo, por enzimas distintas de MMPs. c puede incluir cualquier unidad estructural apropiada en N- o C-terminal que actúa como un grupo de bloqueo que incluye, pero sin limitarse a azúcares simples, D- aminoácidos, aminoácidos prolina o derivados de fluoresceína.

45 La presente invención puede proporcionar además un "enlazante". El enlazante puede proporcionarse en el terminal C y/o N de Y. Preferiblemente, el enlazante se proporciona en el terminal C de Y. Preferiblemente, el enlazante es continuo con la secuencia de aminoácidos de Y. El enlazante puede incluir cualquier unidad estructural que se asocia con y que puede ser eliminado químicamente, enzimáticamente o descomponerse espontáneamente. El enlazante puede constar de un solo aminoácido (por ejemplo tirosina) o puede comprender una secuencia de aminoácidos. Cuando el enlazante comprende una secuencia de aminoácidos, la secuencia puede proporcionar una región hidrófila

que puede facilitar la escisión por una MMP en Y. La O-glicosilación de aminoácidos adecuados en la secuencia a saber, serina, treonina y tirosina puede potenciar la hidrofiliidad y como tal la solubilidad.

Así, en un aspecto preferido de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (III)



5 en la que X e Y son como se definen en el presente documento; y

a es un enlazante en el que el enlazante está directamente o indirectamente asociada con X.

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



en la que X, A, Y y c son como se definen en el presente documento.

10 En un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un "separador", que puede ser el mismo o diferente del enlazante que se describe 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 asociada con Y. El separador puede incluir cualquiera de un solo aminoácido (por ejemplo,  $\beta$ -alanina), secuencia de aminoácidos, un grupo succinilo.

15 Así, la invención proporciona preferiblemente un compuesto de fórmula (V)



en la que X, Y, y c son como se definen en el presente documento;

b es un separador como se define aquí.

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

20  $X - a - Y - b - c \quad (VI)$

en la que X, Y, a, b y c son como se definen en el presente documento.

En una realización de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (VI) en la que X es la colchicina (o un análogo del mismo), 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 la fluoresceína o un derivado del mismo.

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



en la que X e Y son como se definen en el presente documento; Z es un agente anti-cáncer.

30 Preferiblemente, Z es un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en un agente de interrupción vascular (preferiblemente diferente a X), un antimetabolito (Eg5-fluorouracilo), un agente citotóxico o anti-proliferativa (egantiraciclina (por ejemplo doxo- rubicon ), alcaloide de la vinca, taxanos, citotóxica de nucleótidos), una biotoxinas, radioterapéutico, agente hormonal o cualquiera de los productos naturales o agentes conocidos por inducir un citotóxico, citostático, antiangiogénico o efecto de interrupción vascular.

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

35  $X - a - Y - Z \quad (VIII)$

en la que X, A, Y y Z son como se definen en el presente documento.

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



40 en la que X, A, Y, B y Z son como se definen en el presente documento. En este aspecto de la invención, el propósito del separador b es la de convertir la amina del N-terminal de Y en un ácido carboxílico para permitir la unión de un compuesto Z en la que Z tiene una amina libre (por ejemplo, donde Z es doxorubicina). Donde Z tiene un ácido carboxílico libre, no se requiere b.

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

El alcance de la protección incluye productos falsificados o fraudulentos que contienen o indican contenido de un compuesto de la invención con independencia de que de hecho contienen un compuesto y con independencia de que cualquiera de tales compuestos está contenido en una cantidad terapéuticamente efectiva tal.

5 Se incluyen en el ámbito de protección paquetes que incluyen una descripción o instrucciones que indican que el paquete contiene una formulación farmacéutica de la invención y un producto que comprende una formulación. Tales paquetes pueden ser, aunque no necesariamente, falsificados o fraudulentos.

Un aspecto adicional de la invención 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;

10 ii) unir opcionalmente un enlazante a al terminal C o N de X;

iii) unir residuos de aminoácidos por etapas al terminal C o N de X, o el enlazante unido a X en (ii), para proporcionar la secuencia del péptido Y que contiene la secuencia de escisión proteolítica MMP;

iii) unir opcionalmente un grupo c de protección al respectivo terminal de C o N de Y para proporcionar un compuesto de fórmula (II) o (IV).

15 En un procedimiento preferido el soporte sólido es cualquier soporte polimérico tal como cualquiera de poliestireno basado o resina a base de PEG, por ejemplo, resinas a base de tritilo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un sitio de escisión proteolítica MMP en la activación específica de un sitio de un VDA. El término "activación específica del sitio", como se usa en este documento significa, en términos generales y no se limita a, la activación de un VDA por la escisión específica del sitio en el sitio de escisión proteolítica MMP. Se espera que el sitio de escisión específica en el sitio de escisión proteolítica tenga lugar concomitantemente con la liberación y, por tanto, la activación del VDA.

20 Composiciones farmacéuticas y sus usos

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

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

30 En un aspecto preferido de la invención, dicha composición incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la invención se administran típicamente en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" es aquella cantidad de una composición que solo, 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. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes reguladores, conservantes, vehículos 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; colchicina; dermatitis mesilato de deferoxamina, y camptotecina).

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

45 La administración de las composiciones a mamíferos distintos de los seres humanos, (por ejemplo para fines de prueba o con fines terapéuticos veterinarios), se lleva a cabo bajo sustancialmente las mismas condiciones como se describe anteriormente. Un sujeto, como se usa en este documento, es un mamífero, preferiblemente un ser humano, e incluyendo un primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o reedor.

50

Quando 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 eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden combinar, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente documento significa una o más cargas compatibles sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias que son adecuadas para administración en un ser humano que encapsulan. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes reguladores adecuados, incluyendo: 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 pueden presentarse 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  
15 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 puede formularse 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  
20 inyectable estéril en un diluyente parenteralmente aceptable no tóxico o disolvente, por ejemplo, como una solución en 1, 3 diol-butano. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se puede emplear incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se pueden utilizar en la  
25 preparación de inyectables. La formulación del vehículo adecuado para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. Las administraciones se pueden encontrar en Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

En un aspecto de la invención, los compuestos según la invención se pueden usar para tratar una enfermedad o afección asociada con tejido que expresa una MMP, en particular un cáncer.

30 La invención proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con de la invención. En un método preferido de la invención dicho sujeto es humano.

Tal 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 caracterizada por un crecimiento celular de rápida proliferación. El término se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o  
35 células malignamente transformadas, tejidos, u órganos, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. El término "cáncer" incluye tumores malignos epiteliales, endodérmico y origen mesenquimal, particularmente carcinomas y sarcomas, tales como las que afectan al sistema respiratorio (boca, la nariz, la tráquea, pulmón), tracto gastrointestinal (lengua, esófago, estómago, intestino delgado, colon, hígado, páncreas, vesícula biliar, el recto), sistema endocrino (tiroides, hipófisis, glándulas suprarrenales), genito-urinario tracto (vejiga urinaria, riñón), sistema reproductivo (de mama, ovarios, útero, cuello del útero, de próstata, el pene, el escroto, testículos), la piel (melanocitos, epidermis, endodermis), sistema nervioso (cerebro, médula espinal, las células gliales, las neuronas) y el sistema linfoide.

El término "carcinoma" es reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de origen epitelial, incluyendo los  
45 carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema endocrino, los carcinomas del tracto genito-urinario, carcinomas de piel, y carcinomas del sistema reproductivo. El término "carcinoma" también incluye "adenocarcinomas", en referencia a los carcinomas derivados de tejido glandular, "carcinomas escamosos", en referencia a los carcinomas de origen epidermoide, y "carcinosarcoma", en referencia a los tumores compuestas de tejido carcinomatosa y sarcomatoso. Los ejemplos de carcinomas incluyen los que forman a partir de los epitelios del cuello del útero, de próstata, de mama, nariz, cabeza y cuello, cavidad oral, esófago,  
50 estómago, hígado, páncreas, colon, ovario, vejiga urinaria y de pulmón, especialmente carcinoma no microcítico de pulmón.

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

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 momento sustancialmente similar, como un agente anti-cáncer,

incluyendo, pero no limitado a, un antimetabolito (Eg5-fluorouracilo), una agente citotóxico o anti-proliferativa (egantraciclina, alcaloide de la vinca, taxanos, nucleótido citotóxico), una biotoxinas, radioterapéutico, agente hormonal o cualquiera de los productos naturales o agentes conocidos por inducir un citotóxico, citostático, anti-angiogénico o vascular efecto interrumpir.

- 5 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula que está siendo tratado, y puede ser llevada a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica.

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 el cáncer.

- 10 En un aspecto de la presente invención, los compuestos o composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento de un trastorno inflamatorio y/o una respuesta inflamatoria. Así, de acuerdo con un adicional de la invención, se proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención.

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

- 25 Los compuestos de la invención se pueden usar para tratar la insuficiencia cardíaca. También se proporciona un uso de un compuesto como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar la insuficiencia cardíaca.

- 30 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 incluyendo cortes o quemaduras). Así, la invención proporciona un método para tratar una herida en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención. En un método preferido de la invención, dicho sujeto es humano.

Los compuestos de la invención también pueden usarse para tratar afecciones y trastornos asociados con la menstruación.

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

- 35 (1) un compuesto o composición descritos en la presente; juntos con  
(2) instrucciones para usar el compuesto en un método o uso descrito en este documento.

El paquete definido en este documento 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, tales unidades pueden ser iguales, o pueden ser diferentes en términos de la dosis de la composición de compuesto y/o forma física.

- 40 A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria, los términos "comprende" y "contienen" y variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significa "incluyendo, pero no limitado a", y no pretende (y no lo hace) excluir otras unidades estructurales, aditivos, componentes, enteros o etapas.

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

- 45 Las características, números enteros, características, compuestos, unidades estructurales químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención se ha de entender que sea aplicable a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento a menos incompatibles con el mismo.

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

- 50 La Figura 1 es una gráfica que muestra el metabolismo de profármaco-1 en función del tiempo en los tejidos tumorales y no tumorales ex vivo;

La Figura 2 es una gráfica que muestra la acumulación y los niveles de profármaco-1 en ratones portadores de tumores siguiente a la administración intraperitoneal;



La Figura 3 es una gráfica que demuestra los niveles de VDA se acumulan después de la administración intraperitoneal de profármaco-1 a ratones portadores de tumores;

La Figura 4 es una gráfica que muestra el metabolismo diferencial del profármaco-2 en los homogeneizados tumorales que expresan altos niveles de MT1-MMP (HT1080) en comparación con los homogeneizados tumorales que expresan bajos niveles de MT1-MMP (MCF-7);

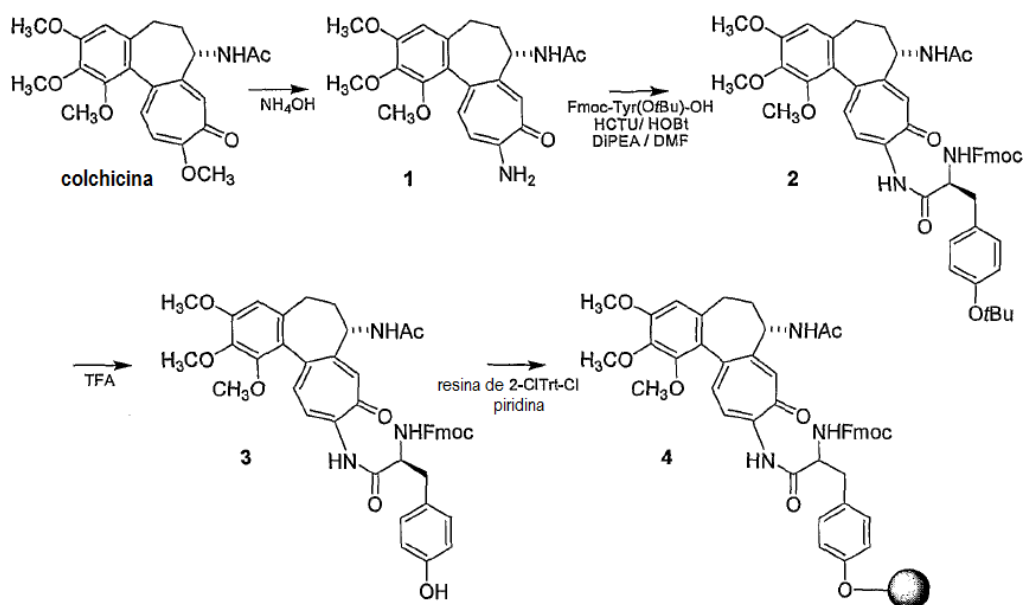
La Figura 5 es una gráfica que muestra la acumulación y los niveles de profármaco-2 en ratones portadores de tumores HT1080 después de administración intraperitoneal;

La Figura 6 es una gráfica que demuestra los niveles VDA que se acumulan después de la administración intraperitoneal de profármaco-2 a ratones portadores de tumor HT1080

## 10 Ejemplo

### Materiales y métodos

#### Síntesis del derivado de colchicina inmovilizado



#### Síntesis de 1:

15 Una solución de amoniaco (35%, 15 mL) fue adicionada a la colchicina (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 equivalente) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto en bruto se lavó con  $\text{KHSO}_4$  (1 M, aq), se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró bajo presión reducida. Se purificó posteriormente por cromatografía instantánea en gel de sílice (con un gradiente de elución:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$  95:5 a 10:1) para obtener 1 como un sólido amarillo (427 mg, 1.11 mmol, 59%).

20  $\delta\text{H}$  (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, J11.0, 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).

#### 25 Síntesis de 2:

30 HBTU (642 mg, 1.55 mmol, 1.50 equivalente) y diisopropiletilamina (DIPEA, 516  $\mu\text{l}$ , 404 mg, 3,11 mmol, 3,00 equivalente) se añadieron a una solución de  $\text{Fmoc-Tyr-OH (tBu)}$  (714 mg, 1,55 mmol, 1,50 equivalente) en DMF (10 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos, 1 (398 mg, 1,04 mmol, 1,00 equivalente) se añadió a la solución. La mezcla de reacción se agitó a  $50^\circ\text{C}$  durante 22 h. DMF se eliminó a vacío y el aceite resultante se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml). La fase orgánica se lavó con  $\text{KHSO}_4$  (ac, 2 x 20 ml), se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía instantánea (con un gradiente de elución:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{metanol}$  100: 0 a 99: 1 a 98: 2) para dar 2 como un sólido amarillo (530 mg, 642 mmol, 67%).

$\delta$ 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 (1 H, 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-CH<sub>2</sub>), 4.28 (1 H, dd, J 10.0 y 7.2, C18-CH<sub>2</sub>), 4.16 (1 H, dd, J 7.2 y 6.19, C19-H), 3.93 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.21 (1 H, dd, J 13.1 y 4.8, C13-CH<sub>2</sub>), 3.11 (1 H, dd, J 13.1 y 5.5, C13-CH<sub>2</sub>), 2.53 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5-CH<sub>2</sub>), 2.40 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5-CH<sub>2</sub>), 2.22-2.15 (1 H, m, C6-CH<sub>2</sub>), 1.88 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.80 (1 H, ddd, J 11.5, 11.3 y 6.9, C6-CH<sub>2</sub>), 1.22 (9 H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); ES m/z (%) 826 [M<sup>+</sup>] (100).

#### 10 Síntesis de 3:

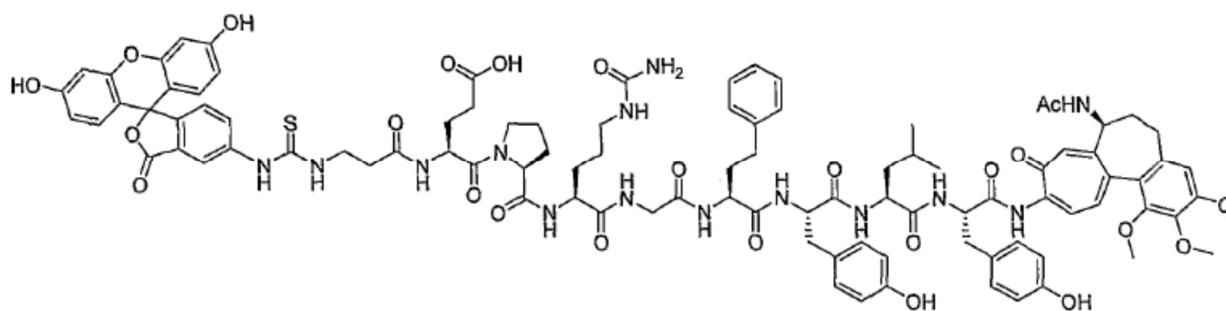
TFA (2 mL) fue adicionado a la solución de 2 (486 mg, 589 mmol, 1.00 equivalente) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min. TLC indicó conversión cuantitativa en el producto. El producto se concentró a presión reducida, con tolueno en co-evaporación para dar 3 en rendimiento cuantitativo.

$\delta$ 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:

La resina de cloruro de 2-clorotritilo (Novabiochem, malla 100-200, con sustitución de 1,4 mmol g<sup>-1</sup>, 589 mg, 0,765 mmol, 1,00 equivalente) se suspendió en una solución de 3 (589 mg, 0,765 mmol, 1,00 equivalente), dimetilaminopiridina (10 mg, 76,5  $\mu$ mol, 0,01 equivalente), DIPEA (247 mg, 1,913 mmol, 333  $\mu$ l, 2,50 equivalente) y piridina (241 mg, 3,061 mmol, 248  $\mu$ l, 4,00 equivalente) en THF (10 ml) y se agitó durante 6 horas a 50 °C. La resina se filtró a continuación y se lavó a fondo con THF. Después, la resina se tapó lavando la resina cuidadosamente con metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH: DIPEA 17: 2: 1, 100 ml). La resina 4 se secó durante la noche sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Peso seco de la resina: 593 mg (56% de carga).

#### 30 Procedimiento general para la síntesis de profármacos activados por la endopeptidasa



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

Como ejemplo, el péptido conjugado 5 se sintetizó usando síntesis de péptidos en fase sólida convencional, de derivado 4 de colchicina inmovilizada, usando una estrategia basada en Fmoc.

La síntesis de estrategia N<sup>α</sup>-Fmoc de ácidos péptidos se consigue manualmente usando resina 4 derivada de 2-clorotritilo. La resina se hincho totalmente en DMF, seguido de la eliminación del grupo protector N-Fmoc mediante tratamiento con 20% v/v de piperidina en DMF (3 x 3 min). Todos los acoplamientos se llevaron a cabo en DMF, empleando excesos molares 2,5 veces de aminoácidos protegidos de N<sup>α</sup>-Fmoc (con grupos protectores de cadena lateral apropiados), y se activan mediante HCTU / HOBT / DIPEA. Las desprotecciones N<sup>α</sup>-Fmoc se realizaron utilizando 20% de piperidina en DMF (3 x 3 min). El éxito de los acoplamientos y desprotecciones se controló mediante la prueba de Kaiser basada en la ninhidrina. Se repitieron los acoplamientos sin éxito. Después de la desprotección final de N<sup>α</sup>-Fmoc, la cadena de péptido se finaliza con isotiocianato de fluoresceína (2,50 Equivalente, en presencia de DIPEA, 1,50 Equivalente). El éxito de esta reacción también se monitorizó mediante la prueba de Kaiser.

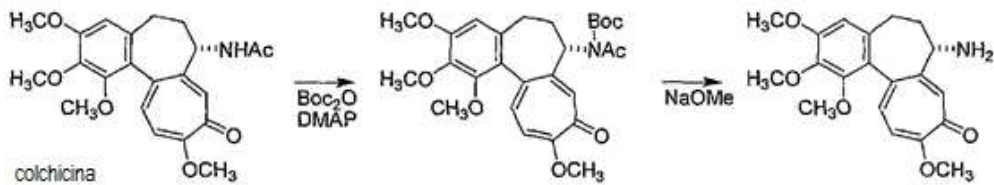
Un residuo de  $\beta$ -alanina adicional se incorporó en la secuencia para superar la incompatibilidad del enlace de tiourea y las condiciones ácidas de la escisión (la tiourea puede reorganizar, y el carbono carbonilo del enlace amida anterior

puede sufrir el ataque nucleofílico por la función sulfhidrilo formada. Esto conduce a la escisión del enlace amida, con la formación concomitante de un tiazolinona cíclica. La tiazolinona puede someterse a reordenamiento en presencia de ácido acuoso para formar una tiohidantoína

5 Al terminar la secuencia, la resina se lavó (DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH) y se secó a vacío sobre KOH hasta peso constante. Los péptidos se escindieron de la resina por acidólisis suave usando TFA-H<sub>2</sub>O-triisopropilsilano 95: 2,5: 2,5 para 2 h a temperatura ambiente, con la cadena lateral desprotección simultánea. Después de la escisión, el TFA se eliminó a presión reducida. El producto bruto se extrajo en ácido acético acuoso al 95% y se liofilizó. El péptido crudo se analizó usando HPLC de fase reversa y se purificó usando HPLC preparativa (pureza > 97%). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron. La identidad se confirmó por espectrometría de masas.

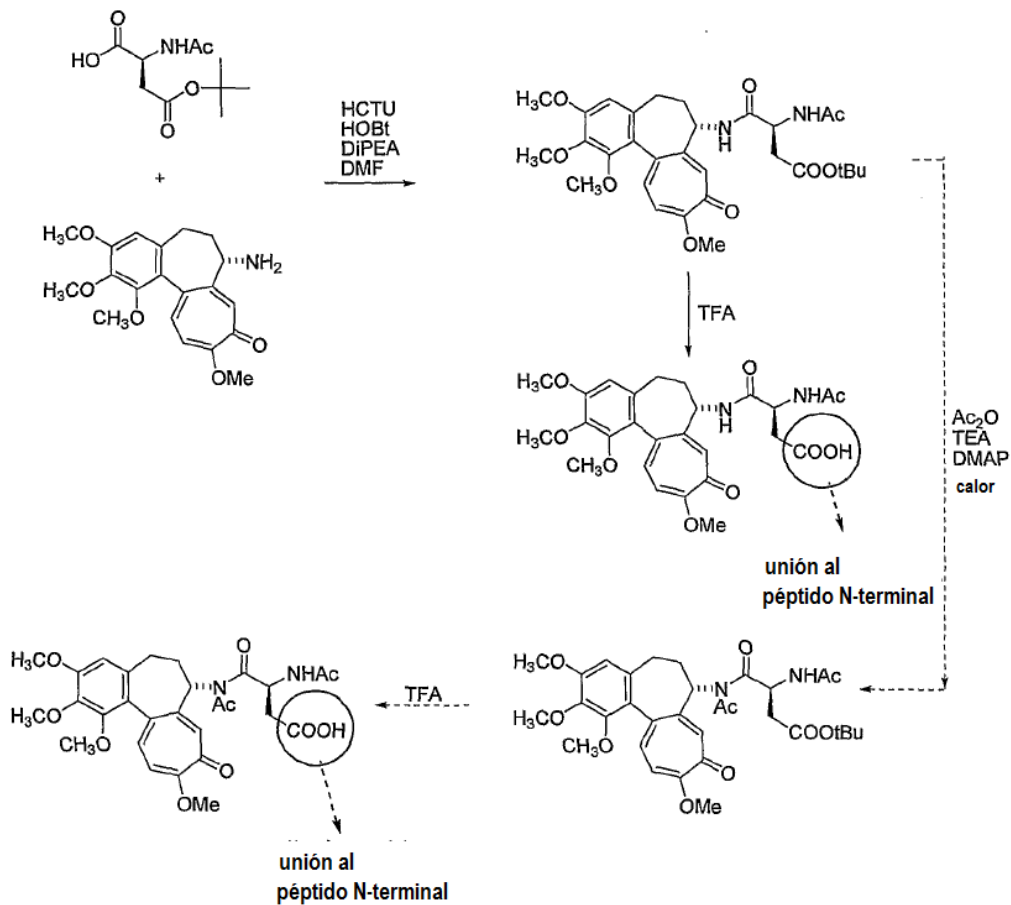
10 Unión potencial de la colchicina padre a una secuencia de péptido a través del anillo B

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



15

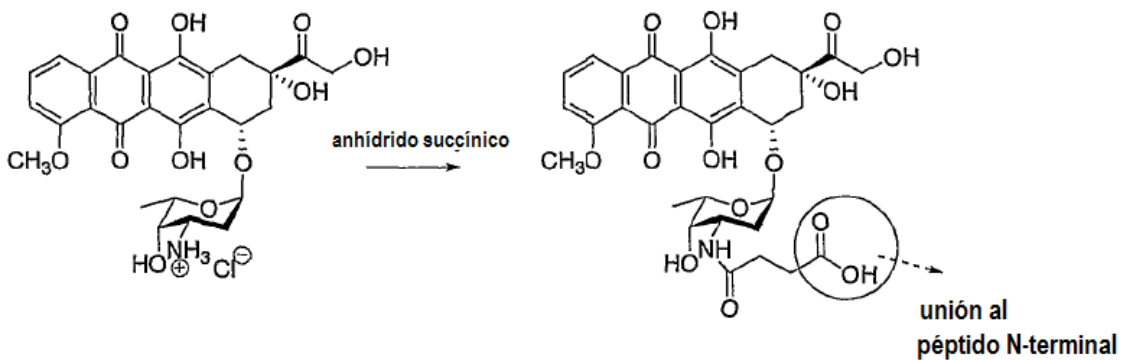
La acetilación del enlace amida se examinará también, para evaluar si la colchicina original es liberada después de la activación de MMP y la consiguiente degradación de la exopeptidasa



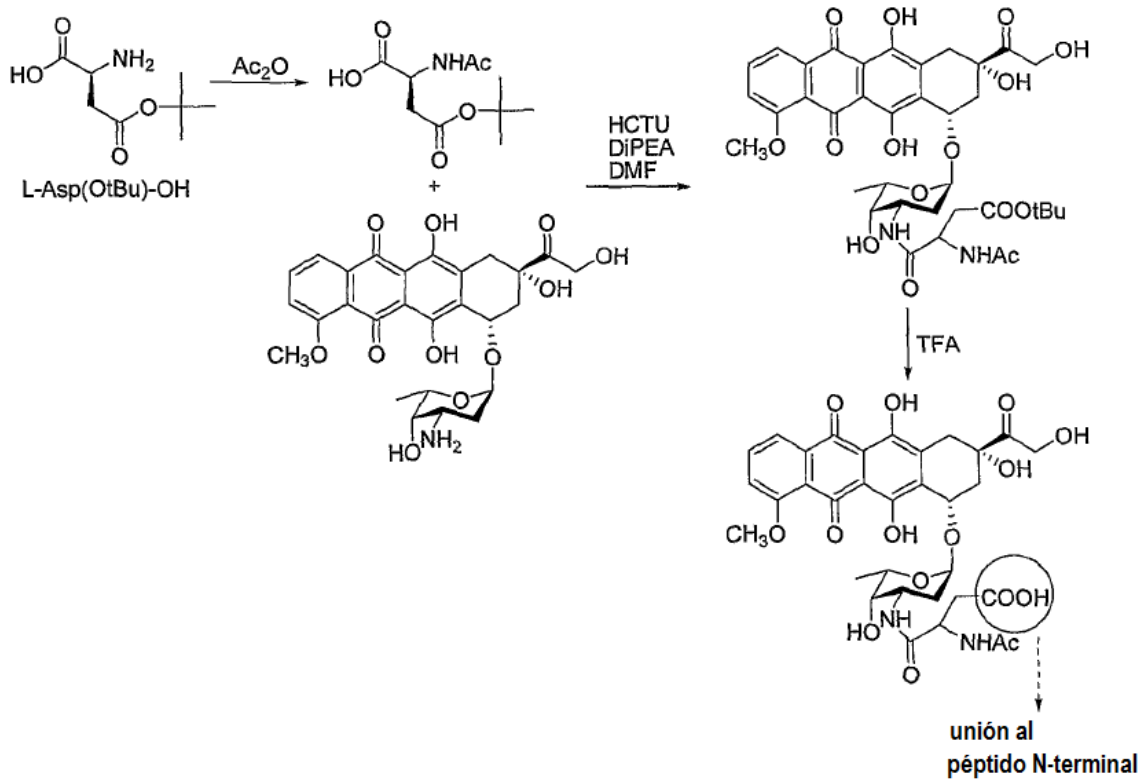
Estrategias para la unión de doxorubicina a una secuencia peptídica

- 5 Para permitir la fijación de la doxorubicina a través del péptido N-terminal (siguiendo la síntesis de péptidos utilizando la resina inmobilizada derivada de colchicina previamente descrita) primero debe ser modificada para introducir un ácido carboxílico. Los ejemplos incluyen la reacción con anhídrido succínico (estrategia 1, a continuación). Sin embargo, mediante la utilización de la cadena lateral de ácido aspártico (ambos aminoácidos naturales), como se muestra a continuación (estrategia 2) un aminoácido natural (en oposición a una entidad química extraña) se libera en el metabolismo:

Estrategia 1: (separador de succinilo)

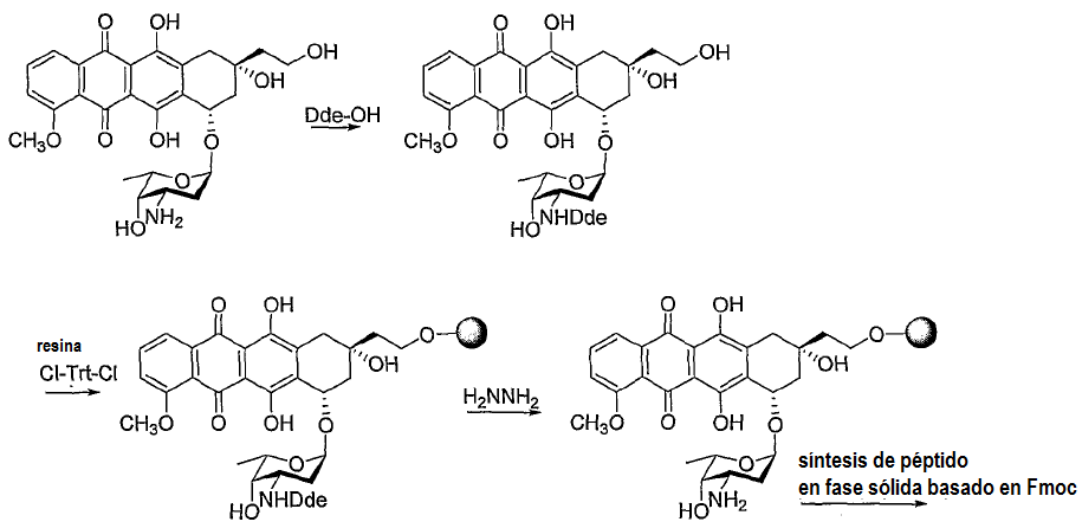


Estrategia 2: (separador de aminoácidos)



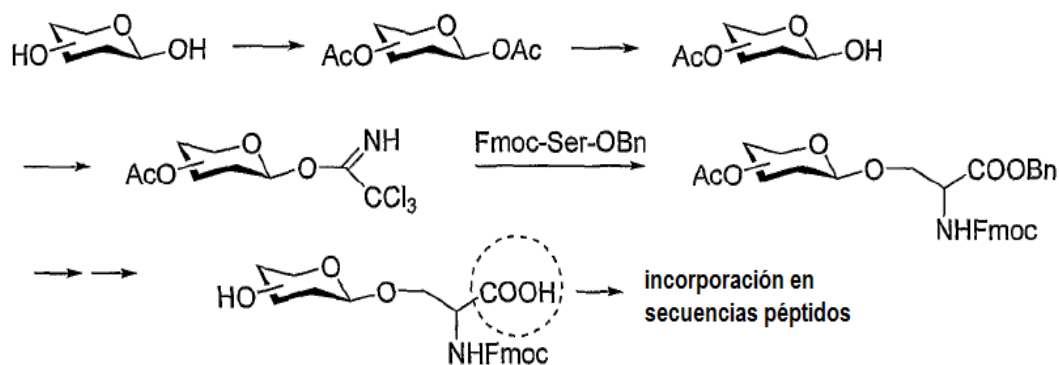
Enlazamiento al C-terminal de doxorubicina

- 5 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 en una resina a base de tritilo (o lo contrario). La eliminación posterior del grupo D para desenmascarar la amina, lo que permite una secuencia péptidos que se construye a partir de este punto (es decir, a través del C-terminal). La síntesis en fase sólida basada en Fmoc estándar produciría una secuencia de péptidos. Un VDA apropiadamente derivado entonces conjugarse a través del N-terminal. La escisión de la resina y la purificación están anteriormente descritas.



- 10 Incorporación de aminoácidos glicosilados (para mejorar las propiedades fisicoquímicas)

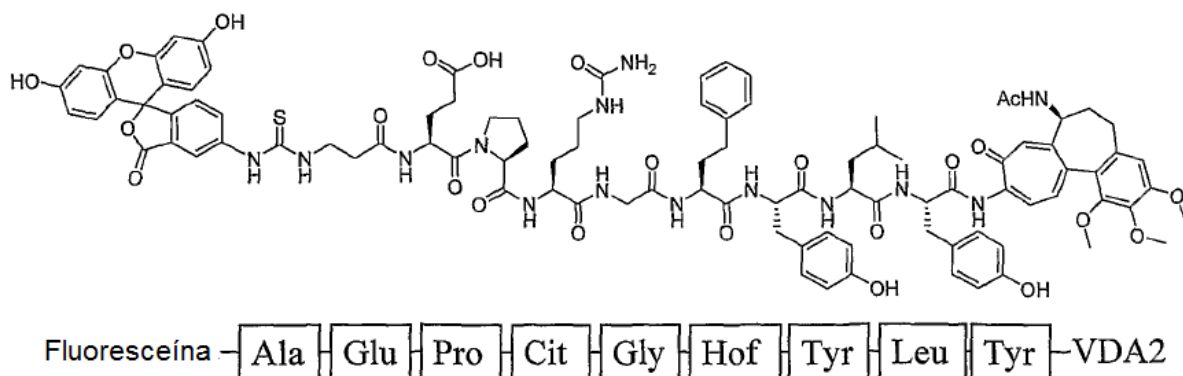
Los aminoácidos con funcionalidad de la cadena lateral apropiada (por ejemplo, serina, tirosina, treonina) pueden ser glicosilados (con mono-, di- o trisacáridos) para producir péptidos con solubilidad acuosa mejorada. Tal unidad estructural derivada de carbohidrato podría ser utilizado en lugar de serina,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



## 5 Resultados

1) Profármaco activado por MMP (compuesto i) - pan MMP específica

Estructura:



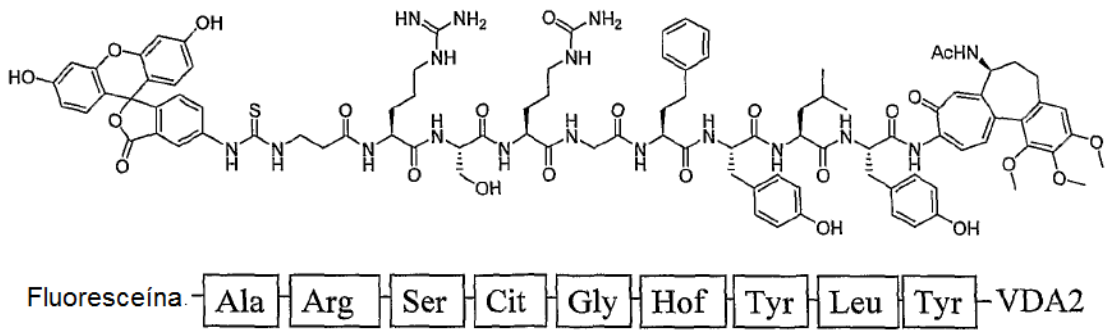
(Hof = homofenilalanina; Cit = citrulina)

- 10 a) El profármaco-1 ha sido seleccionado utilizando plasma de ratón normal, homogeneizado de hígado de ratón normal y un modelo ex vivo experimental de homogeneizado de tumor humano (xenoinjerto de HT1080; conocido por expresar mayoría de MMPs). Escisión del profármaco y el metabolismo se detectaron usando LC / MS / MS.
- a. El profármaco-1 era estable en el plasma y el hígado, apoyando la estabilidad sistémica de estos agentes terapéuticos (Figura 1).
- 15 b. El profármaco-1 se metabolizó en homogeneizado de tumor, apoyando la activación de estos agentes terapéuticos en los tumores que expresan MMPs (Figura 1).
- b) El profármaco-1 se escinde rápidamente en la glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) por MMP-2, MMP-9, MMP-10 y MMP-14 recombinante, por lo menos. Demostrado por LC / MS / MS y espectrometría de masas (datos no mostrados)
- 20 c) El profármaco-1 se administró in vivo a través de la ruta intraperitoneal a ratones con modelo de tumor HT1080 subcutáneo (expresión de la mayoría de las MMP). El Plasma, los tejidos y tumores se recogieron a intervalos regulares posteriores a la dosificación. Los niveles de profármaco y VDA2 se evaluaron mediante LC/MS/MS.
- a. Profármaco-1 se acumuló y se detectó en todos los tejidos analizados (Figura 2).
- 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 la dosificación. (Figura 2)
- 25 d. El VDA2 era detectable en niveles bajos en los tejidos normales tras la administración del profármaco-1 (Figura 3)
- e. Se detectaron niveles VDA2 en niveles altos en el tejido tumoral después de la administración profármaco-1 (Figura 3)

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

2) profármaco activado por MMP (compuesto i) dirigido a los MMP de tipo membrana (MT-MMPs)

Estructura:



- 5
- d) El compuesto 1 se modificó con el fin de cambiar la orientación de MMP 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. Prolina fue eliminada y reemplazada con serina en la posición P3
- 10
- e) El Profármaco-2 ha sido seleccionado utilizando plasma de ratón normal, homogeneizado de hígado de ratón normal y un modelo experimental de homogeneizado de tumor humano que demuestra alta expresión y actividad de MT1-MMP (MMP-14) (HT1080) y de baja expresión y actividad MT1-MMP (MCF 7) ex vivo. La escisión y el metabolismo del Profármaco-2 se detectaron usando LC/MS/MS.
- a. El profármaco-2 permaneció intacto en el plasma apoyando la estabilidad sistémica de esta terapéutica.
  - 15 b. El profármaco-2 se mantuvo estable en homogeneizados de hígado murínico
  - c. El profármaco-2 se metabolizó rápidamente en el homogeneizado de tumor que expresa altos niveles de MT-MMP (HT1080) en relación con homogeneizado 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 la activación por MT-MMP.
- 20
- f) el Profármaco-2 se escinde diferencialmente por MMPs como se muestra por LC/MS/MS y espectrometría de masas (datos no mostrados):
- a. Escindido rápidamente en la glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) por MMP-14 recombinante.
  - b. Escindido lentamente en la homofenilalanina-tirosina (Hof-Tyr) por MMP-2 recombinante. Que demuestra diferente escisión a la observada con el profármaco-1.
  - c. El profármaco-2 no es escindido por MMP-9 recombinante, en contraste con el profármaco-1
  - 25 d. Estos datos apoyan la escisión selectiva de MMP de profármaco-2
- g) El profármaco-2 se administra en vivo a través de la ruta intraperitoneal a ratones con que portan el modelo subcutáneo de tumor HT1080 (MT1-MMP positivo). El plasma, los tejidos y tumores se recogieron a intervalos regulares después de la dosificación. Los niveles de profármaco-2 y VDA2 se evaluaron mediante LC/MS/MS.
- a. Profármaco-2 se acumuló y se detectó en todos los tejidos analizados (Figura 5).
  - 30 b. Se observaron más altos de profármacos-2 niveles en el tumor (Figura 5).
  - c. El hígado fue representativa de todos los tejidos normales analizados. (Figura 5)
  - d. El VDA2 fue indetectable en plasma tras la administración de profármaco-2 (Figura 6)
  - e. se detectaron altas concentraciones de VDA2 en tumor después de la administración de profármaco-2 (Figura 6)
  - f. Los niveles de VDA2 en tumor fueron 10 veces más altos que lo detectado en tejidos normales después de la
  - 35 administración de profármaco-2 (Figura 6)
  - g. Los altos niveles de profármaco-2 y VDA2 fueron todavía detectable en el tumor 48 horas después de la administración.

Listado de secuencias

<110> University of Bradford  
 <120> COMPUESTOS  
 <130> 0459P/WO  
 <140> PCT/GB2008/001043  
 5 <141> 2008-03-27  
 <150> UK0707034.5  
 <151> 2007-04-12  
 <160> 5  
 <170> PatentIn version 3.3  
 10 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 15 <223> péptido sintético  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X es citrulina  
 20 <400> 1  
**Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
**1 5**  
 <210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <220>  
 <221> X  
 30 <222> (3)..(3)  
 <223> X es citrulina  
 <400> 2  
**Glu Pro Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
**1 5**  
 <210> 3  
 35 <211> 7  
 <212> PRT

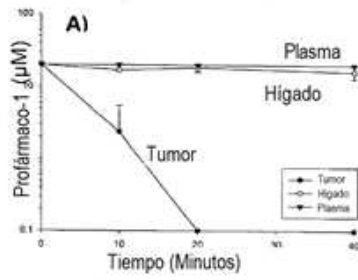


- <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <220>
- 5 <221> X  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X es citrulina  
 <400> 3
- Arg Ser Xaa Gly Phe Tyr Leu**  
 1 5
- 10 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>
- 15 <223> péptido sintético  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X es citrulina
- 20 <400> 4
- Ala Glu Pro Xaa Gly Phe Tyr Leu Tyr**  
 1 5
- <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT
- 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> péptido sintético  
 <220>  
 <221> X
- 30 <222> (4)..(4)  
 <223> X es citrulina  
 <400> 5
- Ala Arg Ser Xaa Gly Phe Tyr Leu Tyr**  
 1 5

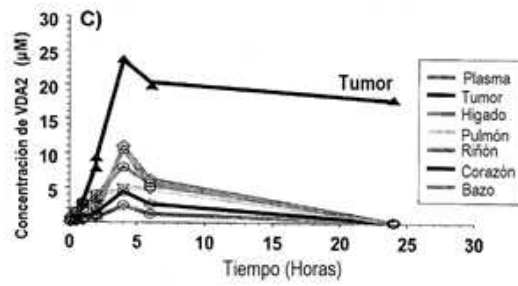
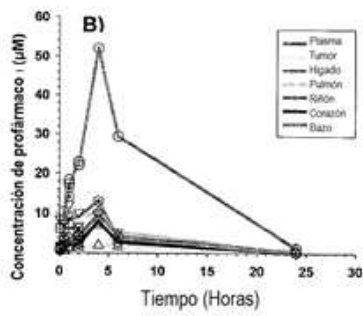
**REIVINDICACIONES**

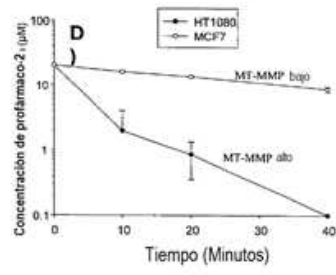
1. Uso de una secuencia de aminoácidos que comprende -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- como un sitio de escisión específico de MMP-14.
- 5 2. Uso de un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de metaloproteinasa de matriz (MMP) para producir un compuesto desactivado sistemáticamente y que puede activarse por un sitio de sobre expresión de MMP en el que el sitio de escisión proteolítica de MMP comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr -Leu-.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sitio de sobreexpresión de MMP es un sitio tumoral.
- 10 4. Uso de un péptido que comprende -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- para superar un efecto tóxico de la administración sistémica de un agente anticancerígeno asociando el péptido con dicho agente anticancerígeno.
5. Un sitio de escisión proteolítica de MMP que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- asociada con un agente antitumoral para uso en medicina.
6. Un profármaco que comprende  
un compuesto biológicamente activo asociado con
- 15 un péptido que comprende un sitio proteolítico de MMP que comprende la secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu-.
7. Un profármaco de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el profármaco es un entorno tumoral activable.
8. Un profármaco de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el compuesto biológicamente activo es un agente antitumoral o un agente de interrupción vascular (VDA).
- 20 9. Un profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el péptido tiene un grupo protector c para evitar la degradación no específica del péptido.
10. Un profármaco de acuerdo con la reivindicación 9, en el que c se selecciona de fluoresceína, derivados de fluoresceína, azúcares simples, D-aminoácidos o iminoácidos de prolina.
- 25 11. Un método para aumentar el índice terapéutico de un fármaco, comprendiendo el método asociar el fármaco con un péptido que comprende -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- y que tiene un grupo protector c en N- o C- terminal, lo que reduce los niveles sistémicos de fármaco activo y aumenta el índice terapéutico.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que c se selecciona de fluoresceína, derivados de fluoresceína, azúcares simples, D-aminoácidos o iminoácidos de prolina.
- 30 13. Un método para modificar un fármaco para superar un efecto tóxico de la administración sistémica del fármaco, que comprende asociar el fármaco con un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de MMP -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu- y que tiene un grupo protector c en N- o C- terminal para evitar la degradación no específica del péptido.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que c se selecciona de fluoresceína, derivados de fluoresceína, azúcares simples, D-aminoácidos o iminoácidos de prolina.

Figura 1



Figuras 2 y 3





Figuras 5 y 6

