

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 812**

51 Int. Cl.:

C07F 9/58 (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)
C07K 5/09 (2006.01)
C07K 5/103 (2006.01)
C07K 5/107 (2006.01)
C07K 5/11 (2006.01)
C07K 5/117 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2012 PCT/US2012/021909**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032527**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12826522 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2753626**

54 Título: **Conjugados de LLP2A-bisfosfonato para el tratamiento de la osteoporosis**

30 Prioridad:

02.09.2011 WO PCT/US2011/050381

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**LAM, KIT S.;
LIU, RUIWU;
YAO, WEI y
LANE, NANCY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 688 812 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

Conjugados de LLP2A-bisfosfonato para el tratamiento de la osteoporosis

Antecedentes de la invención

5 La osteoporosis es una enfermedad de fragilidad ósea aumentada que resulta de la deficiencia de estrógenos y el envejecimiento. Es un importante problema de salud pública con casi el 50% de las mujeres caucásicas y el 25% de los hombres caucásicos en riesgo de una fractura osteoporótica en sus vidas (Publicación de the National Osteoporosis Foundation). De acuerdo con lo anterior, la osteoporosis representa un problema de salud significativo.

10 Una disminución en el número de células madre mesenquimales (MSCs) en la médula ósea con el envejecimiento conduce a osteogénesis reducida y puede ser el factor más importante responsable de la reducción de la formación de hueso y aumentar la fragilidad ósea (Heersche, J.N., C.G. Bellows, y. Ishida, JProsthet Dent, 1998, 79(1): p. 14-6.; Ettinger, M.P., Arch Intern Med, 2003. 163(18): p. 2237-46). En la actualidad, casi todos los tratamientos para la osteoporosis reducen la pérdida ósea al disminuir la resorción ósea osteoclástica y, por consiguiente, evitan la posterior degradación del hueso. Es importante destacar que esta clase de fármacos no restaura la estructura ósea perdida. Las modalidades terapéuticas que se dirigen a la formación de hueso ya sea aumentando el número y/o la actividad de los osteoblastos pueden ser un enfoque más atractivo que mejorará la formación de hueso y promoverá la regeneración ósea. Aunque la regeneración ósea por inducción de la osteogénesis de MSCs es una estrategia racional para tratar la osteoporosis, las infusiones sistémicas de MSC in vivo no han podido promover una respuesta osteogénica en el hueso debido a la incapacidad de las MSC para migrar a la superficie del hueso, que es un problema clínico importante para el trasplante de MSC (Gao, J., et al., Cells Tissues Organs, 2001. 169(1): p. 12-20; Meyerrose, T.E., et al., Stem Cells, 2007, 25(1): p. 220-7). Además, el injerto de las MSCs requiere la ablación del donante usando quimioterapia y/o radiación que puede dar como resultado un daño concomitante a las células mesenquimales endógenas (Bacigalupo, A., Best Pract Res Clin Haematol, 2004, 17(3): p. 387-99).

25 La adhesión celular es un proceso mediante el cual las células se asocian entre sí, migran hacia un objetivo específico o se localizan dentro de la matriz extracelular. La adhesión celular constituye uno de los mecanismos fundamentales subyacentes a numerosos fenómenos biológicos. Las investigaciones sobre las bases moleculares para la adhesión celular han revelado que diversas macromoléculas de la superficie celular, conocidas colectivamente como moléculas o receptores de adhesión celular, median las interacciones célula-célula y célula-matriz. Por ejemplo, los miembros de la familia de integrinas de los receptores de la superficie celular median las interacciones célula-célula y célula-matriz y regulan la motilidad, migración, supervivencia y proliferación celular (Hynes, Cell, 69: 11-25 (1992); Hynes, Cell, 30 1110:673-687 (2002)). Las integrinas son complejos heterodiméricos no covalentes que constan de dos subunidades, α y β . Hay al menos 18 α subunidades diferentes y al menos 8 β subunidades diferentes.

35 Las células madre mesenquimales dentro de la médula ósea tienen un potencial de múltiples linajes y representan una mezcla de precursores para tipos celulares derivados de mesenquimales que incluyen osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Owen, M. et al., Ciba Found Symp, 1988, 136: p. 42-60; Bruder, S.P., et al., J Cell Biochem, 1994, 56(3): p. 283-94; Prockop, D.J., Science, 1997, 276(5309): p. 71-4). Las células óseas en todas las etapas de maduración dependen en gran medida de las interacciones célula-matriz y célula-célula (Mukherjee, S., et al., J Clin Invest, 2008, 118(2): p. 491-504; Grzesik, W.J. and P.G. Robey, J Bone Miner Res, 1994, 9(4): p. 487-96; Vukicevic, S., et al., Cell, 1990, 63(2): p. 437-45; Mbalaviele, G., et al., J Bone Miner Res, 2006, 21(12): p. 1821-7). La médula ósea es el sitio donde residen los progenitores osteoblásticos comprometidos, y la diferenciación osteogénica es la ruta predeterminada para el compromiso del linaje del MSC (Halleux, C., et al., J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001, 2(1): p. 71-6; Muraglia, A., et al., J Cell Sci, 2000, 113 (Pt 7): p. 1161-6). La movilización de los progenitores osteoblásticos a la superficie del hueso es una etapa crítica para que los osteoblastos maduren y formen tejido mineralizado (Adams, G.B., et al., Nature, 2006, 439(7076): p. 599-603; Chen, X.D., et al., J Bone Miner Res, 2007, 22(12): p. 1943-56). Una vez que los progenitores osteoblásticos se "dirigen" a la superficie del hueso, sintetizan una gama de proteínas que incluyen osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea, osteonectina, colágeno-I y fibronectina que mejorarán además la adhesión y la maduración de los osteoblastos (Gronthos, S., et al., Periodontol 2000, 2006, 41: p. 188-95; Gronthos, S., et al., Bone, 2001, 28(2): p. 174-81; Gronthos, S., et al., J Bone Miner Res, 1997, 12(8): p. 1189-97). Estas interacciones están ampliamente mediadas por receptores de integrinas transmembrana que utilizan principalmente una secuencia de arginina-glicina-aspartato (RGD) para identificar y unirse a ligandos específicos. Las MSCs expresan las integrinas $\alpha 1$, 2, 3, 4, 6, 11, CD51 (integrina αV), y CD29 (integrins $\beta 1$) (Brooke, G., et al., Stem Cells Dev, 2008). Se informa que las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ se expresan en las células osteoblásticas (Grzesik, W.J. and Robey, P.G., J Bone Miner Res, 1994, 9(4): p. 487-96; Gronthos, S., et al., Bone, 2001, 28(2): p. 174-81; Gronthos, S., et al., J Bone Miner Res, 1997, 12(8): p. 1189-97; Cowles, E.A., L.L. Brailey, and G.A. Gronowicz, J Biomed Mater Res, 2000, 52(4): p. 725-37). Se ha informado que la sobreexpresión de $\alpha 4$ integrina en MSCs aumenta el alojamiento de las MSCs en hueso (Mukherjee, S., et al., J Clin Invest, 2008, 118(2): p. 491-504).

Los bisfosfonatos se usan ampliamente para el tratamiento de la osteoporosis. Esta clase de fármacos también se usa como un "vehículo" para administrar medicamentos dirigidos a los huesos al tejido óseo como profármacos basados en su unidad estructural bifosfónica. Los bisfosfonatos se han usado para liberar diclofenaco de liberación sostenida, un

fármaco antiinflamatorio no esteroideo para el hueso en ratas (Hirabayashi, H., et al., J Control Release, 2001, 70(1-2): p. 183-91). La dosis de bisfosfonato necesaria para este propósito de administración de fármacos suele ser 10-100 veces menor que las dosis necesarias para los tratamientos de osteoporosis, hipocalcemia, enfermedad de Paget o cáncer de hueso metastásico.

5 Es bien sabido que la formación de hueso es beneficiosa para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos dispares en mamíferos, incluyendo envejecimiento simple, degeneración ósea y osteoporosis, curación de fracturas, fusión o artrodesis, osteogénesis imperfecta, etc., así como para una instalación exitosa de diversos implantes ortopédicos y periodontales médicos, tales como tornillos, varillas, jaula de titanio para fusión espinal, articulaciones de la cadera, articulación de la rodilla, articulaciones del tobillo, articulaciones de los hombros, placas dentales y varillas, etc.

10 Aumento de la mineralización ósea para tratar afecciones caracterizadas al menos en parte por resorción ósea aumentada, tales como osteopenia, fracturas óseas, osteoporosis, artritis, metástasis tumorales, enfermedad de Paget y otros trastornos óseos metabólicos, uso de inhibidores de catepsina K y proteínas de unión a TGF-beta, etc., son bien conocidas como se muestra en la Publicación de Estados Unidos No. 2004/0235728 de Selwyn Aubrey Stoch, publicada el 25 de noviembre de 2004, y Mary E. Brunkow et al., Patente de los Estados Unidos No. 6,489,445 y Publicación de los Estados Unidos No. 2004/0009535, publicada el 15 de enero de 2004. En la patente 445 y la publicación 535 de Brunkow, las proteínas de unión a TGF-beta incluyen los anticuerpos de polipéptidos Sost (péptido de longitud completa y corta) que interfieren con la interacción entre la proteína de unión TGF-beta esclerostina y un miembro de la superfamilia TGF-beta, y en particular una proteína morfogénica ósea. En la patente 445 de Brunkow se cita una nueva familia de proteínas de unión a TGF-beta humana y ácidos nucleicos que las codifican. La proteína se une al menos a la proteína-5 morfogénica del hueso humano y a la proteína-6 morfogénica del hueso humano. Las enfermedades antes mencionadas se deben a una pérdida sistémica de mineral óseo y, de este modo, la administración del anticuerpo terapéutico es para el aumento sistémico (cuerpo entero) en la densidad mineral ósea.

15 La Publicación de los Estados Unidos No. 2006/0165799, publicada el 27 de julio de 2006, enseña una composición de relleno de huesos para estimular la formación de hueso y la consolidación ósea que comprende sulfato de calcio biocompatible y biopolímeros viscosos. La composición está destinada a administrarse en la parte faltante del hueso lesionado sin difundirse a los órganos circundantes.

20 La Publicación de los Estados Unidos No. 2005/0256047, publicada el 17 de noviembre de 2005, muestra la inducción de la formación de hueso induciendo mecánicamente un aumento en la actividad de los osteoblastos y elevando la concentración sanguínea sistémica de un agente anabólico óseo, incluyendo opcionalmente la concentración sistémica en sangre de un agente antirresortivo.

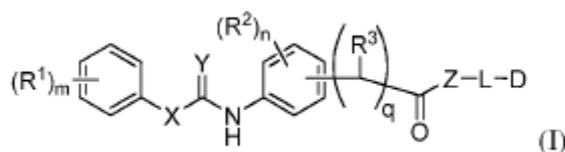
25 La Patente de los Estados Unidos No. 7,576,175, expedida el 18 de agosto de 2009, muestra ligandos de integrina $\alpha_4\beta_1$ que muestran alta afinidad de unión, especificidad y estabilidad. Los ligandos comprenden un péptido que tiene n aminoácidos seleccionados independientemente, en el que al menos un aminoácido es un aminoácido no natural o un D-aminoácido, y en el que n es un número entero desde 3 a 20.

30 La Publicación de los Estados Unidos No. 2010/0021379, publicada el 28 de enero de 2010, muestra conjugados de anticuerpos que comprenden un agente de direccionamiento unido covalentemente a un anticuerpo o fragmento del mismo. El agente de direccionamiento incluye un ligando que comprende un péptido o peptidomimético específico para un receptor de integrina tal como la integrina $\alpha_4\beta_1$. El documento WO 01/44258 se refiere a compuestos dirigidos a los huesos útiles para tratar una variedad de trastornos y afecciones, por ejemplo, de tejido óseo.

35 Lo que se necesita en la técnica son nuevas composiciones y métodos para tratar la osteoporosis y promover el crecimiento óseo. Sorprendentemente, la presente invención satisface estas y otras necesidades.

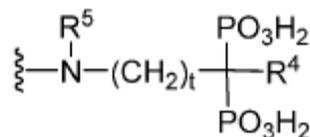
Breve resumen de la invención

En una primera realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



45 en la que la fórmula I, cada R¹ y R² se selecciona independientemente entre H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆. R³ se selecciona de H, alquilo C₁₋₆ y cicloalquilo C₃₋₈. X se selecciona de O, S y NH. Y se selecciona de O y NH. Alternativamente, R¹ o R² se combina con Y y los átomos a los que están unidos forman un anillo heteroarilo de 5 miembros. Z es un péptido que tiene 3-20 aminoácidos seleccionados independientemente, en el que al menos un

aminoácido se selecciona de un aminoácido no natural y un D-aminoácido. L es un enlazante. D es un fármaco de bisfosfonato, en el que D tiene la fórmula



5 R^4 se selecciona de H, OH y halógeno, R^5 se selecciona de H y alquilo C_{1-6} , y el subíndice t es de 1 a 6. Los subíndices m, n y q son cada uno independientemente de 0 a 2. También se incluyen sales e isómeros de los compuestos de fórmula I.

En una segunda realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En una tercera realización, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de la osteoporosis.

En una cuarta realización, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en la promoción del crecimiento óseo.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra la distribución de beta-glucuronidasa en hueso 24 horas después del trasplante de huMSCs en ratones NOD/SCID/MSPVII. Los ratones MSPVII de tres meses recibieron una sola inyección intravenosa de ya sea de PBS, huMSC (5×10^5), huMSC + LLP2A, o huMSC + LLP2A-Ale. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después. Después del sacrificio, los cuerpos vertebrales lumbares se recogieron y congelaron en medios de incrustación de temperatura de corte óptima. Las secciones se tiñeron usando naftol-AS-BI- β -Dglucurónido (GUSB) como sustrato. Las MSCs humanas, como se demostró mediante GUSB + manchas rojas (flechas negras), se observaron acumuladas en la médula ósea, adyacentes a las superficies de hueso tanto trabeculares como periósticas en el grupo huMSCs + LLP2A-Ale.

25 Las figuras 2a-2c muestran que LLP2A-Ale aumenta la formación de hueso trabecular tres semanas después del trasplante de células madre en ratones NOD/SCID/MSPVII. La figura 2a muestra los marcadores de recambio óseo medidos a partir del suero. La figura 2b muestra secciones histológicas representativas del hueso trabecular vertebral lumbar de los grupos tratados con PBS, MSC, MSC + LLP2A o MSC + LLP2A-Ale. Se administró rojo de alizarina a 20 mg/kg al inicio y se administró calceína (10 mg/kg) por vía subcutánea 7 días y 2 días antes de sacrificar los ratones. La figura 2c muestra la histomorfometría ósea basada en la superficie realizada en el quinto cuerpo vertebral lumbar tres semanas después de la inyección y el trasplante de MSC. ObS/BS, superficie de los osteoblastos; MAR, tasa de aposición mineral; BFR/BS, tasa de formación de hueso basada en la superficie del hueso. *, p <0.05 frente a PBS; **, p <0.01 frente a PBS. Los datos se representan como la media \pm SD.

35 Las figuras 3a-3b muestran que LLP2A-Ale aumenta la formación de hueso cortical tres semanas después del trasplante de huMSCs en ratones NOD/SCID/MSPVII. Las secciones transversales representativas del fémur medio de los grupos tratados con PBS, MSC, MSC + LLP2A y MSC + LLP2A-Ale se muestran en la figura 3a. Se administró rojo de alizarina a 20 mg/kg al inicio (antes de la inyección del compuesto de estudio) y se administró calceína (10 mg/kg) por vía subcutánea 7 días y 2 días antes de sacrificar los ratones. La histomorfometría ósea basada en la superficie, realizada en la superficie endocortical (Ec) y la superficie perióstica (Ps) tres semanas después de las inyecciones de ya sea MSC o LLP2A-Ale, se muestra en la figura 3b. * y ** son como se definieron anteriormente para la figura 2.

40 Las figuras 4a-4c muestran que LLP2A-Ale aumenta la masa ósea esponjosa al aumentar el grosor de las trabéculas. In vivo, se realizaron barridos de microCT en los fémures distales derechos al inicio (basal) y se repitieron después de 4 semanas. En las figuras 4a-b se muestran mapas de espesor tridimensionales representativos del barrido por microCT del hueso esponjoso desde la metafísica del fémur distal. El ancho de las trabéculas está codificado por colores, el color azul verdoso representa trabéculas delgadas y el color amarillo-rojo representa las trabéculas gruesas. Los mapas de espesor tridimensionales representativos de cada grupo se muestran en el panel inferior. Los cambios porcentuales desde el inicio con los diferentes tratamientos se muestran en la figura 4c. BV/TV se refiere al volumen de hueso esponjoso/fracción de volumen de tejido total; Tb.Th se refiere al grosor trabecular. La carga máxima y el estrés se midieron en el 6º cuerpo vertebral lumbar. * y ** son como se definieron anteriormente para la figura 2.

45 Las figuras 5a-c muestran que LLP2A-Ale aumenta la formación de hueso esponjoso en ratones jóvenes "normales". Los marcadores de recambio óseo medidos a partir del suero para Runx2 y Bglap1 se muestran en la figura 5a. Los marcadores de recambio óseo medidos a partir del suero para P1NP, osteocalcina y CTX-1 se muestran en la figura 5b.

La histomorfometría ósea basada en la superficie, realizada en los fémures distales derechos, se muestra en la figura 5c. ObS/BS, MAR, BFR/BS, * y ** son como se definieron anteriormente para la figura 2.

- 5 Las figuras 6a-b muestran que LLP2A-Ale aumenta la formación de hueso cortical en ratones jóvenes normales. Las secciones transversales representativas del fémur medio de ratones inyectados con cualquiera PBS, LLP2A, Ale o LLP2A-Ale (10 ng o 250 ng/ratón) se muestran en la figura 6a. Se administró rojo de alizarina a 20 mg/kg al inicio (antes de la inyección del compuesto de estudio) y se administró calceína (10 mg/kg) por vía subcutánea 7 días y 2 días antes de sacrificar los ratones. La histomorfometría ósea basada en la superficie, realizada en la superficie endocortical (Ec) y la superficie perióstica (Ps) cuatro semanas después de las inyecciones, se muestra en la figura 6b. * y ** son como se definieron anteriormente para la figura 2.
- 10 La figura 7 muestra que las células osteogénicas tienen una alta afinidad por LLP2A-Ale. Las MSCs de ratón se compraron de invitrogen (No. de catálogo S1502-100), se cultivaron en medio osteogénico durante 7 días y se incubaron con perlas Rainbow durante una hora. Las perlas de color violeta que muestran LLP2A, el ligando con alta afinidad y especificidad contra $\alpha 4\beta 1$, se cubrieron con capas de células (flechas verdes). Aumento original 10x a la derecha y 20x a la izquierda del panel superior.
- 15 La figura 8 muestra la distribución de Beta-glucuronidasa en diversos tejidos 24 horas después del trasplante de huMSCs en ratones NOD/SCID/MSPVII.
- La figura 9 muestra que LLP2A-Ale aumenta las poblaciones celulares proliferantes adyacentes a las superficies de hueso. Las secciones vertebrales de la 4ª lumbar descalcificadas se tiñeron doblemente con fosfatasa alcalina (tinción azul) y BrdU (bromodesoxiuridina) para controlar las células proliferantes (tinción marrón, flechas amarillas).
- 20 La figura 10 muestra el enfoque sintético de LLP2A-Ale que incluye la figura 10A: Síntesis del ácido 4-[(N'-2-metilfenil)ureido] fenilacético (UPA); Figura 10B: síntesis en fase sólida de LLP2A-Lys (D-Cys); Figura 10C: Preparación de LLP2A-Ale a través de la conjugación de LLP2A-Lys (D-Cys) con Ale-Mal.
- La figura 11 muestra la síntesis de LLP2A-Ale (1).
- La figura 12 muestra compuestos de ejemplos de la presente invención.
- 25 Las figuras 13A y B muestran que LLP2A-Ale aumenta la maduración, la función y la migración de los osteoblastos MSC sin afectar sus potenciales condrogénicos o adipogénicos.
- La figura 14 muestra (a) la retención de huMSCs trasplantadas en hueso 3 semanas después de la coinyección en ratones con LLP2A-Ale y huMSCs y aumento de osteoblastos y osteocitos en regiones de hueso (b) cortical y (b) trabecular en LVB 3 semanas después de la coinyección en ratones con LLP2A-Ale y huMSCs marcadas con GFP.
- 30 La figura 15 muestra que el tratamiento con LLP2A-Ale aumentó la superficie de los osteoblastos y formó puentes entre las trabéculas adyacentes en ratones inmunocompetentes (129SvJ).
- Las figuras 16A y B muestran que las tasas de formación de hueso en las superficies endocorticales de los ejes tibiales se incrementaron en grupos que tenían el componente LLP2A ($P < 0.05$) en ratones inmunocompetentes (129SvJ).
- 35 La figura 17 muestra que LLP2A-Ale previene el hueso trabecular relacionado con la edad después de la adquisición máxima de hueso en ratones C57BL/6.
- Las figuras 18A y B muestran que LLP2A-Ale aumenta los parámetros de formación de hueso en el DF trabecular ($P < 0.05$) en ratones C57BL/6.
- Las figuras 19A y B muestran que LLP2A-Ale aumenta los parámetros de formación de hueso en las superficies de hueso trabecular en los cuerpos vertebrales lumbares (LVB) en ratones C57BL/6.
- 40 La figura 20 muestra el esquema de ratones ovariectomizados (OVX) de 10 semanas tratados con PBS, Ale, LLP2, LLP2A-Ale o PTH 2 semanas después de la ovariectomía.
- La figura 21 representa análisis histomorfométricos de los cuerpos vertebrales de la 5ª lumbar después del tratamiento con LLP2A-Ale de ratones ovariectomizados de 10 semanas (OVX), que muestran aumentos en el número de osteoblastos, actividades y tasa de formación de hueso/posttratamiento de superficie del hueso (BFR/BS). Los análisis incluyeron área del hueso trabecular (%), superficie de los osteoblastos (Ob/BS), actividades de la superficie de mineralización (MS/BS) y BFR/BS ($P < 0.05$).
- 45 La figura 22 muestra que el tratamiento con LLP2A-Ale aumenta los números de osteoblastos en los cuerpos vertebrales lumbares (LVB) de ratones ovariectomizados (OVX) de 10 semanas. Imágenes fluorescentes

representativas del hueso trabecular en la 5ª LVB (panel superior: las puntas de flecha blancas ilustran los osteoblastos; panel inferior: las flechas amarillas ilustran superficies de hueso trabeculares marcadas doblemente).

5 La figura 23 representa los análisis histomorfométricos de los fémures medios derechos incluidos la formación de hueso en las superficies de hueso endosteal (Ec) o periosteal (Ps), y el grosor del hueso cortical de ratones ovariectomizados (OVX) de 10 semanas. Se observaron aumentos en la formación de hueso endocortical de OVX en los ratones tratados con LLP2A-Ale y PTH, sin embargo, el grosor del hueso cortical y el estrés máximo no se alteraron significativamente con OVX, Ale y LLP2A, una sola inyección IV de LLP2A o cuatro semanas de tratamiento con PTH. La flexión de tres puntos se realizó en fémures izquierdos para obtener el máximo estrés de los fémures.

10 La figura 24 muestra imágenes fluorescentes representativas de las secciones del fémur medio de ratones ovariectomizados de 10 semanas (OVX) y se observaron aumentos en la formación de hueso endocortical en los tratamientos con LLP2A-Ale y PTH. Las flechas amarillas cortas ilustraban superficies de hueso endocorticales marcadas doblemente. (a, $p < 0.05$ frente a Simulado; b, $P < 0.05$ frente a OVX+PBS, c, $P < 0.05$ frente a OVX+ LLP2A; d, $P < 0.05$ frente a OVX+Ale. Los datos se representan como la media \pm SD).

15 La figura 25 muestra la evaluación de la eficacia de LLP2A-Ale y LLP2A-Ale (1) en su capacidad para guiar a las células madre mesenquimales (MSC) al hueso, inyectamos 2×10^5 (GFP)-MSCs marcadas con fluorescencia verde por ratón a ratones C57BL/6 de 2 meses (experimento de 3 días) o a los de 5 meses (experimento de 3 semanas) mediante IV vena de la cola. LLP2A-Ale o LLP2A-Ale (1) se disolvieron en solución salina normal al 0.9% y se inyectaron I.P. a los ratones una hora después de MSC en una solución final de 0.9 nmol/ratón. Los ratones se sacrificaron ya sea a los 3 días o a las 3 semanas. La osteocalcina, un marcador de formación de hueso, se midió a los 3 días y 3 semanas después del
20 tratamiento. Los cuerpos vertebrales lumbares de los grupos de tratamiento de 3 días se congelaron y seccionaron con criostato. Las secciones se tiñeron luego con anticuerpo anti-GFP. Las MSC trasplantadas se tiñeron con Brown. Encontramos que tanto LLP2A-Ale como LLP2A-Ale (1) aumentaron significativamente los niveles de osteocalcina tanto en los tres días como en las tres semanas posteriores a los tratamientos. Las MSCs trasplantadas se observaron en la médula ósea y adyacentes a las superficies del hueso trabecular a los tres días.

25 Descripción detallada de la invención

I. General

La presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas de un ligando peptidomimético, por ejemplo LLP2A, conjugado con un bisfosfonato, por ejemplo, alendronato. Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles para el tratamiento de osteoporosis, el tratamiento de masa ósea baja,
30 el tratamiento de poblaciones de pacientes caracterizados por hueso fracturado o lesionado, y para la promoción del crecimiento óseo debido a su especificidad para la $\alpha_4\beta_1$ integrina en células madre mesenquimales y para la superficie del hueso.

II. Definiciones

35 Las abreviaturas usadas en este documento tienen su significado convencional dentro de las artes químicas y biológicas.

Como se usa en este documento, los términos "Ale" o "Alen" se refieren a alendronato.

Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$.

40 Como se usa en este documento, los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se usa en este documento, el término "alquilo" se refiere a un radical alifático saturado, lineal o ramificado que tiene el número de átomos de carbono indicado. Por ejemplo, alquilo C_1 - C_6 incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, iso-propilo, iso-butilo, sec-butilo, tert-butilo, etc.

45 Como se usa en este documento, el término "haloalquilo" se refiere a alquilo como se definió anteriormente en el que algunos o todos los átomos de hidrógeno están sustituidos con átomos de halógeno. Por ejemplo, haloalquilo incluye trifluorometilo, fluorometilo, 1,2,3,4,5-pentafluorofenilo, etc. El término "perfluoro" define un compuesto o radical que tiene al menos dos hidrógenos disponibles sustituidos con flúor. Por ejemplo, perfluorofenilo se refiere a 1,2,3,4,5-pentafluorofenilo, perfluorometano se refiere a 1,1,1-trifluorometilo, y perfluorometoxi se refiere a 1,1,1-trifluorometoxi.

50 Como se usa en este documento, el término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene desde 1 a 3 heteroátomos tales como N, O y S. Los heteroátomos adicionales también pueden ser útiles, que incluyen, pero no se

limitan a B, Al, Si y P. Los heteroátomos también se pueden oxidar, tal como, pero no se limitan a, S(O)- y -S(O)₂-. Por ejemplo, heteroalquilo puede incluir éteres, tioéteres, alquilaminas y alquiltioles.

Como se usa en este documento, el término "alcoxi" se refiere a alquilo con la inclusión de un átomo de oxígeno, por ejemplo, metoxi, etoxi, etc.

5 Como se usa en este documento, el término "arilo" se refiere a un conjunto de anillo aromático monocíclico o condensado bicíclico, tricíclico o mayor que contiene de 6 a 16 átomos de carbono en el anillo. Por ejemplo, arilo puede ser fenilo, bencilo o naftilo, preferiblemente fenilo. "Arieno" significa un radical divalente derivado de un grupo arilo. Los grupos arilo pueden estar mono, di o trisustituidos con uno, dos o tres radicales seleccionados entre alquilo, alcoxi, arilo, hidroxilo, halógeno, ciano, amino, aminoalquilo, trifluorometilo, alquilendioxi y oxi- alquileo C₂-C₃-; todos los cuales están
10 opcionalmente sustituidos adicionalmente, por ejemplo como se definió anteriormente; o 1- o 2- naftilo; o 1- o 2- fenantrenilo. Alquilendioxi es un sustituto divalente unido a dos átomos de carbono adyacentes de fenilo, por ejemplo metilendioxi o etilendioxi. Oxi- alquileo C₂-C₃- también es un sustituyente divalente unido a dos átomos de carbono adyacentes de fenilo, por ejemplo oxietileno u oxipropileno. Un ejemplo para oxi- alquileo C₂-C₃-fenilo es 2,3-dihidrobencofuran-5-ilo.

15 Preferido como arilo es fenilo o fenilo mono o disustituido por alquilo, heteroalquilo o halógeno.

Como se usa en este documento, el término "heteroarilo" se refiere a un conjunto de anillo aromático bicíclico o tricíclico monocíclico o condensado que contiene de 5 a 16 átomos en el anillo, donde de 1 a 4 de los átomos del anillo son un heteroátomo. Por ejemplo, heteroarilo incluye piridilo, indolilo, indazolilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzotienilo, benzofuranilo, furanilo, pirrolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, imidazolilo, tienilo o cualquier otro radical sustituido, especialmente mono o disustituido, por ejemplo alquilo, nitro o
20 halógeno. Piridilo representa 2-, 3- o 4-piridilo, ventajosamente 2- o 3-piridilo. Tienilo representa 2- o 3-tienilo. El quinolinilo representa preferiblemente 2-, 3- o 4-quinolinilo. El isoquinolinilo representa preferiblemente 1-, 3- o 4-isoquinolinilo. Benzopirranilo, benzotipirranilo representa preferiblemente 3-benzopirranilo o 3-benzotipirranilo, respectivamente. Tiazolilo representa preferiblemente 2- o 4-tiazolilo, y lo más preferido, 4-tiazolilo. El triazolilo es preferiblemente 1-, 2- o 5- (1,2,4-triazolilo). El tetrazolilo es preferiblemente 5-tetrazolilo.

25 Preferiblemente, heteroarilo es oxazolilo, imidazolilo, piridilo, indolilo, quinolinilo, pirrolilo, tiazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, imidazolilo, tienilo, furanilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, isoquinolinilo, benzotienilo, indazolilo o cualquiera de los radicales sustituido, especialmente mono o disustituido.

30 Los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan de: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'C(O)₂R', -NR'-C(O)NR'R''', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -N₃, -CH(Ph)₂, perfluoro alcoxi (C₁-C₄), y perfluoro alquilo (C₁-C₄), en un número que va desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos, y donde R', R'' y R''' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₈ y heteroalquilo, arilo no sustituido y heteroarilo, (arilo no sustituido) - alquilo (C₁-C₄), y (arilo no sustituido) oxi- alquilo (C₁-C₄).
35

Como se usa en este documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un conjunto de anillo saturado o parcialmente insaturado, monocíclico, bicíclico condensado o, policíclico en puente monocíclico, que contiene desde 3 a 12 átomos en el anillo, o el número de átomos indicado. Por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₈ incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y hasta ciclooctilo.

40 Como se usa en este documento, cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretenden incluir formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen aquellos grupos denominados a menudo alquileo, alqueno, heteroalquileo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero no limitado a: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R''', -NR'C(O)₂R', -NRC(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NR(SO₂)R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m' + 1), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₈ y heteroalquilo, arilo no sustituido y heteroarilo, (arilo no sustituido)- alquilo (C₁-C₄) y (arilo no sustituido) oxi- alquilo (C₁-C₄). Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' se entiende que incluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, un experto en el arte entenderá que el término "alquilo" se
45 entiende que incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).
50
55

- 5 Como se usa en este documento, el término "péptido" se refiere a un compuesto formado por una única cadena de D- o L-aminoácidos o una mezcla de D- y L-aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En general, los péptidos tienen una longitud de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 aminoácidos. Preferiblemente, los péptidos de la presente invención tienen una longitud de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 aminoácidos, más preferiblemente de 3 a 20 aminoácidos de longitud, y más preferiblemente de 3 a 10 aminoácidos de longitud.
- Como se usa en este documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural, no natural, y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural.
- 10 Como se usa en este documento, los términos "aminoácidos de origen natural" se refieren a aquellos aminoácidos que están codificados por el código genético, así como a aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los α -aminoácidos de origen natural incluyen, sin limitación, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y combinaciones de los mismos. Los
- 15 estereoisómeros de un α -aminoácido de origen natural incluyen, sin limitación, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), ácido D-aspártico (D-Asp), ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn), D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr) y combinaciones de los mismos.
- 20 Como se usa en este documento, los términos "aminoácidos no naturales" incluyen, sin limitación, análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, aminoácidos sintéticos, glicinas N-sustituidas y aminoácidos N-metilicos en la configuración ya sea L- o D- que funciona de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los "aminoácidos no naturales" no están codificados por el código genético y pueden, pero no necesariamente tienen la misma estructura básica que un aminoácido de origen natural.
- 25 Como se usa en este documento, los términos "análogos de aminoácidos" se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, esto es, un α carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.
- 30 Como se usa en este documento, los términos "miméticos de aminoácidos" se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos apropiados incluyen, sin limitación, β -aminoácidos y α -aminoácidos. En β -aminoácidos, el grupo amino está unido al átomo de β -carbono del grupo carboxilo de manera que hay dos átomos de carbono entre los grupos amino y carboxilo. En γ -aminoácidos, el grupo amino está
- 35 unido al átomo de γ -carbono del grupo carboxilo de manera que hay tres átomos de carbono entre los grupos amino y carboxilo. Los grupos R apropiados para β - o γ -aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural y aminoácidos no natural.
- Como se usa en este documento, los términos "glicinas N-sustituidas" se refieren a aminoácidos no natural basados en glicina, donde una cadena lateral de aminoácido está unida al átomo de nitrógeno de glicina. Las cadenas laterales de
- 40 aminoácidos apropiadas (por ejemplo, grupos R) incluyen, pero no se limitan a, cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural y cadenas laterales presentes en aminoácidos no naturales tales como análogos de aminoácidos.
- Los aminoácidos se pueden caracterizar por al menos una de varias propiedades. Por ejemplo, los aminoácidos pueden estar cargados positivamente, cargados negativamente, hidrofílicos o hidrófobos.
- 45 Como se usa en este documento, los términos "aminoácido cargado positivamente" se refieren a aquellos aminoácidos que tienen una cadena lateral básica o positivamente cargada a valores de pH por debajo del pKa, e incluyen, pero no se limitan a, Lys, Arg, HoArg, Agp, Agb, Dab, Dap y Orn y estereoisómeros de los mismos. Los aminoácidos básicos generalmente se pueden denominar con el símbolo "X⁺".
- 50 Como se usa en este documento, los términos "aminoácido cargado negativamente" se refieren a aquellos aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida o cargada negativamente a valores de pH por encima del pKa, e incluyen, pero no se limitan a, Asp, Glu, Aad, Bec y estereoisómeros de los mismos. Los aminoácidos ácidos generalmente pueden referirse al símbolo "X⁻". Un experto en el arte apreciará que otros aminoácidos básicos y ácidos son conocidos en la técnica.
- 55 Como se usa en este documento, los términos "aminoácidos cargados de forma neutral" se refieren a aquellos aminoácidos que tienen una cadena lateral con carga neutra a valores de pH iguales a pKa.

Como se usa en este documento, los términos "aminoácido hidrófilo" se refieren a aquellos aminoácidos que tienen una cadena lateral polar y no cargada e incluyen, pero no se limitan a, Asn, Ser, Thr, y Gln.

5 Como se usa en este documento, los términos "aminoácidos hidrófobos" se refieren a aquellos aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba e incluyen, pero no se limitan a, Val, Leu, Ile, Met, y Phe. Preferiblemente, el aminoácido hidrófobo se selecciona de prolina, un análogo de prolina y un estereoisómero del mismo. Preferiblemente, el análogo de prolina es hidroxiprolina.

10 Como se usa en este documento, los términos "D-aminoácidos" se refieren al estereoisómero D de un aminoácido. Las letras D y L se usan convencionalmente en la técnica para referirse a los estereoisómeros de un aminoácido. Los D-aminoácidos son aquellos aminoácidos que se podrían sintetizar a partir del isómero dextrógiro del gliceraldehído, es decir, D-gliceraldehído. De forma similar, los L-aminoácidos son aquellos aminoácidos que se podrían sintetizar a partir del isómero levorotario de gliceraldehído, esto es, L-gliceraldehído.

Se pueden hacer referencia a los aminoácidos en este documento por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden ser referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

15 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o elimina el único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos. en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar (es decir, hidrófobo, hidrófilo, cargado positivamente, neutro, cargado negativamente). El aminoácido químicamente similar incluye, sin limitación, un aminoácido de origen natural tal como un L-aminoácido, un estereoisómero de un aminoácido de origen natural tal como un D-aminoácido y un aminoácido no natural tal como un análogo de aminoácido, mimético de aminoácido, aminoácido sintético, glicina N-sustituída y N-metilaminoácido. Los aminoácidos hidrófobos de ejemplo incluyen valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina y triptófano. Los aminoácidos aromáticos de ejemplo incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos alifáticos de ejemplo incluyen serina y treonina. Los aminoácidos básicos de ejemplo incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos de ejemplo con cadenas laterales de carboxilato incluyen aspartato y glutamato. Los aminoácidos de ejemplo con cadenas laterales de carboxamida incluyen asparaginas y glutamina. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes conservativamente modificadas son además de, y no excluyen, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

30 Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones en las que un aminoácido alifático (por ejemplo, G, A, I, L o V) está sustituido con otro miembro del grupo. De manera similar, un grupo alifático polar no cargado tal como C, S, T, M, N o Q, puede ser sustituido por otro miembro del grupo; y los residuos básicos, por ejemplo, K, R o H, pueden sustituirse entre sí.

35 En algunas realizaciones, un aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, E o D, puede estar sustituido con su homólogo no cargado, por ejemplo, Q o N, respectivamente; o viceversa. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene otros aminoácidos de ejemplo que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Alanina (A), glicina (G);

2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);

40 3) Asparagina (N), glutamina (Q);

4) Arginina (R), lisina (K);

5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);

6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);

7) Serina (S), treonina (T); y

45 8) Cisteína (C), metionina (M)

(véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

50 Como se usa en este documento, el término "enlazante" se refiere a una unidad estructural que posee uno o más grupos funcionales reactivos diferentes que permite la unión covalente de unidades estructurales tales como un péptido a un agente quelante. Preferiblemente, la unidad estructural de enlace posee dos grupos funcionales reactivos diferentes, esto es, un enlazante heterobifuncional. Los enlazantes apropiados incluyen, sin limitación, los disponibles

en Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). En realizaciones preferidas de la presente invención, el enlazante proporciona un grupo carboxilo para la unión de un agente quelante y un grupo amino para la unión de un péptido. Sin embargo, un experto en el arte entiende que cualquier grupo funcional reactivo puede estar presente en el enlazante, siempre que sea compatible con un grupo funcional en la unidad estructural que se va a unir covalentemente.

5 Los enlazantes útiles en la presente invención incluyen aquellos que poseen uno o más grupos funcionales reactivos diferentes que permiten la unión covalente de unidades estructurales tales como un péptido a un agente quelante. La unidad estructural de enlace posee dos o más grupos funcionales reactivos diferentes. En algunos casos, se pueden usar enlazantes multivalentes. Los enlazantes apropiados incluyen, sin limitación, los disponibles en Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). En realizaciones preferidas de la presente invención, el enlazante proporciona un grupo carboxilo para la unión de un agente quelante y un grupo amino para la unión de un péptido. Sin embargo, un experto en el arte entiende que cualquier grupo funcional reactivo puede estar presente en el enlazante, siempre que sea compatible con un grupo funcional en la unidad estructural que se va a unir covalentemente. Como se usa en este documento, el término "conjugado de agente quelante-enlazante" se refiere a un agente quelante covalentemente unido a un enlazante. Tales conjugados de agente quelante-enlazante se pueden unir a un péptido a través de un grupo funcional presente en el enlazante. Algunos enlazantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, β -alanina, 2,2'-etilendioxi-bis (etilamina) monosuccinamida (Ebes) y bis (Ebes)-Lys. Otros enlazantes apropiados incluyen aquellos con biotina. Se pueden encontrar enlazantes adicionales en Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, 2d ed., 2008 (incorporado como referencia en su totalidad en este documento).

20 Como se usa en este documento, el término "sal" se refiere a sales ácidas o básicas de los compuestos usados en los métodos de la presente invención. Ejemplos ilustrativos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de ácido mineral (ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico y similares), sales de ácidos carboxílicos orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido glutámico, ácido cítrico y similares), ácidos sulfónicos orgánicos (metanosulfónico. ácido), sales de amonio cuaternario (yoduro de metilo, yoduro de etilo y similares). Se entiende que las sales farmacéuticamente aceptables no son tóxicas. Se puede encontrar información adicional sobre sales farmacéuticamente aceptables apropiadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, que se incorpora en este documento como referencia.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos ácidos de la presente invención incluyen sales formadas con bases, a saber sales catiónicas tales como sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, así como sales de amonio, tales como sales de amonio, trimetilamonio, dietilamonio y tris-(hidroximetil)-metil-amonio.

Como se usa en este documento, el término "hidrato" se refiere a un compuesto que está formando complejo con al menos una molécula de agua. Los compuestos de la presente invención pueden formar un complejo con 1 a 10 moléculas de agua.

35 Como se usa en este documento, los términos "excipiente farmacéuticamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se refieren a una sustancia que ayuda a la administración de un agente activo y a la absorción por un sujeto. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que se puede incluir en las composiciones de la invención y que no causa ningún efecto toxicológico adverso significativo sobre el paciente. Los ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, soluciones salinas normales, Ringer lactato, sacarosa normal, glucosa normal, aglutinantes, cargas, disgregantes, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, sabores y colores, y similares. Un experto en el arte reconocerá que otros excipientes farmacéuticos son útiles en la presente invención.

Como se usa en este documento, el término "osteoporosis" se refiere a una enfermedad de fragilidad ósea aumentada que resulta de la deficiencia de estrógeno y el envejecimiento.

45 Como se usa en este documento, el término "isómeros" se refiere a compuestos con la misma fórmula química pero que son estructuralmente distinguibles.

Como se usa en este documento, el término "tautómero" se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra.

50 Como se usa en este documento, los términos "paciente" o "sujeto" se refieren a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que puede tratarse mediante la administración de una composición farmacéutica como se proporciona en este documento. Los ejemplos no limitantes incluyen humanos, otros mamíferos y otros animales no mamíferos.

55 Como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente funcional conjugado o de una composición farmacéutica útil para tratar o mejorar una enfermedad o afección identificada, o para mostrar un efecto terapéutico o inhibidor detectable. El efecto se puede detectar mediante cualquier método de ensayo conocido en la técnica.

5 Como se usa en este documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, que incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción; remisión; disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente; ralentización en la tasa de degeneración o declive; haciendo que el punto final de degeneración sea menos debilitante; mejorar el bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o la mejora de los síntomas pueden basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, exámenes neuropsiquiátricos y/o una evaluación psiquiátrica. Por ejemplo, los métodos de la invención tratan con éxito el delirio de un paciente disminuyendo la incidencia de alteraciones en la conciencia o la cognición.

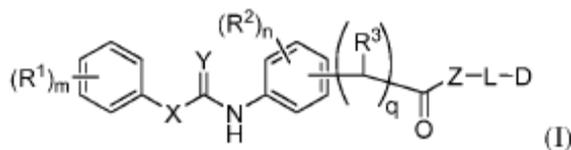
10 Como se usa en este documento, los términos "trastorno" o "afección" se refieren a un estado del ser o estado de salud de un paciente o sujeto capaz de ser tratado con los moduladores del receptor de glucocorticoides de la presente invención.

15 Como se usa en este documento, los términos "un", "una", o "un(a)", cuando se usan en referencia a un grupo de sustituyentes o "grupo sustituyente" en este documento, significan al menos uno. Por ejemplo, cuando un compuesto está sustituido con "un" alquilo o arilo, el compuesto está opcionalmente sustituido con al menos un alquilo y/o al menos un arilo, en el que cada alquilo y/o arilo es opcionalmente diferente. En otro ejemplo, cuando un compuesto está sustituido con "un" grupo sustituyente, el compuesto está sustituido con al menos un grupo sustituyente, en el que cada grupo sustituyente es opcionalmente diferente.

20 La descripción de los compuestos de la presente invención está limitada por los principios de enlace químico conocidos para los expertos en el arte. De acuerdo con lo anterior, cuando un grupo puede estar sustituido con uno o más de un número de sustituyentes, tales sustituciones se seleccionan para cumplir con los principios de enlace químico y para dar compuestos que no son inherentemente inestables y/o serían conocidos para un experto normal en el arte es probable que sea inestable en condiciones ambientales, tales como condiciones acuosas, neutras o fisiológicas.

III. Compuestos

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



30 en la que la fórmula I, cada R^1 y R^2 se selecciona independientemente entre H, halógeno, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} . R^3 se selecciona de H, alquilo C_{1-6} y cicloalquilo C_{3-8} . X se selecciona de O, S y NH. Y se selecciona de O y NH. Alternativamente, R^1 o R^2 se combina con Y y los átomos a los que están unidos forman un anillo heteroarilo de 5 miembros. Z es un péptido que tiene 3-20 aminoácidos seleccionados independientemente, en la que al menos un aminoácido se selecciona de un aminoácido no natural y un D-aminoácido. L es un enlazante. D es un fármaco de bisfosfonato como se definió anteriormente. Los subíndices m, n y q son cada uno independientemente de 0 a 2. También se incluyen las sales e isómeros de los compuestos de fórmula I.

35 Los grupos cicloalquilo C_{3-8} útiles con la presente invención incluyen, pero no se limitan, ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano. Preferiblemente, los grupos cicloalquilo C_{3-8} incluyen ciclohexano. Los grupos heteroarilo de 5 miembros útiles con la presente invención incluyen, pero no se limitan, imidazol, oxazol, isoxazol, tiazol e isotiazol.

40 Los aminoácidos útiles con la presente invención incluyen, sin limitación, aminoácidos de origen natural; D-aminoácidos; aminoácidos no natural que incluyen, sin limitación, análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, glicinas N-sustituidas, N-metilaminoácidos, análogos de fenilalanina y derivados de lisina (Lys), ornitina (Orn) y ácido α , γ -diaminobutírico (Dbu) en la configuración ya sea L o D; aminoácidos hidrófilos, aminoácidos hidrófobos; y aminoácidos con carga negativa.

45 Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los α -aminoácidos de origen natural incluyen, sin limitación, alanina (Ala), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), asparagina (Asn), prolina (Pro), glutamina (Gln), serina (Ser), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), y combinaciones de los mismos.

Los estereoisómeros de un α -aminoácido de origen natural incluyen, sin limitación, D- y L-aminoácidos. D-aminoácidos apropiados para uso en la presente invención incluyen, sin limitación, D-alanina (D-Ala), D-cisteína (D-Cys), ácido D-

aspártico (D-Asp), ácido D-glutámico (D-Glu), D-fenilalanina (D-Phe), D-histidina (D-His), D-isoleucina (D-Ile), D-arginina (D-Arg), D-lisina (D-Lys), D-leucina (D-Leu), D-metionina (D-Met), D-asparagina (D-Asn), D-prolina (D-Pro), D-glutamina (D-Gln), D-serina (D-Ser), D-treonina (D-Thr), D-valina (D-Val), D-triptófano (D-Trp), D-tirosina (D-Tyr), y combinaciones de los mismos. En algunas otras realizaciones, el D-aminoácido se selecciona de un D- α -aminoácido, un D- β -aminoácido, un D- γ -aminoácido, y una combinación de los mismos. En otra realización más, el D- α -aminoácido se selecciona de un estereoisómero de un α -aminoácido de origen natural, un D- α -aminoácido no natural, y una combinación de los mismos.

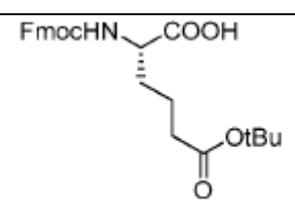
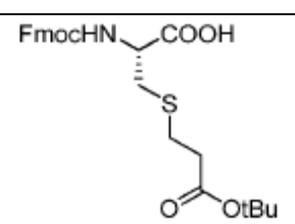
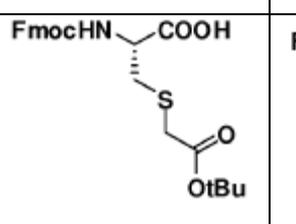
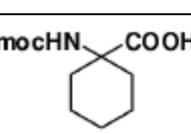
Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, glicinas N-sustituidas, N-metilaminoácidos, análogos de fenilalanina y derivados de lisina (Lys), ornitina (Orn) y ácido α , γ -diaminobutírico (Dbu) en la configuración L o D que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos no naturales no están codificados por el código genético, y pueden, pero no necesariamente, tener la misma estructura básica o función que un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos no naturales útiles con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido azetidínacarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, ornitina, pentilglicina, ácido pipercolico, tioprolina, aminofenilalanina, hidroxitirosina y aminotirosina.

En algunas otras realizaciones, el aminoácido no natural se selecciona de ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico (Acp), ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico (Acb), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (Acpc), citrulina (Cit), homocitrulina (HoCit), ácido α -aminohexanodioico (Aad), 3- (4-piridil) alanina (4-Pal), 3- (3-piridil) alanina (3-Pal), propargilglicina (Pra), ácido α -aminoisobutírico (Aib), ácido α -aminobutírico (Abu), norvalina (Nva), ácido α , β -diaminopropiónico (Dpr), ácido α , γ -diaminobutírico (Dbu), α -tert-butilglicina (Bug), 3,5-dinitrotirosina Tyr (3,5-di NO₂), norleucina (Nle), 3-(2-naftil) alanina (Nal-2), 3- (1-naftil) alanina (Nal-1), ciclohexilalanina (Cha), di-n-propilglicina (Dpg), ciclopropilalanina (Cpa), homoleucina (Hle), homoserina (HoSer), homoarginina (Har), homocisteína (Hcy), metionina sulfóxido (Met (O)), metionina metilsulfonio (Met (S-Me)), α -ciclohexilglicina (Chg), 3-benzo-tienilalanina (Bta), taurina (Tau), hidroxiprolina (Hyp), O-bencil- hidroxiprolina (Hyp (Bzl)), homoprolina (HoPro), β -homoprolina (β HoPro), ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), ácido nipecótico (Nip), ácido isonipecótico (IsoNip), 3-carboximetil-1-fenil-1,3,8-triazaespiro [4,5] decan-4-ona (Cptd), ácido tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico (3-Tic), ácido 5H-tiazolo [3,2-a] piridina-3- carboxílico (Btd), ácido 3-aminobenzoico (3-Abz), 3-(2-tienil)alanina (2-Thi), 3-(3-tienil)alanina(3-Thi), ácido α -aminooctanodioico (Asu), dietilglicina (Deg), 4-amino-4-carboxi-1,1-dioxo-tetrahidropirano (AcDt), ácido 1-amino-1- (4-hidroxiciclohexil) carboxílico (Ahch), ácido 1-amino-1- (4-cetociclohexil) carboxílico (Akch), 4-amino-4-carboxitetrahidropirano (Actp), 3-nitrotirosina (Tyr (3-NO₂)), ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico (Ach), ácido 1-amino- 1- (3-piperidinil) carboxílico (3-Apc), ácido 1-amino-1- (4-piperidinil) carboxílico (4-Apc), ácido 2-amino-3- (4-piperidinil) propiónico (4- App), ácido 2-aminoindano-2-carboxílico (Aic), ácido 2-amino-2-naftilacético (Ana), ácido (2S, 5R)-5-fenilpirrolidina-2-carboxílico (Ppca), 4-tiazoilalanina (Tha), ácido 2-aminooctanoico (Aoa), ácido 2-aminoheptanoico (Aha), ornitina (Orn), ácido azetidina-2-carboxílico (Aca), ácido α -amino-3-cloro-4,5-dihidro-5-isoazolecético (AcDi), ácido tiazolidin-2-carboxílico (Thz (2-COOH)), alilglicina (Agl), ácido 4-ciano-2-aminobutírico (Cab), 2-piridilalanina (2-Pal), 2-quinoilalanina (2-Qal), ciclobutilalanina (Cba), un análogo de fenilalanina, un derivado de lisina, un derivado de ornitina (Orn), un derivado del ácido α , γ -diaminobutírico Dbu, estereoisómeros de los mismos, y combinaciones de los mismos (véase, Liu and Lam, Anal. Biochem., 295:9-16 (2001)). Como tal, los α -aminoácidos no naturales están presentes como L- α -aminoácidos no natural, D- α -aminoácidos no natural o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales se seleccionan de los compuestos de la tabla 1:

Tabla 1. Aminoácidos no natural útiles con la presente invención.

Fmoc-Aad(OtBu)-OH	Fmoc-Bec(OtBu)-OH	Fmoc-Bmc(OtBu)-OH	Fmoc-Ach-OH
			

Los análogos de aminoácidos apropiados incluyen, sin limitación, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metil sulfonio metionina.

Los miméticos de aminoácidos apropiados incluyen, sin limitación, β -aminoácidos y γ -aminoácidos. Los grupos R apropiados para β - o γ -aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural y aminoácidos no natural.

Las glicinas N-sustituidas apropiadas para uso en la presente invención incluyen, sin limitación, N-(2-aminoetil) glicina, N-(3-aminopropil) glicina, N-(2-metoxietil) glicina, N-bencilglicina, (S)-N-(1-feniletil)glicina, N-ciclohexilmetilglicina, N-(2-feniletil)glicina, N-(3-fenilpropil)glicina, N-(6-aminogalactosil)glicina, N-(2-(3'-indoliletil) glicina, N-(2-(p-metoxifeniletil))glicina, N-(2-(p-clorofeniletil) glicina y N-[2-(p-hidroxifeniletil)] glicina. Los oligómeros de glicina N-sustituida, denominados en este documento "peptoides", han demostrado ser resistentes a las proteasas (Miller et al., Drug Dev. Res., 35:20-32 (1995)). Como tales, los peptoides que contienen al menos un α -aminoácido no natural, el D-aminoácido o una combinación de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Los N-metil-aminoácidos apropiados incluyen N-metil-Ala, N-metil-Cys, N-metil-Asp, N-metil-Glu, N-metil-Phe, N-metil-Gly, N-metil-His, N-metil-Ile, N-metil-Arg, N-metil-Lys, N-metil-Leu, N-metil-Met, N-metil-Asn, N-metil-Gln, N-metil-Ser, N-metil-Thr, N-metil-Val, N-metil-Trp, N-metil-Tyr, N-metil-Acp, N-metil-Acb, N-metil-Acpc, N-metil-Cit, N-metil-HoCit, N-metil-Aad, N-metil-4-Pal, N-metil-3-Pal, N-metil-Pra, N-metil-Aib, N-metil-Abu, N-metil-Nva, N-metil-Dpr, N-metil-Dbu, N-metil-Nle, N-metil-Nal-2, N-metil-Nal-1, N-metil-Cha, N-metil-Cpa, N-metil-Hle, N-metil-HoSer, N-metil-Har, N-metil-Hcy, N-metil-Chg, N-metil-Bta, N-metil-2-Thi, N-metil-3-Thi, N-metil-Asu, N-metil-Acdt, N-metil-Ahch, N-metil-Akch, N-metil-Actp, N-metil-Tyr(3-NO₂), N-metil-Ach, N-metil-3-Apc, N-metil-4-Apc, N-metil-4-App, N-metil-Tha, N-metil-Aoa, N-metil-Aha, N-metil-Orn, N-metil-Aca, N-metil-Agl, N-metil-Cab, N-metil-2-Pal, N-metil-Cba, N-metil-HoPhe, N-metil-Phg, N-metil-Phe(4-NH₂), N-metil-4-Phe(4-Me), N-metil-Phe(4-F), N-metil-Phe(4-Cl), N-metil-Phe(2-Br), N-metil-Phe(3-Br), N-metil-Phe(4-Br), N-metil-Phe(3-CF₃), N-metil-Phe(4-CF₃), N-metil-Phe(4-NO₂), N-metil-Phe(4-CN), N-metil-Bpa, N-metil-Phg(4-Cl), N-metil-Phg(4-Br), N-metil-Tyr(Me), N-metil-Lys38, N-metil-Lys27, N-metil-Lys73, N-metil-Lys55, N-metil-Lys28, N-metil-Lys72, N-metil-Lys12, N-metil-Lys123, N-metil-Lys63, N-metil-Lys124, N-metil-Lys82, N-metil-Lys31, N-metil-Lys15, N-metil-Lys125, N-metil-Lys43, N-metil-Lys24, N-metil-Lys5, N-metil-Lys4, N-metil-Lys50, N-metil-Lys81, N-metil-Orn38, N-metil-Orn27, N-metil-Orn73, N-metil-Orn55, N-metil-Orn28, N-metil-Orn72, N-metil-Orn12, N-metil-Orn123, N-metil-Orn63, N-metil-Orn124, N-metil-Orn82, N-metil-Orn31, N-metil-Orn15, N-metil-Orn125, N-metil-Orn43, N-metil-Orn24, N-metil-Orn5, N-metil-Orn4, N-metil-Orn50, N-metil-Orn81, N-metil-Dbu38, N-metil-Dbu27, N-metil-Dbu73, N-metil-Dbu55, N-metil-Dbu28, N-metil-Dbu72, N-metil-Dbu12, N-metil-Dbu123, N-metil-Dbu63, N-metil-Dbu124, N-metil-Dbu82, N-metil-Dbu31, N-metil-Dbu15, N-metil-Dbu125, N-metil-Dbu43, N-metil-Dbu24, N-metil-Dbu5, N-metil-Dbu4, N-metil-Dbu50, N-metil-Dbu81, estereoisómeros de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Los análogos de fenilalanina apropiados útiles con la presente invención incluyen, sin limitación, homofenilalanina (HoPhe), fenilglicina (Phg), 3,3-difenilalanina (Dpa), 4-aminofenilalanina (Phe(4-NH₂)), 2-metilfenilalanina (Phe(2-Me)), 3-metilfenilalanina (Phe(3-Me)), 4-metilfenilalanina (Phe(4-Me)), 4-azidofenilalanina (Phe(4-N₃)), 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)), 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)), 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)), 2-clorofenilalanina (Phe(2-Cl)), 3-clorofenilalanina (Phe(3-Cl)), 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)), 2-bromofenilalanina (Phe(2-Br)), 3-bromofenilalanina (Phe(3-Br)), 4-bromofenilalanina (Phe(4-Br)), 2-yodofenilalanina (Phe(2-I)), 3-yodofenilalanina (Phe(3-I)), 4-yodofenilalanina (Phe(4-I)), 2-trifluorometilfenilalanina (Phe(2-CF₃)), 3-trifluorometilfenilalanina (Phe(3-CF₃)), 4-trifluorometilfenilalanina (Phe(4-CF₃)), 2-metoxifenilalanina (Phe(2-OMe)), 3-metoxifenilalanina (Phe(3-OMe)), 2-nitrofenilalanina (Phe(2-NO₂)), 3-nitrofenilalanina (Phe(3-NO₂)), 4-nitrofenilalanina (Phe(4-NO₂)), 2-cianofenilalanina (Phe(2-CN)), 3-cianofenilalanina (Phe(3-CN)), 4-cianofenilalanina (Phe(4-CN)), 3,4-dimetoxifenilalanina (Phe(3,4-di OMe)), 3,4-difluorofenilalanina (Phe(3,4-di F)), 3,5-difluorofenilalanina (Phe(3,5-di F)), 2,4-diclorofenilalanina (Phe(2,4-di Cl)), 3,4-diclorofenilalanina (Phe(3,4-di Cl)), 4-benzoilfenilalanina (Bpa), 4-carboxifenilalanina (Phe(4-COOH)), 4,4'-bifenilalanina (Bip), 2,3,4,5,6-pentafluorofenilalanina (Phe(F₅)), 3,4,5-trifluorofenilalanina (Phe(F₃)), 4-clorofenilglicina (Phg(4-Cl)), 2-clorofenilglicina (Phg(2-Cl)), 3-clorofenilglicina (Phg(3-Cl)), 4-bromofenilglicina (Phg(4-Br)), 2-bromofenilglicina (Phg(2-Br)), 3-bromofenilglicina (Phg(3-Br)), 4-etilfenilalanina (Phe(4-Et)), 4-etoxifenilalanina (Phe(4-OEt)), 4-butoxifenilalanina (Phe(4-OBu)), O-metiltirosina (Tyr(Me)), O-benciltirosina (Tyr(Bzl)), 3,5-dibromotirosina (Tyr(diBr)), 3,5-diyodotirosina (Tyr(dil)), homotirosina (HoTyr), 3-clorotirosina (Tyr(3-Cl)), estereoisómeros de los mismos, y combinaciones de los mismos.

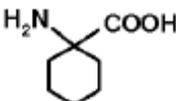
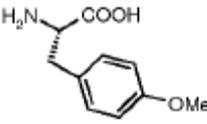
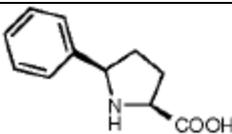
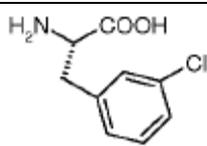
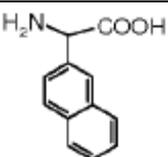
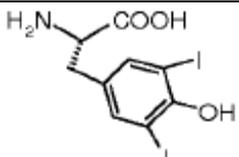
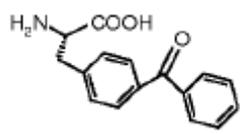
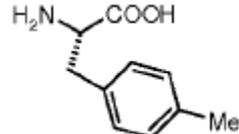
Derivados apropiados de lisina (Lys), ornitina (Orn) y α,γ -diaminobutírico ácido (Dbu) útil con la presente invención incluyen, sin limitación, Lys38, Lys27, Lys73, Lys55, Lys28, Lys72, Lys12, Lys123, Lys63, Lys124, Lys82, Lys31, Lys15, Lys125, Lys43, Lys24, Lys5, Lys4, Lys50, Lys81, Orn38, Orn27, Orn73, Orn55, Orn28, Orn72, Orn12, Orn123, Orn63, Orn124, Orn82, Orn31, Orn15, Orn125, Orn43, Orn24, Orn5, Orn4, Orn50, Orn81, Dbu38, Dbu27, Dbu73, Dbu55, Dbu28, Dbu72, Dbu12, Dbu123, Dbu63, Dbu124, Dbu82, Dbu31, Dbu15, Dbu125, Dbu43, Dbu24, Dbu5, Dbu4, Dbu50, Dbu81, estereoisómeros de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los derivados de Orn y Dbu son similares a los derivados de lisina con el correspondiente ácido carboxílico unido a la cadena lateral de Orn y Dbu, respectivamente.

Los aminoácidos hidrófilos apropiados útiles con la presente invención incluyen, sin limitación, Val, Leu, Ile, Met, y Phe y estereoisómeros de los mismos.

Los aminoácidos hidrófobos apropiados útiles con la presente invención incluyen, sin limitación, los compuestos de la tabla 2:

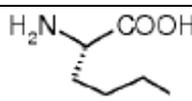
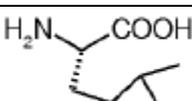
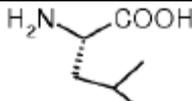
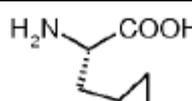
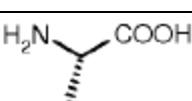
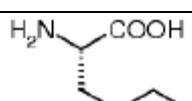
Tabla 2. Aminoácidos hidrófobos útiles en la presente invención.

No.	X _{AA}	Estructura	No.	X _{AA}	Estructura
1	Ile		14	Val	
2	Ala		15	Acpc	
3	Abu		16	Thi	
4	Leu		17	Nle	
5	Pra		18	D-Nal-2	
6	Chg		19	Aic	
7	Nva		20	D-Phe	
8	Phg		21	HoPhe	
9	Cha		22	Tyr	

10	Ach		23	Tyr(Me)	
11	Ppca		24	Phe(3-Cl)	
12	Ana		25	Tyr(dil)	
13	Bpa		26	Phe(4-Me)	

En algunas otras realizaciones, el aminoácido hidrófobo se selecciona de los compuestos de la tabla 3:

Tabla 3. Aminoácidos hidrófobos útiles en la presente invención.

No.	X _{AA}	Estructura	No.	X _{AA}	Estructura
1	Nle		4	HLe	
2	Leu		5	Cpa	
3	Pra		6	Cha	

- 5 En algunas otras realizaciones, el aminoácido hidrófobo se selecciona independientemente de leucina (Leu), un análogo de leucina, fenilalanina (Phe), un análogo de fenilalanina, prolina (Pro), un análogo de prolina, valina (Val), isoleucina (Ile), glicina (Gly), alanina (Ala), Met, norvalina (Nva), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (Acpc), ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico (Acb), α -ciclohexilglicina (Chg), ácido α -aminoisobutírico (Aib), ácido α -aminobutírico (Abu), 3-(2-tienil) alanina (2-Thi), 3-(3-tienil) alanina (3-Thi), 3-(3-piridil) alanina (3-Pal), 3-(2-naftil) alanina (Nal-2),
- 10 ácido 2-amino-2-naftilacético (Ana), 3,5-dinitrotirosina (Tyr (3,5-di NO₂)), dietilglicina (Deg), 4-amino-4-carboxi-1,1-dioxotetrahidropirano (Acdt), ácido 1-amino-1-(4-hidroxiciclohexil) carboxílico (Ahch), ácido 1-amino-1-(4-cetociclohexil) carboxílico (Akch), 4-amino-4-carboxitetrahidropirano (Actp), 3-nitrotirosina (Tyr (3-NO₂)), ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico (Ach), ácido 2-aminoindano-2-carboxílico (Aic), ácido (2S, 5R)-5-fenilpirrolidina-2-carboxílico (Ppca), 4-tiazoilalanina (Tha), ácido 2-aminooctanoico (Aoa), ácido 2-aminoheptanoico (Aha) y un estereoisómero del mismo. Preferiblemente, el análogo de prolina es hidroxiprolina.
- 15

Los aminoácidos con carga negativa apropiados útiles con la presente invención incluyen, sin limitación, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido α -aminohexanoico, ácido α -aminooctanoico, ácido homospártico, ácido γ -carboxi-glutámico, 4-carboxifenilalanina y un estereoisómero de los mismos. En otras realizaciones, el aminoácido cargado negativamente se selecciona de Aad, Bec y Bmc.

5 Los fármacos de bifosfonato ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, etidronato (Didronel), clodronato (Bonifos, Loron), tiludronato (Skelid), pamidronato (APD, Aredia), neridronato, olpadronato, alendronato (Fosamax), ibandronato (Boniva), risedronato (Actonel) y zoledronato (Zometa). Los bifosfonatos adicionales se describen a continuación con mayor detalle. Un experto en el arte apreciará que otros bisfosfonatos son útiles en la presente invención.

10 Las sales incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, ácido fosfónico, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tantano, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (esto es, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Otras sales incluyen, pero no se limitan a, sales con bases inorgánicas que incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de litio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de aluminio; y sales de amonio, tales como sales de amonio, trimetilamonio, dietilamonio y tris-(hidroximetil)-metil-amonio. Otras sales con bases orgánicas incluyen sales con dietilamina, dietanolamina, meglumina y N, N'-dibenciletilendiamina.

20 Los enlazantes útiles en la presente invención incluyen aquellos que poseen uno o más grupos funcionales reactivos diferentes que permiten la unión covalente de unidades estructurales tales como péptidos, monómeros y polímeros. La unidad estructural de enlace posee dos o más grupos funcionales reactivos diferentes. En algunos casos, se pueden usar enlazantes multivalentes y se pueden unir múltiples péptidos de la presente invención y/o múltiples agentes activos a través del enlazante. Los enlazantes apropiados incluyen, sin limitación, los disponibles en Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Un experto en el arte entiende que cualquier grupo funcional reactivo puede estar presente en el enlazante, siempre que sea compatible con un grupo funcional en la unidad estructural que se une covalentemente.

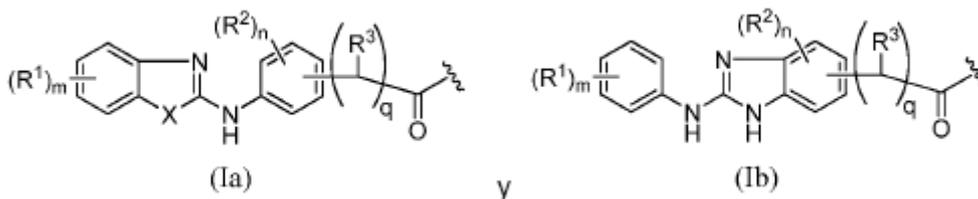
25 Algunos enlazantes apropiados incluyen, pero no se limitan, β -alanina, 2,2'-etilendioxi-bis (etilamina) monosuccinamida (Ebes), bis(Ebes)-Lys y polietilenglicol. Otros enlazantes apropiados incluyen aquellos con biotina. Se pueden encontrar enlazantes adicionales en Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, 2d ed., 2008 (incorporado como referencia en su totalidad en este documento).

30 Una persona experta en la técnica reconocerá que otros enlazantes son posibles con los compuestos de la presente invención. Muchos de tales enlazantes se pueden encontrar o preparar mediante las técnicas citadas en "Bioconjugate Techniques" by Greg T Hermanson, Academic Press, San Diego, 1996, que se incorpora en este documento como referencia. Además, una persona experta en la técnica reconocerá que se pueden preparar otros enlazantes basados en técnicas sintéticas Click Chemistry como se describe en Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., Angew. Chem. Int'l. Ed. 40 (11): 2004-2021 (2001), que se incorpora en este documento como referencia. Los enlazantes útiles con la presente invención incluyen aquellos basados en la unidad estructural EBES y PEG. El enlazante puede incluir ya sea de 0 a 6 grupos EBES o PEG. Los grupos EBES y PEG se pueden conjugar mediante las técnicas mencionadas anteriormente.

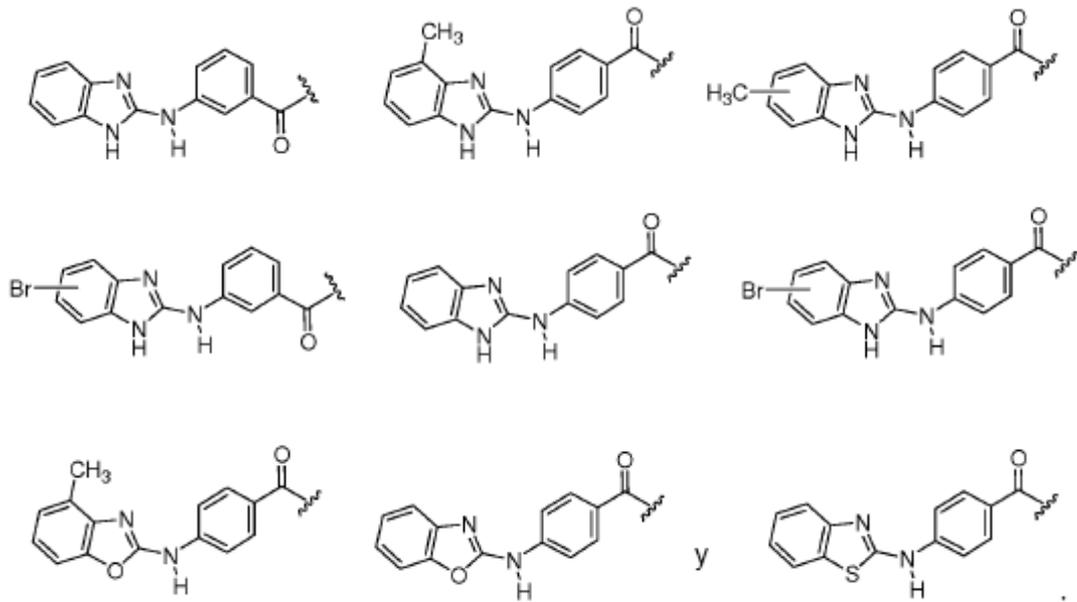
40 También son posibles las sales de adición de ácido, tales como ácidos minerales, ácidos carboxílicos orgánicos y ácidos sulfónicos orgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, siempre que un grupo básico, tal como piridilo, constituya parte de la estructura.

Las formas neutras de los compuestos se pueden regenerar poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en solventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma original del compuesto para los fines de la presente invención.

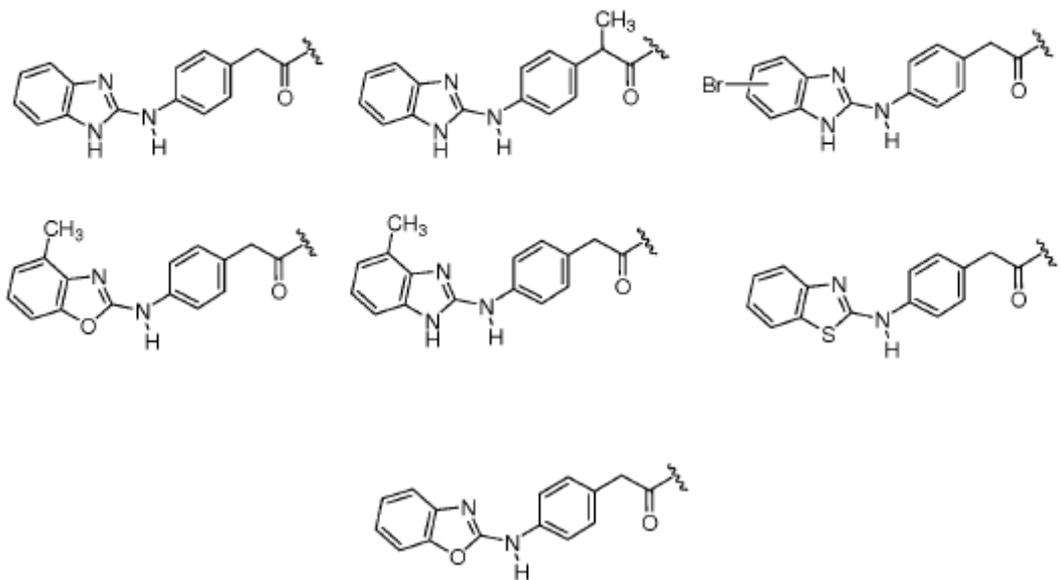
45 En algunas realizaciones, la porción del compuesto unido a Z de la fórmula I tiene una fórmula seleccionada entre:



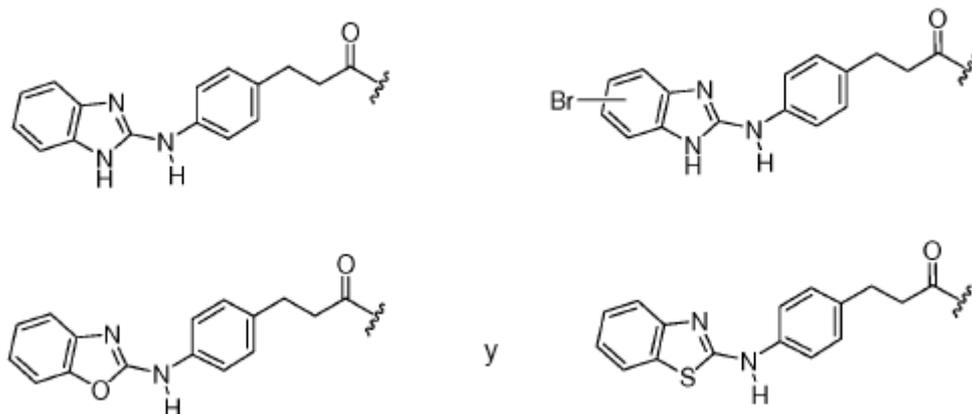
En algunas otras realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a Z tiene una fórmula seleccionada de:



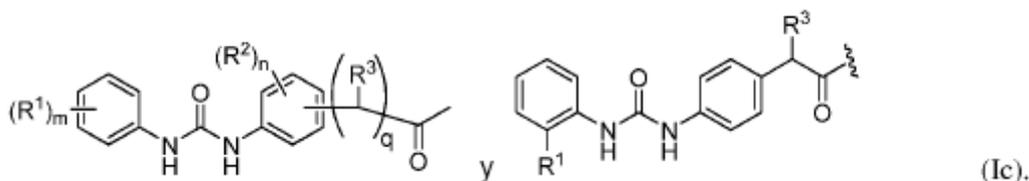
En algunas realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a Z tiene una fórmula seleccionada de:



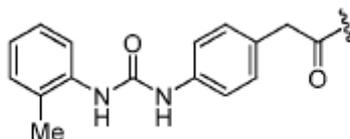
En algunas otras realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a Z tiene una fórmula seleccionada de:



En algunas realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a Z tiene una fórmula seleccionada de:

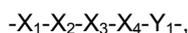


En algunas otras realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a Z tiene la fórmula:



5

En algunas realizaciones, el péptido Z tiene la siguiente estructura:

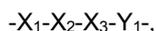


10

en la que X_1 puede ser un aminoácido hidrófobo o derivados de lisina, ornitina (Orn) y ácido α, γ -diaminobutírico (Dbu); X_2 puede ser un aminoácido cargado negativamente; X_3 puede ser un aminoácido hidrófobo; X_4 puede ser un aminoácido de origen natural, un aminoácido no natural o un D-aminoácido; Y_1 puede ser un fragmento de péptido que tiene m aminoácidos seleccionados independientemente; y m es un número entero desde 0 a 20. En otra realización, m es un número entero desde 0 a 15, preferiblemente desde 0 a 10, más preferiblemente desde 0 a 5, y aún más preferiblemente desde 0 a 3. En otra realización, Y_1 tiene un grupo carboxilo terminal seleccionado del grupo que consiste en un grupo amida y un grupo ácido carboxílico.

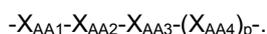
15

En algunas otras realizaciones, el péptido Z tiene la siguiente estructura:



en la que X_1, X_2, X_3 y Y_1 son como se han definido anteriormente.

En otras realizaciones, el péptido Z de la fórmula I tiene la fórmula:



20

X_{AA1} se selecciona de un aminoácido hidrófobo y derivados de lisina, homolisina (Hly), ornitina (Orn) y ácido α, γ -diaminobutírico (Dbu). X_{AA2} es un aminoácido cargado negativamente. X_{AA3} es un aminoácido hidrófobo. X_{AA4} se selecciona de un aminoácido de origen natural, un aminoácido no natural y un D-aminoácido. El subíndice p es 0 o 1.

Los aminoácidos hidrófobos apropiados, derivados de lisina, homolisina (Hly), ornitina (Orn) y ácido α , γ -diaminobutírico (Dbu), aminoácidos cargados negativamente, aminoácidos de origen natural, aminoácidos no natural y D-aminoácidos útiles con la presente invención se describen anteriormente.

5 En otras realizaciones, X_{AA1} puede ser Leu, un análogo de leucina, Lys38 o un estereoisómero del mismo. En otra realización, X_{AA2} puede ser Asp, Glu, Aad o un estereoisómero del mismo. En una realización preferida, X_{AA2} es Aad. En otra realización más, X_{AA3} puede ser Leu, un análogo de Leu, Phe, un análogo de Phe, Val, Ile, Ala, Nva, Acpc, Chg, Aib, Abu, Aic, Nal-2, Ana, o un estereoisómero de los mismos. Todavía en otra realización más, X_{AA4} puede ser un aminoácido hidrófobo, un aminoácido cargado negativamente o un estereoisómero del mismo. Preferiblemente, el aminoácido hidrófobo puede ser Pro, un análogo Pro, o un estereoisómero del mismo. Preferiblemente, el análogo Pro es Hyp.

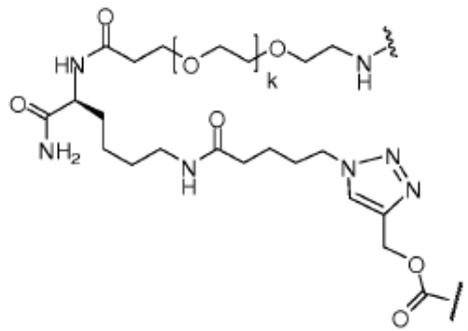
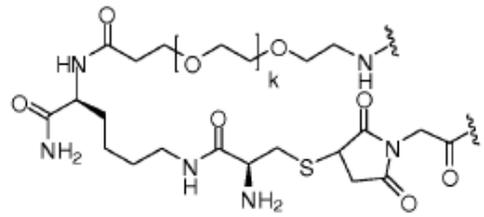
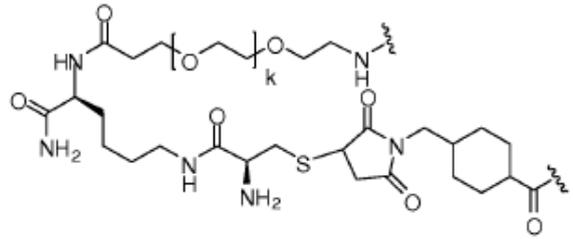
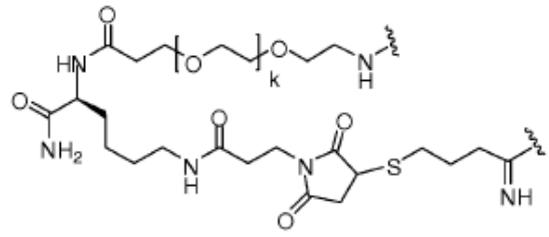
10 En otra realización, el péptido Z puede ser -Nle-Aad-Chg-D-Tyr, -Leu-Aad-Chg-D-Gln-D-Tyr, -Cpa-Asp-Phg-DGlu-D-Ser, -Leu-Aad-Val-Hyp, -Nle-Aad-Val-D-Thr-Hyp-D-Asn, -Cha-Aad-Nle-D-Gln-D-Asn, -Cpa-Glu-Val-D-Asp-DAla, -Hle-Aad-Phe-Chg, -Nle-Asp-Pra-Gly-Hyp, -Lys38-Aad-Leu-D-Pro, -Cha-Asp-Val-D-Glu-D-Gln, -Cpa-Aad-Ile-D-Asp, -Hle-Aad-Aib-D-3-Pal, -Lys38-Glu-Acpc-Nle-D-Asp-D-Gln, -Nle-Asp-Val-Ach-D-Ala, -Leu-Aad-Ala-Hyp, -Cpa-Asp-Nva-D-Glu, -Leu-Aad-Nva-Hyp-D-Glu, -Hle-Asp-Ile-D-Asp-HoSer-D-Asn, -Cpa-Aad-Aib-D-Thi, -Cpa-Aad-Acpc-Hyp, -Cpa-Aad-Val-D-Tyr-D-Asp, -Nle-Asp-Ala-Aad-Aic, -Cha-Asp-HoPhe-Hyp-D-3-Pal-Nle-Ach, -Nle-Aad-Chg-Hyp-Aad, -Nle-Aad-Chg-Hyp-D-Val-D-Asp-D-Asp, -Cpa-Aad-Chg-Pro-Aad-Phe(3-Cl)-Aad, -Cpa-Aad-Chg-Acp-D-Asp-D-Glu, -Nle-Aad-Chg-Hyp-D-Glu-Ach, -Hle-Aad-Val-Hyp-Chg, -Nle-Glu-Phg-Acp-Aad, -Nle-Aad-Val-D-Glu, -Lys38-Aad-Acpc-D-Asp, -Lys38-Aad-Acpc-D-Asn-D-Asn, -Lys38-Aad-D-Phe-D-3-Pal, -Nle-Aad-Cha-D-Glu, -Hle-Aad-Ile-D-Asp-Nle, -Lys38-Aad-Aic-D-Glu-D-Tyr, -Cpa-Aad-Nle-D-Pro, -Lys-Aad-Chg-D-Glu, -Cpa-Aad-Chg-D-Ser-Gly, -Cpa-Aad-Nle-Aad, -Cpa-Aad-Acpc-Aad, -Leu-Aad-Acpc-Aad, -Nle-Aad-Nle-Chg-D-Glu, -HoPhe-Aad-D-Nal-2-D-Glu, -Lys38-Aad-D-Phe-4-Pal-D-Asn, -Lys38-Aad-D-Phe-D-Asp, -Lys38-Aad-D-Phe-D-Ser-Nva, o -Lys38-Aad-D-Phe-D-Val.

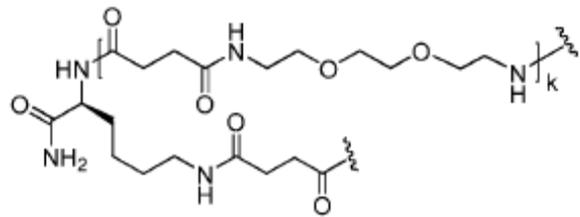
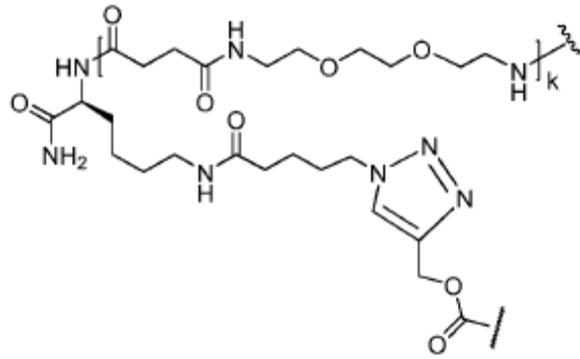
15 En algunas otras realizaciones, el péptido Z puede ser -HoPhe-Asp-Phg-Pro-Gly-D-Tyr-Aad, -Hle-Asp-Ile-Pro-Chg, -Cpa-Asp-Ile-Hyp-D-Thr-D-Asn-Nva, -Cha-Asp-Pra-Pro-D-Pro-Gly-D-Ser, -Cha-Asp-Leu-Hyp-HoCit-HoCit, -Lys 12-Aad-Nva-Hyp-Hyp, -Hle-Asp-Val-Pro-D-3-Pal-Nva-Ana, -Cpa-Asp-Abu-Acp-Nva-D-Asp, -Cha-Asp-Tyr-Pro-D-His, -Leu-Aad-Abu-Ppca-Ach-D-Tyr, -Leu-Asp-Nva-Hyp-Gly-D-Phe-Nva, -Nle-Asp-Ile-Pro-Aib-D-HoPhe-Tyr(Me), -Cpa-Glu-Tyr-Pro-Chg-Aad-D-Glu, -Hle-Asp-Nva-Pro-D-Glu, -Nle-Asp-Ile-Hyp-Hyp, -Ile-Aad-Ile-Ppca-D-Ile, -HoPhe-Asp-Ala-Pro-Aib-D-Ala, -Hle-Glu-Abu-Hyp-HoCit-HoCit, -Leu-Asp-Leu-Ppca-HoCit-D-Thr-D-Pro, -HoPhe-Asp-Nva-Ppca-D-Ala, -Nle-Asp-Val-Pro-HoCit-Gly (SEQ ID NO :4), -Cpa-Aad-Abu-Pro-D-Ala-D-Tyr-D-Phe(4-Me), -Nle-Glu-Ala-D-Thi, -Cha-Asp-Nle-D-Gln, -Hle-Aad-Ile-D-Asp-D-Phe, -Leu-Asp-D-Phe-Aic, -Cpa-Asp-Leu-D-Thi, -HoPhe-Asp-Abu-D-Asn, -Cha-Aad-Val-Ana-Ahch, -Hle-Asp-Acpc-D-Ala, -Leu-Aad-Ana-D-Pro, -Lys38-Asp-Phe(3-Cl)-D-Pro, -Lys 12-Asp-Nle-Hyp-D-Glu, -Lys38-Aad-D-Nal-2-D-Thr-D-Bpa, -Cpa-Asp-Ala-D-Thi, o -HoPhe-Asp-Ala-Hyp.

20 En algunas realizaciones, X_{AA1} del péptido Z de la fórmula I es lisina-A38 (Lys38), X_{AA2} del péptido Z de la fórmula I es ácido α -aminohexanodioico (Aad), X_{AA3} del péptido Z de la fórmula I es un D-aminoácido, y el subíndice p es 0. En algunas otras realizaciones, el péptido Z de la fórmula I se selecciona de -Lys38-Aad-D-Phe, -Lys38-Aad-Ach, -Lys38-Aad-D-Nal-2, -Lys38-Aad-Ile, -Lys38-Aad-Val, y -Lys38-Aad-Leu. En otras realizaciones, la presente invención proporciona los compuestos de la fórmula I, en la que el péptido Z es -Lys38-Aad-Ach.

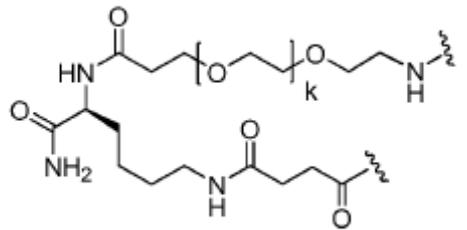
25 En algunas realizaciones, el enlazante L de la fórmula I incluye al menos uno de ácido N-(8-amino-3, 6-dioxa-octil) succinámico (EBES) y polietilenglicol (PEG).

30 En algunas otras realizaciones, el enlazante L de la fórmula I se selecciona de:



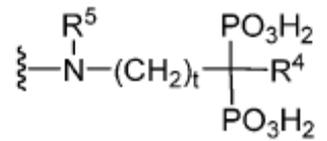


Y



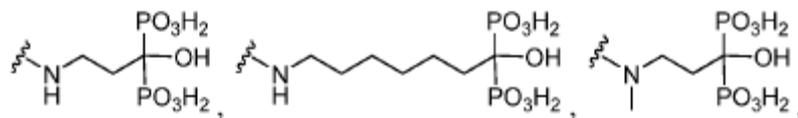
en la que k es desde 0 a 6.

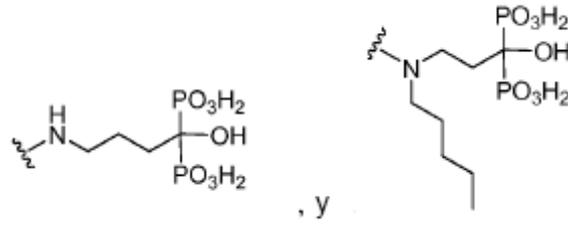
- 5 La porción del compuesto de fórmula I unida a D de la fórmula I tiene la fórmula:



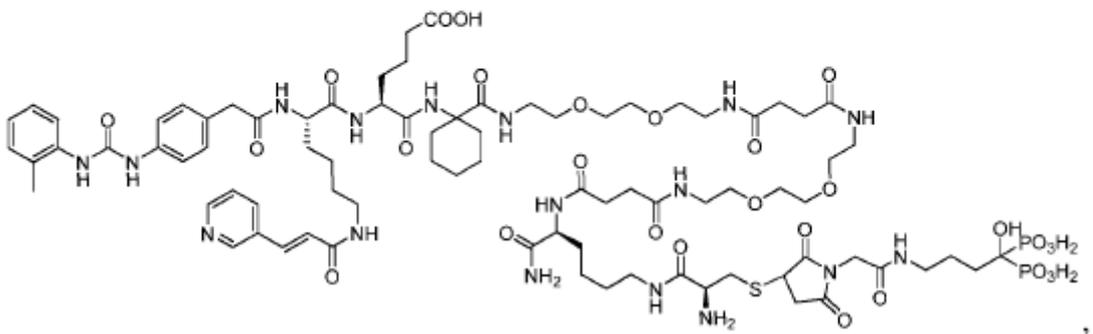
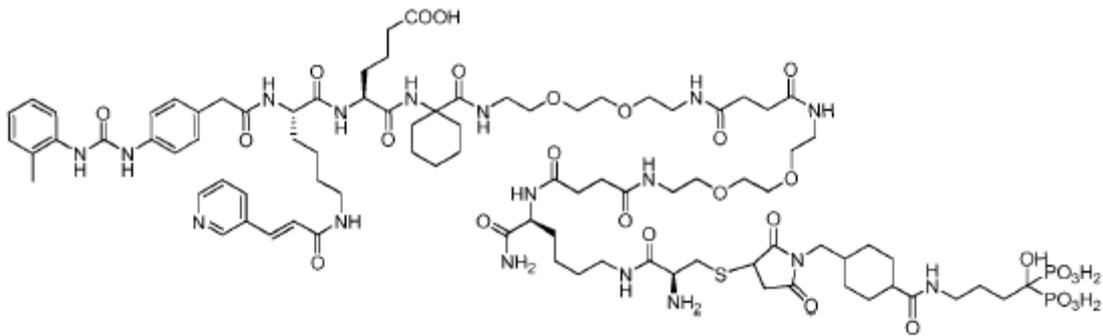
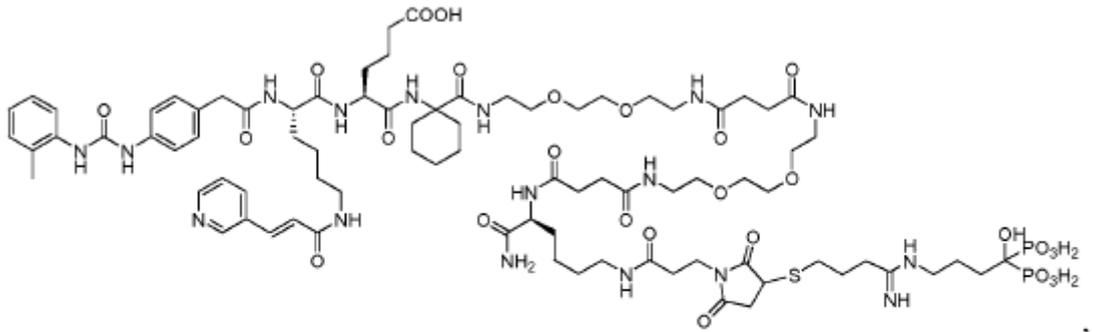
R^4 se selecciona de H, OH y halógeno, R^5 se selecciona de H y alquilo C_{1-6} , y el subíndice t es desde 1 a 6.

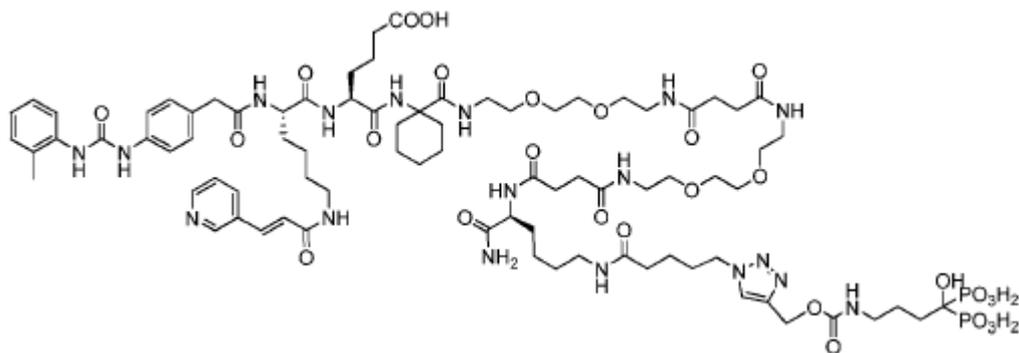
En algunas otras realizaciones, la porción del compuesto de fórmula I unida a D tiene la fórmula seleccionada entre:



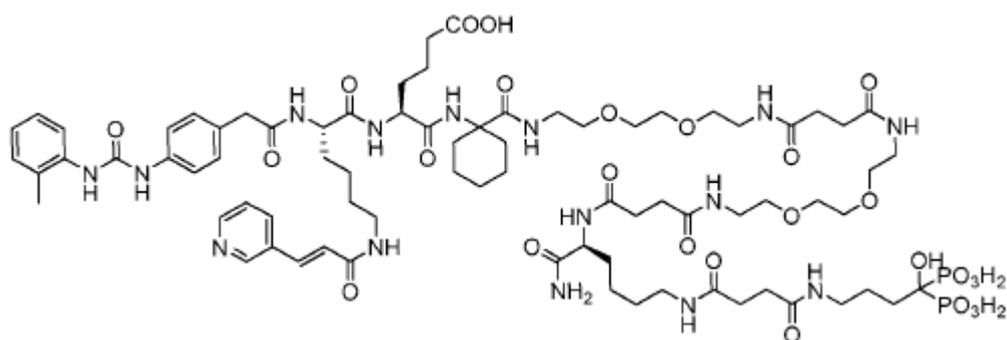


En algunas realizaciones, los compuestos de la fórmula I se seleccionan de:





y



En algunas realizaciones, se proporcionan las sales, hidratos, solvatos e isómeros de los compuestos de la fórmula I.

- 5 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a formas no solvatadas y están abarcadas dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y están destinadas a estar dentro del alcance de la presente invención.
- 10 Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los enantiómeros, racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos, formas estereoisométricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)- o, como (D)- o (L)- para aminoácidos, y los isómeros individuales están abarcados dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos de la presente invención no incluyen aquellos que son conocidos en la técnica por ser demasiado inestables para sintetizar y/o aislar.
- 15 La presente invención se entiende que incluye compuestos en formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (R)- y (S)- o (D)- y (L)- se pueden preparar usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales.

20 Se describen compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en este documento son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Adicionalmente, los profármacos se pueden convertir a los compuestos de la presente invención por métodos químicos o bioquímicos en un entorno ex vivo. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico apropiado.

25 Los compuestos de la invención se pueden sintetizar mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en el arte (véase Comprehensive Organic Transformations by Richard C. Larock, 1989) o mediante una combinación apropiada de métodos de síntesis generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la invención son fácilmente evidentes y accesibles para los expertos en el arte relevante. La discusión a continuación se ofrece para ilustrar algunos de los diversos métodos disponibles para usar en el ensamblaje de los compuestos de la invención. Sin embargo, la discusión no pretende definir el alcance de las reacciones o secuencias de reacción que son

30 útiles en la preparación de los compuestos de la presente invención. Un experto en el arte apreciará que otros métodos de preparación de los compuestos son útiles en la presente invención.

Se usaron métodos de biblioteca combinatoria una perla un compuesto (OBOC) para identificar peptidomiméticos de bisarilurea, tales como LLP2A, como ligandos altamente potentes y selectivos para la forma activada de la integrina $\alpha_4\beta_1$

(Peng, L., et al., Nat Chem Biol, 2006, 2(7): p. 381-9). Además, LLP2A, cuando estaba apropiadamente radioconjugado (DOTA/⁶⁴Cu o ⁹⁰Y), mostró potencial como agente de diagnóstico o terapéutico (DeNardo et al., J Nucl Med, 2009, 50: p 625-34).

5 El método de la biblioteca combinatoria "una perla un compuesto" (OBOC) se informó por primera vez en 1991 (Lam et al., Nature, 1991, 354:p.82-4). En esencia, cuando un método de síntesis de "mezcla dividida" (Lam et al., *id*; Houghten et al., Nature, 1991, 354:p.84-6 ; Furka et al., Int. J. Peptide Protein Res., 1991, 37:p. 487-93) para generar una biblioteca combinatoria, cada perla expresa solo una entidad química (Lam et al., *id*; Lam et al., Chem. Rev., 1997, 97:p.411-48). Las bibliotecas aleatorias de millones de perlas se pueden cribar a continuación en paralelo para una molécula aceptora específica (por ejemplo, receptor, anticuerpo, enzima, virus, célula completa, etc.). Las perlas
10 positivas se aíslan físicamente para la determinación estructural mediante microsecuenciación usando degradación de Edman automática (Lam et al., Nature, 1991, 354:p.82-4).

15 El método de biblioteca combinatoria una perla un compuesto (OBOC) sintetiza millones de compuestos de manera que cada perla muestra solo un compuesto. A través de los métodos de la biblioteca combinatoria OBOC, LLP2A se identificó como un ligando que se une específicamente a la integrina $\alpha_4\beta_1$ ($IC_{50} = 2$ pM). LLP2A, cuando se conjuga con un colorante fluorescente de infrarrojo cercano, se puede usar para obtener imágenes de células que expresan $\alpha_4\beta_1$ con alta sensibilidad y especificidad y para guiar un compuesto terapéutico a los linfomas que expresan $\alpha_4\beta_1$ (Peng, L., et al., Nat Chem Biol, 2006, 2(7): p. 381-9). Se sabe que el ligando dirige compuestos a los linfomas que expresan $\alpha_4\beta_1$ (Peng, L., et al., Nat Chem Biol, 2006, 2(7): p. 381-9; Peng, L., et al., Mol Cancer Ther, 2008, 7(2):p. 432-7 Aina, O.H., et al., Mol Pharm, 2007. 4(5): p. 631-51; Aina, O.H., et al., Mol Cancer Ther, 2005. 4(5): p. 806-13).

20 Los compuestos descritos en este documento se pueden usar en combinación entre sí, con otros agentes activos que se sabe que son útiles en el tratamiento de la osteoporosis o promueven el crecimiento óseo, o con agentes adyuvantes que pueden no ser eficaces solos, pero que pueden contribuir a la eficacia del agente activo. En algunas realizaciones, la administración conjunta de los compuestos en este documento con otros agentes incluye administrar un agente activo en 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, o 24 horas de un segundo agente activo. La administración conjunta incluye
25 administrar dos agentes activos simultáneamente, aproximadamente de forma simultánea (por ejemplo, en aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos entre sí) o secuencialmente en cualquier orden. En algunas realizaciones, la administración conjunta se puede llevar a cabo mediante coformulación, esto es, preparando una única composición farmacéutica que incluye ambos agentes activos. En otras realizaciones, los agentes activos se pueden formular por separado. En otra realización, los agentes activos y/o adyuvantes pueden estar unidos o conjugados entre
30 sí.

IV. Composiciones farmacéuticas

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que incluye un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar y administrar en una amplia variedad de formas de dosificación oral, parenteral y tópica. Las preparaciones orales incluyen comprimidos, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, comprimidos para deshacer en la boca, sellos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, etc., apropiados para la ingestión por parte del paciente. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar por inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal o intraperitoneal. Además, los compuestos descritos en este documento se pueden administrar por inhalación, por
40 ejemplo, por vía intranasal. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía transdérmica. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar mediante rutas intraoculares, intravaginales e intrarrectales que incluyen supositorios, insuflación, polvos y formulaciones en aerosol (para ejemplos de inhaladores de esteroides, véase Rohatagi, J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193, 1995; Tjwa, Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111, 1995). De acuerdo con lo anterior, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la presente invención.

45 Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias, que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material de encapsulación. Los detalles sobre técnicas para formulación y administración están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA ("Remington's").

50 En polvos, el portador es un sólido finamente dividido, que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo se mezcla con el portador que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones apropiadas y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferiblemente contienen de 5% o 10% a 70% del compuesto activo.

Las composiciones por lo general incluyen un portador o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, portadores, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeación tisular, solubilizantes y similares. Preferiblemente, la composición contendrá de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 90%, preferiblemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 75%, más preferiblemente de aproximadamente 0.1% a 50%, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.1% a 10% en peso de un ligando de la presente invención o una combinación de los mismos, y el resto que consiste en un portador y/o excipientes farmacéuticos apropiados. Los excipientes apropiados se pueden adaptar a la composición y ruta de administración particulares por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra.

Los excipientes sólidos apropiados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio; estearato de magnesio; fosfato de calcio; silicato de calcio; talco; pectina; complejos de inclusión de dextrano, dextrina y ciclodextrina; una cera de bajo punto de fusión; manteca de cacao; carbohidratos; azúcares que incluyen, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidones que incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa o carboximetil celulosa de sodio; y gomas incluyendo goma arábica, tragacanto y acacia; así como proteínas que incluyen, pero no se limitan a, gelatina, colágeno; celulosa microcristalina, agua, solución salina, jarabe, etilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como Carbopols, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc.; agentes lubricantes; aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxi-benzoatos (esto es, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes; perlas de polímero biodegradable. Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico, alginatos o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede incluir compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar los compuestos de la presente invención o modular su absorción, u otros excipientes según se desee. Los compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Un experto en el arte sabrá que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la ruta de administración de los compuestos de la presente invención y de las características fisicoquímicas particulares de los compuestos. de la presente invención.

Generalmente, tales portadores deberían ser no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Habitualmente, la preparación de tales composiciones implica combinar el agente terapéutico con soluciones reguladoras, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo glucosa, maltosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina regulada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica no específica son diluyentes apropiados a modo de ejemplo.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos apropiados tales como soluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (esto es, dosificación). Las preparaciones farmacéuticas de la invención también se pueden usar por vía oral usando, por ejemplo, cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener compuestos de la presente invención mezclados con una carga o aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos de la presente invención se pueden disolver o suspender en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Para preparar supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente en este, como mediante agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte luego en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y, por consiguiente, se solidifica.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, soluciones de agua o agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas se pueden formular en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

Las soluciones acuosas apropiadas para uso oral se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, aromatizantes, estabilizantes y agentes espesantes apropiados según se desee. Las suspensiones acuosas apropiadas para uso oral se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un

- producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, un heptadecaetileno oxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, mono-oleato de polioxietileno sorbitol), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, mono-oleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones se pueden ajustar para la osmolaridad.
- 5
- 10 También se incluyen preparaciones en forma sólida, que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizantes, soluciones reguladoras, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.
- 15 Las suspensiones de aceite se pueden formular suspendiendo un compuesto de la presente invención en un aceite vegetal, tal como aceite de cacahuate, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida; o una mezcla de estos. Las suspensiones de aceite pueden contener un agente espesante, como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral agradable, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas formulaciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico. Como ejemplo de un vehículo de aceite inyectable, véase Minto, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102, 1997. Las formulaciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descritos anteriormente, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes apropiados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábica y goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitán. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes, como en la formulación de jarabes y elixires. Tales formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante o un agente colorante.
- 20
- 25

V. Administración

- 30 La administración de los ligandos de la presente invención con un excipiente farmacéutico apropiado según sea necesario se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los modos de administración aceptados. De este modo, la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, oral, intraarticular, parenteral, intraarterial, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o por inhalación. La administración también puede ser directamente a la superficie del hueso y/o a los tejidos que rodean al hueso.
- 35
- Las composiciones que contienen un ligando o una combinación de ligandos de la presente invención se pueden administrar repetidamente, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces, o la composición puede administrarse por infusión continua. Los sitios de administración apropiados incluyen, pero no se limitan a, piel, bronquial, gastrointestinal, anal, vaginal, ojo y oído. Las formulaciones pueden tomar la forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, ungüentos, lociones, geles, aerosoles o similares, preferiblemente en formas de dosificación unitarias apropiadas para la administración simple de dosis precisas.
- 40
- 45 Las preparaciones farmacéuticas se administran por lo general a un mamífero, que incluye humanos y mamíferos no humanos. Los mamíferos no humanos tratados usando los presentes métodos incluyen animales domesticados (es decir, caninos, felinos, murinos, roedores y lagomorfos) y animales agrícolas (bovinos, equinos, ovinos, porcinos).
- La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos (por ejemplo, perros), conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el inicio, tolerabilidad y/o efectos terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéutico apropiado (por ejemplo, una ampolla). Además, se pueden preparar composiciones más concentradas, a partir de las cuales pueden producirse luego las composiciones de dosificación unitaria más diluidas. Las composiciones más concentradas contendrán de este modo sustancialmente más que, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces la cantidad de un ligando o una combinación de ligandos. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el paquete cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o comprimido para deshacer en la boca, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma envasada. La composición puede, si se desea, también contener otros agentes terapéuticos compatibles. Las
- 50
- 55

preparaciones farmacéuticas preferidas pueden liberar los compuestos de la invención en una formulación de liberación sostenida.

5 Los expertos en el arte conocen métodos de preparación de tales formas de dosificación (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). La composición que se va a administrar contiene una cantidad del ligando o combinación de ligandos en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el alivio de una afección que se está tratando (por ejemplo, osteoporosis) cuando se administra de acuerdo con las enseñanzas de esta invención. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los ligandos de la presente invención (por ejemplo, sales de adición de ácido) se pueden preparar e incluir en las composiciones usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en el arte de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

15 Para administración oral, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, aerosoles, comprimidos para deshacer en la boca, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes apropiados para administración oral incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

20 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas toman la forma de una píldora, comprimido o cápsula, y de este modo, la composición puede contener, junto con los ligandos o combinación de ligandos, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un desintegrante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma arábica, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y sus derivados. Los ligandos también se pueden formular en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un portador de polietilenglicol (PEG).

25 Las composiciones líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando un ligando o una combinación de ligandos y opcionalmente uno o más coadyuvantes farmacéuticamente aceptables en un portador tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro de sodio al 0.9% p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica o intravenosa. Los ligandos de la presente invención también se pueden formular en un enema de retención.

30 Para la administración tópica, las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de emulsiones, lociones, geles, cremas, jaleas, soluciones, suspensiones, ungüentos y parches transdérmicos. Para la administración por inhalación, la composición se puede administrar como un polvo seco o en forma líquida a través de un nebulizador. Para administración parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones inyectables estériles y polvos estériles envasados. Preferiblemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 7.5.

35 Las composiciones de la presente invención también se pueden proporcionar en una forma liofilizada. Tales composiciones pueden incluir una solución reguladora, por ejemplo, bicarbonato, para su reconstitución antes de la administración, o la solución reguladora puede incluirse en la composición liofilizada para la reconstitución con, por ejemplo, agua. La composición liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor apropiado, por ejemplo, epinefrina. La composición liofilizada puede proporcionarse en una jeringa, opcionalmente envasada en combinación con la solución reguladora para la reconstitución, de modo que la composición reconstituida se pueda administrar inmediatamente a un paciente.

40 En general, las dosificaciones administradas serán efectivas para administrar concentraciones picomolares a micromolares del ligando al sitio o sitios apropiados. Sin embargo, un experto en el arte entiende que la dosis administrada variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a, el ligando particular o conjunto de ligandos que se administrarán, el modo de administración, el tipo de aplicación (por ejemplo, imágenes, terapéutico), la edad del paciente y la condición física del paciente. Preferiblemente, se deben usar la dosis y concentración más pequeñas requeridas para producir el resultado deseado. La dosis debe ajustarse adecuadamente para niños, ancianos, pacientes debilitados y pacientes con enfermedad cardíaca y/o hepática. Se puede obtener orientación adicional a partir de estudios conocidos en la técnica usando modelos animales experimentales para evaluar la dosificación. Sin embargo, la mayor afinidad y especificidad de unión celular asociada con los ligandos de la presente invención permite un margen de seguridad más amplio para las concentraciones de dosificación y para la dosificación repetida.

45 Los individuos que se van a tratar con el compuesto de la presente invención pueden ser cualquier mamífero. Por ejemplo, el aumento local en el hueso se puede utilizar para la curación de fracturas, fusión (artrodesis), reconstrucción ortopédica y reparación periodontal. El aumento sistémico en el hueso sería para el tratamiento de masa ósea baja, es decir, osteoporosis. Tales individuos incluyen un perro, gato, caballo, vaca o cabra, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado, más particularmente un ser humano.

- En otras realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en la promoción del crecimiento óseo sistémico. El crecimiento óseo sistémico se refiere al crecimiento del hueso en todo el sujeto y puede afectar a todos los huesos del cuerpo del sujeto. Un sujeto que necesita crecimiento óseo sistémico puede padecer una variedad de dolencias y estados de enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto sufre de una enfermedad de fenotipo de masa ósea baja. La masa ósea baja se puede determinar por una variedad de métodos conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, la masa ósea baja se puede caracterizar por una puntuación T menor de aproximadamente -1. Las enfermedades de fenotipo de masa ósea baja pueden incluir osteoporosis, osteopenia y síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG). En algunas otras realizaciones, la enfermedad de fenotipo de masa ósea baja puede ser osteopenia o síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (OPPG).
- Después de la administración de los compuestos de la presente invención, el crecimiento óseo sistémico se puede determinar por una diversidad de métodos, tales como mejoras en la densidad ósea. La densidad ósea se puede medir mediante una variedad de métodos diferentes, que incluyen la puntuación T y la puntuación Z. La puntuación T es el número de desviaciones estándar por encima o por debajo de la media para un adulto sano de 30 años del mismo sexo que el paciente. La masa ósea baja se caracteriza por una puntuación T de -1 a -2.15. La osteoporosis se caracteriza por una puntuación T menor a -2.15. La puntuación Z es el número de desviaciones estándar por encima o por debajo de la media para la edad y el sexo del paciente. La mejoría en la puntuación T y la puntuación Z indica crecimiento óseo. La densidad ósea se puede medir en una variedad de lugares del esqueleto, como la columna vertebral o la cadera. Un experto en el arte apreciará que otros métodos para determinar la densidad ósea son útiles en la presente invención.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar para la administración mediante una variedad de diferentes rutas. En general, el tipo de portador se selecciona en función del modo de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma de administración apropiada, que incluye, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intratecal, rectal, vaginal, sublingual o parenteral, incluida la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intramedular o intrauretral, o infusión. Una composición farmacéutica (por ejemplo, para administración oral o administración por inyección) puede estar en forma de un líquido (por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión). Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; soluciones reguladoras tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. Se prefiere el uso de solución salina fisiológica, y una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.
- Las formulaciones de la invención también son apropiadas para la administración en todos los espacios/cavidades del cuerpo, incluyendo, pero no limitado a, pleura, peritoneo, cráneo, mediastino, pericardio, bolsas o bursitis, epidural, intratecal, intraocular, intraarticular, intradiscal, intramedular, periespinal, etc.
- Algunas realizaciones de liberación lenta incluyen sustancias poliméricas que son biodegradables y/o se disuelven lentamente. Tales sustancias poliméricas incluyen polivinilpirrolidona, hidroxipropil celulosa de bajo y medio peso molecular e hidroxipropil metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulada, almidón carboximetilo, copolímero de divinilbenceno y metacrilato de potasio, alcoholes polivinílicos, almidones, derivados de almidón, celulosa microcristalina, etilcelulosa, metilcelulosa y derivados de celulosa, β -ciclodextrina, poli (éteres de metil vinil/anhídrido maleico), glucanos, escleroglucanos, mananos, xantanos, ácido algínico y sus derivados, derivados de dextrina, monoestearato de glicerilo, glicéridos semisintéticos, palmitoestearato de glicerilo, behenato de glicerilo, polivinilpirrolidona, gelatina, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearato de sodio, talco, benzoato de sodio, ácido bórico y sílice coloidal.
- Los agentes de liberación lenta de la invención también pueden incluir adyuvantes tales como almidón, almidón pregelatinizado, manitol fosfato de calcio, lactosa, sacarosa, glucosa, sorbitol, celulosa microcristalina, gelatina, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, solución de almidón, etilcelulosa, goma arábiga, goma de tragacanto, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice coloidal, monoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, ceras, y glicéridos mono-, bi-, y trisustituidos. Los agentes de liberación lenta también se pueden preparar como se describe en general en el documento WO94/06416.
- En el uso médico de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden usar solas, o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Los fármacos adicionales usados en los protocolos de combinación de la presente invención se pueden administrar por separado o uno o más de los fármacos usados en los protocolos de combinación se pueden administrar juntos, tal como en una mezcla. Cuando uno o más medicamentos se administran por separado, el momento y el programa de administración de cada fármaco pueden variar. Los otros agentes terapéuticos o de diagnóstico se pueden administrar al mismo tiempo que los compuestos de la presente invención, por separado o en momentos diferentes.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de la osteoporosis.

La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por osteoporosis inducida secundaria (masa ósea baja) que incluyen, pero no se limitan a, osteomalacia, displasia fibrosa poliostrófica, enfermedad de Paget, artritis reumatoide, gravedad cero, osteoartritis, inactividad o inmovilidad prolongada, osteomielitis, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, gastrectomía, osteoporosis secundaria inducida, amenorrea, enfermedad de Cushing, síndrome de Cushing, diabetes mellitus, diabetes, trastornos de la alimentación, hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, hiperprolactinemia, síndrome de Klinefelter, enfermedad tiroidea, síndrome de Turner, osteoporosis inducida por esteroides, convulsiones o depresión inducida por osteoporosis, inmovilidad, artritis, osteoporosis secundaria inducida por cáncer, agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina inducida por masa ósea baja, masa ósea baja inducida por medicación tiroidea, Dilantin (fenitoína), masa ósea baja inducida por depakote, masa ósea baja inducida por quimioterapia, masa ósea baja inducida por inmunosupresores, masa ósea baja inducida por anticoagulantes, enfermedad de Graves, artritis reumatoide juvenil, síndromes de malabsorción, anorexia nerviosa, enfermedad renal, tratamiento anticonvulsivo (por ejemplo, para la epilepsia), tratamiento con corticosteroides (por ejemplo, para la artritis reumatoide, asma), tratamiento inmunosupresor (por ejemplo, para el cáncer), nutrición inadecuada (especialmente calcio, vitamina D), ejercicio excesivo que conduce a amenorrea (ausencia de períodos), tabaquismo y abuso de alcohol, osteoporosis asociada al embarazo, deficiencia de cobre, aminoaciduria dibásica tipo 2, síndrome de Werner, síndrome de Hajdu-Cheney, hiperostosis corticalis deformans juvenilis, aciduria metilmalónica tipo 2, deficiencia de cistationina betasintasa, exemestano, síndrome de hiperinmunoglobulina E (IgE), hemocromatosis, síndrome de Singleton-Merten, beta talasemia (homocigoto), osteodistrofia simpática refleja, sarcoidosis, síndrome de Winchester, síndrome de Hallermann-Streiff (HSS), ciproterona, deficiencia de glicerol quinasa, síndrome de Bonnet-Dechaume-Blanc, prednisolona, heparina, osteodisplástica geodérmica, síndrome de osteólisis de Torg, orquidectomía, enfermedad de Fabry, síndrome de pseudoprogeria, síndrome de Wolcott-Rallison, espondilitis anquilosante, mieloma, hialinosis infantil sistémica, osteodistrofia hereditaria de Albright, síndrome linfoproliferativo autoinmune, síndrome de Brown-Sequard, anemia de Diamond-Blackfan, galactorrea-hiperprolactinemia, disgenesia gonadal, afecciones renales, enfermedad de Menkes, menopausia, neuritis, insuficiencia ovárica debido a la resistencia a la FSH, insuficiencia ovárica familiar, envejecimiento prematuro, cirrosis biliar primaria, prolactinoma, prolactinoma familiar, osteodistrofia renal, colitis ulcerativa, bajo peso, síndrome de Werner, tumor óseo, cáncer de huesos, enfermedad de huesos frágiles, osteogénesis imperfecta congénita y osteogénesis imperfecta tardía. Otras afecciones incluyen una lesión ósea, tales como una fractura o un hueso debilitado, o un hueso lesionado debido a un tratamiento de radiación. Un experto en el arte apreciará que otros tipos de condiciones, enfermedades y tratamientos conducen a la osteoporosis.

La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de poblaciones de pacientes caracterizadas por hueso lesionado, tal como hueso fracturado o hueso dañado debido a radiación, así como niños para quienes los medicamentos para osteoporosis están contraindicados.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en la promoción del crecimiento óseo.

El crecimiento óseo se puede medir de varias maneras conocidas para los expertos en el arte. Los métodos para medir el crecimiento óseo incluyen, pero no se limitan a, Uct (micro CT), absorción doble de rayos X (densidad ósea), ultrasonido, QCT, SPA, DPA, DXR, SEXA, QUS, rayos X, usando el ojo humano durante la manipulación quirúrgica, rojo de alizarina S, osteocalcina sérica, fosfatasa alcalina sérica, proteína Gla del hueso sérico (BGP), contenido mineral óseo, calcio sérico, fósforo sérico, marcadores de tántalo y suero IGF-1.

Muchos indicadores de crecimiento óseo se pueden usar para medir el crecimiento óseo, incluida la densidad ósea. En algunas realizaciones, el crecimiento óseo se puede demostrar mediante un aumento del 0.1% en la densidad ósea. En otras realizaciones, el crecimiento óseo se puede demostrar mediante un aumento de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000% o más, en densidad ósea.

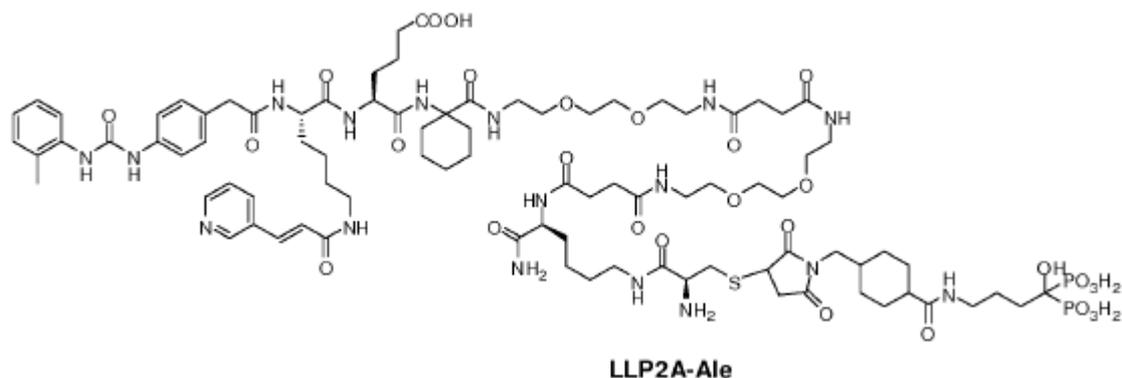
Un experto en el arte aprecia que el crecimiento óseo sea local, sistémico o ambos.

En algunas otras realizaciones, el compuesto de fórmula (I) es para uso en la promoción del crecimiento óseo. La administración de un compuesto de la presente invención puede promover el crecimiento óseo local y/o el crecimiento óseo sistémico. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto de la presente invención promueve el crecimiento óseo sistémico. El crecimiento óseo se puede lograr aumentando el contenido mineral óseo, aumentando la densidad ósea y/o el crecimiento de hueso nuevo. En otras realizaciones, la aplicación local del compuesto de la presente invención y un fármaco consigue crecimiento óseo sistémico.

En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento de una masa ósea baja.

VII. Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de LLP2A-alendronato (LLP2A-Ale)



El LLP2A-alendronato (LLP2A-Ale) se prepara mediante la adición conjugada del grupo sulfhidrido de LLP2A-Lys (D-Cys) a alendronato-maleimida (Ale-Mal), este último se prepara in situ a partir de alendronato y sulfosuccinimidil- 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). LLP2A-Lys (D-Cys) se prepara por síntesis en fase sólida a partir de varios materiales de partida comercialmente disponibles y un intermedio caracterizado, ácido 4-[(N'-2-metilfenil) ureido] fenilacético (UPA), que también se preparó a partir de materiales de inicio comercialmente disponibles.

Síntesis del ácido 4-[(N'-2-metilfenil) ureido] fenilacético (UPA)

Se sintetizó el ácido 4-[(N'-2-metilfenil) ureido] fenilacético (UPA) como se indica en la figura 10A, Síntesis de UPA. En resumen, se sintetizó UPA añadiendo isocianato de o-tolilo (19.646 mL, 158.47 mmol) gota a gota a una suspensión de ácido 4-aminofenilacético (23.8 g, 156.9 mmol) en N, N-dimetilformamida (DMF) (62 mL) con agitación. La mezcla se volvió gradualmente transparente y se dejó agitar durante 2 horas. La solución resultante se vertió en acetato de etilo (700 mL) con agitación. El precipitado de color blanco crema se filtró y se lavó con acetato de etilo (3x100 mL) y acetonitrilo (ACN) (3x100 mL), respectivamente. El sólido se secó a vacío. Peso (polvo de color blanco crema): 36.7 g (rendimiento en bruto del 82.3%). Espectrometría de masas por ionización por electroaspersión de alta resolución Orbitrap (ESI-MS) [M+H]⁺: 285.1197 (calculado: 285.1239), [M+Na]⁺: 307.1010 (calculado: 307.1059), [M+K]⁺: 323.0746 (calculado: 323.0798).

Síntesis en fase sólida de LLP2A-Lys (D-Cys)

LLP2A-Lys (D-Cys) se sintetizó como se describe en la figura 10B, síntesis en fase sólida de LLP2A-Lys (D-Cys).

La resina de amida Rink MBHA (0.5 g, 0.325 mmol, carga de 0.65 mmol/g) se hinchó en DMF durante 3 horas antes de la desprotección de Fmoc con 20% de 4-metilpiperidina en DMF dos veces (5 y 15 minutos, respectivamente). Las perlas se lavaron a continuación con DMF (3x10 mL), metanol (MeOH) (3x10 mL) y DMF (3x10 mL), respectivamente. Fmoc-Lys (Dde)-OH (0.519 g, 0.975 mmol) se disolvió en una solución de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0.149 g, 0.975 mmol) y N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (152 µL, 0.975 mmol) en DMF (8 mL), que luego se añadió a la suspensión de las perlas. El acoplamiento se llevó a cabo a temperatura ambiente durante la noche. Después de la filtración, las perlas se lavaron con DMF (3x10 mL), MeOH (3x10 mL) y DMF (3x10 mL), respectivamente.

Después de la eliminación de Fmoc, las perlas se sometieron entonces a dos ciclos de acoplamiento y desprotección del enlazante de Fmoc de la misma manera que la descrita anteriormente. Las perlas se lavaron con DMF (3x10 mL), MeOH (3x10 mL) y DMF (3x10 mL). Se disolvió Fmoc-Ach-OH (0.365 g, 0.975 mmol) en una solución de HOBt (0.149 g, 0.975 mmol) y DIC (152 µL, 0.975 mmol) en DMF, y luego se añadió a las perlas. El acoplamiento se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, las perlas se lavaron con DMF (3x10 mL), MeOH (3x10 mL) y DMF (3x10 mL), respectivamente. El grupo de desprotección Fmoc se eliminó con 20% de 4-metilpiperidina dos veces ((5 y 15 minutos, respectivamente)).

Después de lavar con DMF, MeOH y DMF respectivamente, las perlas se sometieron luego a ciclos de acoplamiento y desprotección adicionales por etapas con Fmoc-Aad (OtBu)-OH y Fmoc-Lys (Alloc)-OH de la misma manera que se describió anteriormente. Después de la eliminación de Fmoc, se añadió a las perlas una solución de UPA (0.923 g, 3.25 mmol), HOBt (0.498 g, 3.25 mmol) y DIC (509 µL, 3.25 mmol) en DMF. La reacción se realizó a temperatura ambiente hasta que la prueba de Kaiser fue negativa (3 horas hasta la noche). Las perlas se lavaron con DMF (3x10 mL), metanol (3x10 mL) y DMF (3x10 mL). El grupo protector Alloc se eliminó por tratamiento con Pd (PPh₃)₄ (0.2 eq.) y PhSiH₃ (20 eq.) en diclorometano (DCM), dos veces (30 minutos, cada uno).

Se añadió una solución de ácido trans-3- (3-piridil) acrílico (0.37 g, 1.3 mmol), HOBt (0.176 g, 1.3 mmol) y DIC (201 mL, 1.3 mmol) en DMF (8 mL) a las perlas. El acoplamiento se realizó a temperatura ambiente durante 4 horas hasta la

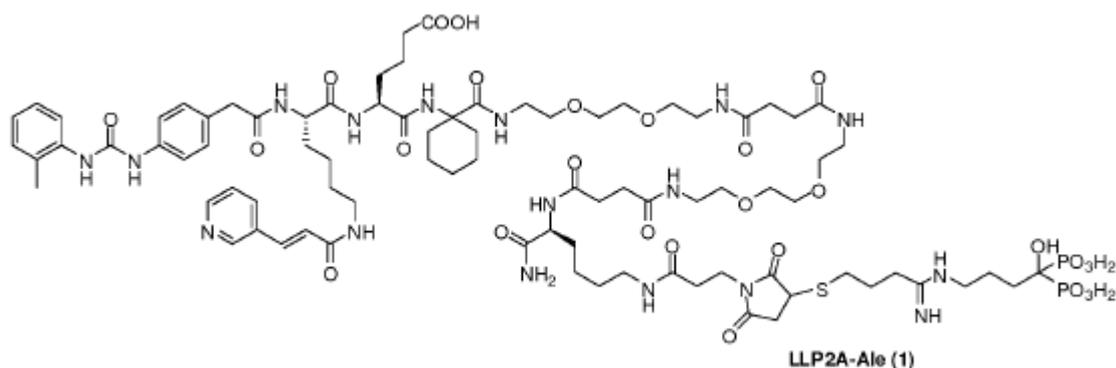
noche hasta que la prueba de Kaiser fue negativa. Las perlas se lavaron con DMF (5 x 5 mL), MeOH (3 x 5 mL) y DCM (3 x 5 mL). El grupo protector Dde se eliminó con NH_2NH_2 al 2% en DMF dos veces (5 y 10 minutos, respectivamente). Las perlas se lavaron con DMF, MeOH y DMF, seguido de acoplamiento de (4 eq a resina, 220 mg, 1.3 mmol) Boc-D-Cys(Trt)-OH, HOBt (0.176 g, 1.3 mmol) y DIC (201 μL , 1.3 mmol) en DMF (8 mL). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo a temperatura ambiente hasta que la prueba de Kaiser dio negativo (4 horas en la noche). Las perlas se lavaron a fondo con DMF, MeOH y DCM, respectivamente, y luego se secaron al vacío durante 1 hora antes de añadir una mezcla de escisión de 82.5% de ácido trifluoroacético (TFA): 5% de tioanisol: 5% de fenol: 5% de agua: 2.5% de triisopropilsilano (TIS) (v/v). La reacción de escisión se realizó a temperatura ambiente durante 2-3 horas. El producto bruto de color blanco crema se precipitó y se lavó con éter frío. La pureza se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa analítica (RP-HPLC) y el producto en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LLP2A-Lys (D-Cys) MALDI-TOF MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1502.88 (calculado: 1502.77); $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1524.88 (calculado: 1524.75).

Síntesis de LLP2A-Ale

Se sintetizó LLP2A-Ale a través de la adición conjugada de LLP2A-Lys (D-Cys) a Ale-Mal, formado in situ a partir de alendronato y sulfo-SMCC. El esquema de síntesis se muestra en la figura 10C, Preparación de LLP2A-Ale a través de la conjugación de LLP2A-Lys (D-Cys) con Ale-Mal.

Se disolvió sal disódica de alendronato (1.0 eq.) (polvo procedente de la liofilización de una solución acuosa de ácido alendrónico y 2 equivalentes de NaOH) en solución salina regulada con fosfato (PBS) 0.1 M (con ácido etilendiaminotetraacético 10 mM), pH 7.5. La solución acuosa se enfrió a continuación en un baño de agua con hielo, y se añadió gota a gota una solución de Sulfo-SMCC (1.1 eq.) en agua. Una vez completada la adición, la solución resultante se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 horas. Esta solución se enfrió antes de la adición gota a gota de una solución de LLP2A-Lys (D-Cys) (1.0 eq.) en una pequeña cantidad de acetonitrilo al 50%/agua. El pH se ajustó a entre 6 y 7 con NaHCO_3 acuoso, si es necesario. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora o hasta que el ensayo de Ellman dio negativo, y luego se liofilizó. El polvo resultante se redisolvió en una pequeña cantidad de 50% de ACN/agua y se purificó por RP-HPLC (columna C18). Solución reguladora A: 0.5% de ácido acético/ H_2O . Solución reguladora B: ácido acético al 0.5%/ACN. El eluyente recogido se liofilizó para dar un polvo blanco. La identidad de LLP2A-Ale se confirmó con espectrometría de masas del tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1970.78 (calculado: 1970.88).

Ejemplo 2: Síntesis de LLP2A-alendronato (1) [LLP2A-Ale (1)]



LLP2A-Ale (1) se sintetizó a través de la conjugación de alendronato-SH (Ale-SH) a LLP2A-Mal a través de la adición de Michael. El esquema de síntesis se muestra en la figura 11.

Preparación 1a: Síntesis de Ale-SH. La síntesis de Ale-SH se logró haciendo reaccionar alendronato con 2-IT (1 equivalente) en PBS a pH 7.5 durante 1 hora seguido de precipitación con EtOH. El sólido se disolvió en agua y se precipitó con EtOH, dos veces.

Preparación 1b: Síntesis de LLP2A-Mal. LLP2A-Mal se preparó con maleimida unida a la cadena lateral de Lys y dos enlazantes hidrofílicos entre LLP2A y Lys (Mal) usando un enfoque similar al descrito anteriormente. La síntesis se realizó sobre la resina de amida MBHA de Rink mediante un enfoque de síntesis de péptidos en fase sólida estándar usando química Fmoc/tBu y acoplamiento HOBt/DIC. El esquema de síntesis se muestra en la figura 11. Fmoc-Lys (Dde)-OH se acopló primero a la resina, seguido por el acoplamiento de dos enlazantes. LLP2A se preparó entonces como se informó previamente en el extremo N del enlazante usando un enfoque similar al descrito anteriormente. El grupo protector Dde se eliminó con NH_2NH_2 al 2% en DMF dos veces (5 min, 10 min). Las perlas se lavaron con DMF, MeOH y DMF, seguido de acoplamiento de (3 equivalentes a resina) ácido 3-maleimidopropiónico y HOBt, DIC. La reacción de acoplamiento se realizó a temperatura ambiente durante la noche. Las perlas se lavaron a fondo con DMF,

MeOH y DCM y luego se secaron al vacío durante 1 hora antes de añadir una mezcla de escisión de 95% de TFA: 2.5% de agua: 2.5% de TIS. La escisión de los compuestos de la resina y la eliminación del grupo protector se lograron simultáneamente durante 2 horas a temperatura ambiente. Los productos en bruto de color blanco se precipitaron con éter frío y se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa de fase inversa (RP-HPLC) para dar LLP2A-Mal. La identidad de LLP2A-Mal fue confirmada por MALDI-TOF MS [M+Na]⁺: 1572.76 (calculado: 1549.78).

Preparación 1c: Síntesis de LLP2A-Ale (1). LLP2A-Ale (1) se preparó conjugando LLP2A-Mal con Ale-SH. Ale-SH se disolvió en solución reguladora PBS a pH 7.2 que contenía DMSO al 5%. Posteriormente, se añadió una solución de LLP2A-Mal (1.2 equivalentes) en una pequeña cantidad de DMSO a la solución Ale-SH. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se liofilizó. El polvo se volvió a disolver en una pequeña cantidad de agua y se pasó a través de la columna Varian MEGA BOND ELUT C18 (60 mL, tamaño de partícula 40 μ m) y se eluyó con agua, 5% de ACN/agua, 10% de ACN/agua y 50% de ACN /agua. Los eluyentes se recogieron y verificaron por espectroscopía de masas. Los eluyentes con producto puro se combinaron y se liofilizaron para dar un polvo blanco. MALDI-TOF MS [M+H]⁺: 1900.78 (calculado: 1899.83).

Ejemplo 3: Diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea con una alta afinidad por LLP2A

Se desarrolló un nuevo método de codificación de color que facilita el cribado de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias de OBOC. Este método difiere de los métodos tradicionales usados para controlar las expresiones de integrina en las MSCs, esto es, el uso de clasificación celular activada por fluorescencia basada en anticuerpos (FACS) o inmunotransferencia. En el presente método, las perlas de polímero que muestran compuestos químicos o familias de los compuestos se tiñeron con tintes orgánicos a base de aceite que se usan como marcadores de codificación. Los colorantes de color no afectaron la unión celular a los compuestos mostrados en la superficie de las perlas. Estas perlas Rainbow se prepararon de una manera múltiple de manera que cada ligando reaccionó a una o a una serie de integrinas que se codificaron en un color. Véase la figura 7 (Luo, J., et al., J Comb Chem, 2008, 10(4): p. 599-604). Esta técnica de perlas Rainbow se aplicó para determinar el perfil de integrinas en las superficies de las células. Al incubar las células de médula ósea sometidas a diferenciación osteogénica con las perlas Rainbow, encontramos que la integrina $\alpha_4\beta_1$ se expresó altamente en estas células osteoprogenitoras y tenía una alta afinidad por LLP2A como se muestra en la figura 7.

En la figura 7, las células de la médula ósea se cultivaron en medio osteogénico durante 7 días y se incubaron con perlas Rainbow. Las perlas de color violeta que codificaron LLP2A, el ligando con alta afinidad y especificidad contra $\alpha_4\beta_1$, se cubrieron con capas de células identificadas por flechas verdes. La ampliación original, 10x, se muestra en el lado derecho de la figura 7, y se muestra un aumento de 20x en el lado izquierdo de la figura 7. También se observaron enlaces débiles en las perlas negras, moradas y verdes, codificadas RGD1, RGD2 y LYK1 respectivamente. Todas estas perlas tenían enlaces no específicos a muchas otras integrinas.

Ejemplo 4: Human-MSCs dirigidas a hueso con LLP2A-Ale para promover el crecimiento óseo

Se obtuvieron MSCs humanas (huMSCs) y se inyectaron junto con LLP2A-Ale a ratones inmunodeficientes, NOD/SCID/mucopolisacaridosis tipo VII (MPSVII). Esta cepa de ratón carecía de la enzima β -glucuronidasa (GUSB). Las células donantes podrían detectarse fácilmente usando la detección bioquímica de β -glucuronidasa (Véase Meyerrose, T.E., et al., Stem Cells, 2007, 25(1): p. 220-7; Meyerrose, T.E., et al., Stem Cells, 2008, 26(7): p. 1713-22). A los tres meses, los ratones recibieron una única inyección intravenosa (iv) de ya sea vehículo (100 μ L de PBS/ratón), huMSCs (5 x 10⁵/100 μ L/PBS/ratón), huMSCs + LLP2A (5 nM/ratón) o huMSCs + LLP2A-Ale (500 ng/ratón, peso total del compuesto de 3.5 μ g, con concentración de alendronato de 500 ng/ratón). La dosis de alendronato que usamos para el estudio fue de aproximadamente una quinta parte de la dosis terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis (véase Colon-Emeric, C.S., JAMA, 2006, 296(24): p. 2968-9; Ma, Y.L., et al., Endocrinology, 2003, 144(5): p. 2008-15). Como se muestra en la figura 8, LLP2A-Ale aumentó en gran medida el número de huMSCs en la superficie del hueso de huMSCs a hueso en comparación con los grupos de control (PBS y huMSCs) 24 horas después de la inyección de huMSCs. Como se muestra en la figura 1, tres semanas después del trasplante, las huMSCs solo se observaron adyacentes a la superficie del hueso en el grupo tratado con LLP2A-Ale. HuMSC, como se muestra mediante GUSB + tinción roja, solo estaba presente en la superficie del hueso trabecular en el grupo tratado con LLP2A-Ale (panel inferior). No hubo actividad GUSB demostrable en el pulmón, hígado, riñón y LVB que recibieron PBS (paneles superiores) o huMSCs (panel central). La masa ósea esponjosa en el cuerpo vertebral fue más del 40% mayor en el grupo tratado con MSC + LLP2A-Ale (volumen de hueso esponjoso, BV/TV 13.9 \pm 2.2%) en comparación con PBS (BV/TV 9.4 \pm 1.7%), MSC (BV/TV 10.2 \pm 1.9%) o MSC + LLP2A (BV/TV 10.5 \pm 0.5%) controles tres semanas después de una inyección única de huMSC y LLP2A-Ale. Este aumento en la masa ósea esponjosa estuvo acompañado por aumentos significativos en los parámetros bioquímicos de formación de hueso tales como marcadores de formación de hueso, péptido N terminal del procolágeno I (P1NP) y osteocalcina, véase la figura 2a y parámetros de formación de hueso basados en superficie tales como superficie de los osteoblastos, tasa de aposición mineral o tasa de formación de hueso en superficie (BFR/BS), véase figura 2b-c. La reabsorción osteoclástica no difirió entre los grupos (CTX-1), véase la figura 2a. Como se muestra en la figura 3, las tasas de formación de hueso en las superficies tanto endocortical como perióstica del fémur medio también aumentaron en 50-100%, con un marcado aumento en la remodelación ósea

intracortical en el grupo tratado con huMSC + LLP2A-Ale. Estos datos preliminares demuestran que LLP2A-Ale puede dirigir las MSCs al hueso para mejorar tanto la formación de huesos esponjosos y corticales como la masa ósea.

5 En la figura 8, los ratones MSPVII de tres meses recibieron una única inyección intravenosa de PBS, huMSC (5×10^5) o huMSC + LLP2A o LLP2A-Ale. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después. Después del sacrificio, se recogieron pequeñas porciones de órganos que incluían cuerpos vertebrales lumbares (LVB) y se congelaron en medios de incrustación de temperatura de corte óptima. Las secciones se tiñeron usando naftol-AS-BI- β -Dglucuronido (GUSB) como sustrato. Se presentaron secciones representativas de las regiones óseas trabeculares de las vértebras pulmonar, hepática, renal y lumbar (LVB). Las MSCs humanas, como se demostró mediante GUSB + tinciones rojas, se observaron acumuladas en pulmón, hígado y riñón a las 24 horas en los grupos huMSC, huMSC + LLP2A o huMSC +
10 LLP2A-Ale. También se observó una cantidad significativa de estas células adyacentes a la superficie del hueso solo en el grupo huMSCs + LLP2A-Ale (paneles inferiores). También se observaron células positivas GUSB aisladas dentro de la médula ósea del LVB en el grupo MSC (panel central).

15 Ratones NOD-SCID MPSVII. La cepa NOD-SCID MPSVII fue el resultado de un extenso retrocruzamiento del alelo mutante GUSB del ratón B6.C-H-2^{bm1}/ByBirgus^{mps/+} sobre el fondo NOD/LtSz-scid. Los animales fueron criados y mantenidos en el Stem Cell Department of the UC Davis Medical Center bajo protocolos de cuidado animal aprobados. Los animales afectados se generaron por ratones de reproducción heterocigotos para la mutación MPSVII. Los cachorros homocigotos con deficiencia de GUSB se identificaron al nacer mediante análisis bioquímicos del tejido del dedo del pie.

20 Marcadores bioquímicos del recambio óseo. Los niveles séricos del propéptido amino terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), osteocalcina y telopéptidos C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I) se midieron usando kits ELISA tipo sándwich de ratón de Biomedical Technologies (Stroughton, MA) o Immunodiagnostic System (Fountain Hills, AZ). Se siguieron los protocolos del fabricante y todas las muestras se analizaron por duplicado. Se generó una curva estándar de cada kit y las concentraciones absolutas se extrapolaron a partir de la curva estándar. Los coeficientes de variaciones (CVs) para las mediciones entre ensayos e intraensayos fueron inferiores al 10% para todos los ensayos y son similares a las referencias del fabricante (Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(6): p. 1674-86; Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(11): p. 3485-3497).

Ejemplo 5: LLP2A-Ale aumentó la formación de hueso y la masa ósea

30 Ratones 129SvJ hembras de dos meses recibieron inyecciones intravenosas (iv) de vehículo (PBS), 2A (5 nM), Ale (250 ng/ratón) o LLP2A-Ale [concentración de alendronato de 10 ng/ratón (70 ng de peso total del compuesto) o concentración de alendronato de 250 ng/ratón (1.75 μ g de peso total del compuesto)]. La dosis de alendronato usada para los experimentos fue al menos un décimo inferior a la dosis terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis (véase Colon Emeric, C.S., JAMA, 2006, 296(24): p. 2968-9; Ma, Y.L., et al., Endocrinology, 2003, 144(5): p. 2008-15). Como se muestra en la figura 9, dos días después de las inyecciones i.v., LLP2A solo aumentó el número de poblaciones de células proliferantes dentro de la cavidad medular. En contraste y como se muestra en la figura 9,
35 LLP2A-Ale aumentó estas poblaciones de células proliferantes adyacentes a la superficie del hueso. Con el fin de controlar los cambios microarquitectónicos óseos que resultaron de los tratamientos, se realizaron microCT in vivo repetidos de los fémures distales justo antes de las primeras inyecciones y después de cuatro semanas cuando se sacrificaron los ratones. Como se muestra en la figura 4, en comparación con el aumento de aproximadamente 2-5% en la masa ósea esponjosa en los grupos tratados con PBS, LLP2A y Ale, LLP2A-Ale, a un nivel de dosis mayor (250 ng), se incrementó la masa ósea esponjosa en casi 20 %. Como se muestra en la figura 4, el grosor trabecular se incrementó en dos niveles de dosis en comparación con el grupo tratado con PBS. Como se muestra en la figura 5a-c, LLP2A-Ale no modificó la maduración temprana de osteoblastos (niveles de P1NP) pero aumentó la función osteoblástica (osteocalcina) con aumentos significativos en los parámetros de formación de hueso basados en la superficie incluyendo superficie de osteoblastos, tasa de aposición mineral y velocidad de formación de hueso basado
40 en la superficie en la metafisis del fémur distal. Como se muestra en la figura 6, LLP2A aumentó la tasa de formación de hueso en las superficies tanto endocortical como perióstica de los fémures intermedios ($p > 0.05$). Como se muestra en la figura 6, LLP2A aumentó significativamente la tasa de formación de hueso en las superficies tanto endocortical como perióstica de los fémures medios ($p < 0.05$). No se observaron dosis-respuestas en el compartimento del hueso cortical.

50 En la figura 9, ratones 120SvJ hembras de dos meses recibieron una única inyección intravenosa de PBS, alendronato (500 ng/ratón), LLP2A (5 nm/ratón) o LLP2A-Ale (10 ng o 500 ng/ratón). Los ratones se sacrificaron 48 horas después del tratamiento.

55 MicroCT. El fémur distal derecho de cada uno de los animales se escaneó usando MicroCT (VivaCT 40, Scanco Medical, Bassersdorf, Suiza), con una resolución isótropa de 10 μ m en las tres dimensiones espaciales. La exploración se inició en el margen perióstico lateral a través del margen periosteal medial del fémur distal y 0.1 mm desde la parte más alta de la placa de crecimiento que continúa proximalmente durante 2 mm. El hueso mineralizado se separó de la médula ósea con un algoritmo de segmentación 3D del cubo correspondiente. Se utilizó un índice normalizado, volumen óseo trabecular/volumen total (BV/TV), para comparar muestras de diferentes tamaños. El grosor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y el número trabecular (Tb.N) también se calcularon como se describió previamente

(Lane, N.E. et al., J Bone Miner Res, 2006, 21(3): p. 466-76; Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(6): p. 1674-86; Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(11): p. 3485-3497).

5 Histomorfometría ósea. Después de la fijación en paraformaldehído al 4%, los fémures distales derechos, los fémures medios y los cuerpos vertebrales de la lumbar 5ª se deshidrataron en concentraciones graduales de etanol y xileno y se incrustaron sin descalcificar en metacrilato de metilo. Las secciones frontales (8 µm de espesor) se cortaron usando un microtomo de lecho vertical (Leica/Jung 2265) y se fijaron a portaobjetos recubiertos con una solución de gelatina al 2%. Se usaron secciones sin teñir de 8 mm de espesor para evaluar el etiquetado de fluorocromo y los cambios dinámicos en el hueso. La histomorfometría ósea se realizó mediante un análisis de imagen semiautomático (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN) vinculado a un microscopio equipado con luz transmitida y fluorescente. Las mediciones del recambio óseo incluyeron el perímetro único (sL.Pm) y marcado doble(dL.Pm), el ancho intermarcado (Ir.L.Wi) y la superficie del osteoclasto. Estos índices se usaron para calcular la superficie de mineralización (MS/BS) y la tasa de aposición mineral (MAR) y la tasa de formación de hueso basado en superficie (BFR/BS) en las superficies trabecular, endocortical y periosteal (Lane, N.E., et al., J Bone Miner Res, 2006, 21(3): p. 466-76; Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(6): p. 1674-86; Yao, W., et al., Arthritis Rheum, 2008, 58(11): p. 3485-3497; Yao, W., et al., Bone, 1999. 25(6): p. 697-702).

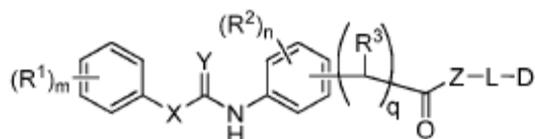
20 Tinción inmunohistoquímica. Las muestras de hueso se fijaron en paraformaldehído al 4%, se descalcificaron en EDTA al 10% durante 10 días y se incrustaron en parafina. Se obtuvieron secciones de cuatro mm y se incubaron en H₂O₂ al 3% en agua para bloquear las peroxidasas endógenas. A continuación, los portaobjetos se incubaron con suero de burro normal al 1% en PBS Tween 20 en PBS. Luego, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios. Después de bloquear con peroxidasa, las secciones se incuban con el anticuerpo secundario para la detección. Se incluyó el control negativo cuando se omitió el anticuerpo primario para diferenciar la tinción inespecífica.

25 Análisis histoquímicos de la actividad enzimática. Después del sacrificio, se recogieron pequeñas porciones de órganos y se congelaron en medios de incrustación de temperatura de corte óptima (Sakura, Torrance, CA) y se seccionaron en rebanadas de 12 µm de grosor. El análisis histoquímico específico de GUSB se realizó usando naftol-AS-BI-β-D-glucurónido (Sigma-Aldrich) como sustrato, seguido de contratinción con verde de metilo.

Estadística. La significación estadística se evaluó mediante análisis de varianza seguido de la prueba post-hoc de Dunnett para las comparaciones entre los grupos de tratamiento con el grupo de control de vehículo de PBS. P <0.05 se consideró significativo. Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



5 en la que cada R¹ y R² se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆;

R³ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁₋₆ y cicloalquilo C₃₋₈;

X se selecciona del grupo que consiste en O, S y NH;

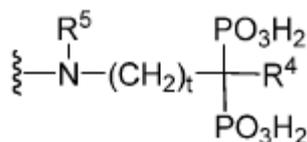
Y se selecciona del grupo que consiste en O y NH;

10 alternativamente, R¹ o R² se combina con Y y los átomos a los que están unidos forman un anillo heteroarilo de 5 miembros;

Z es un péptido que tiene 3-20 aminoácidos seleccionados independientemente, en el que al menos un aminoácido se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido no natural y un D-aminoácido;

L es un enlazante;

D es un fármaco de bisfosfonato, en el que D tiene la fórmula:

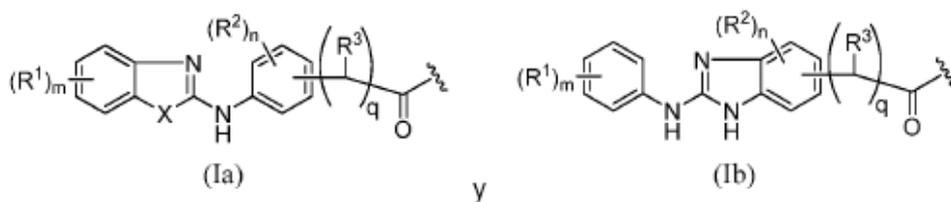


15 en la que R⁴ se selecciona del grupo que consiste en H, OH y halógeno;
R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₆; y el subíndice t es de 1 a 6;

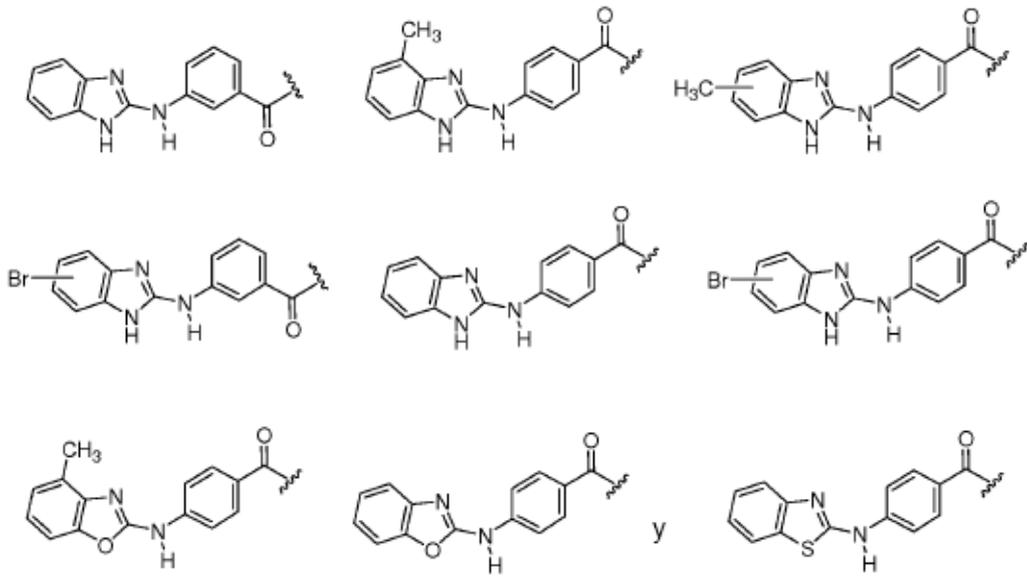
los subíndices m, n y q son cada uno independientemente de 0 a 2;

20 y sales e isómeros de los mismos.

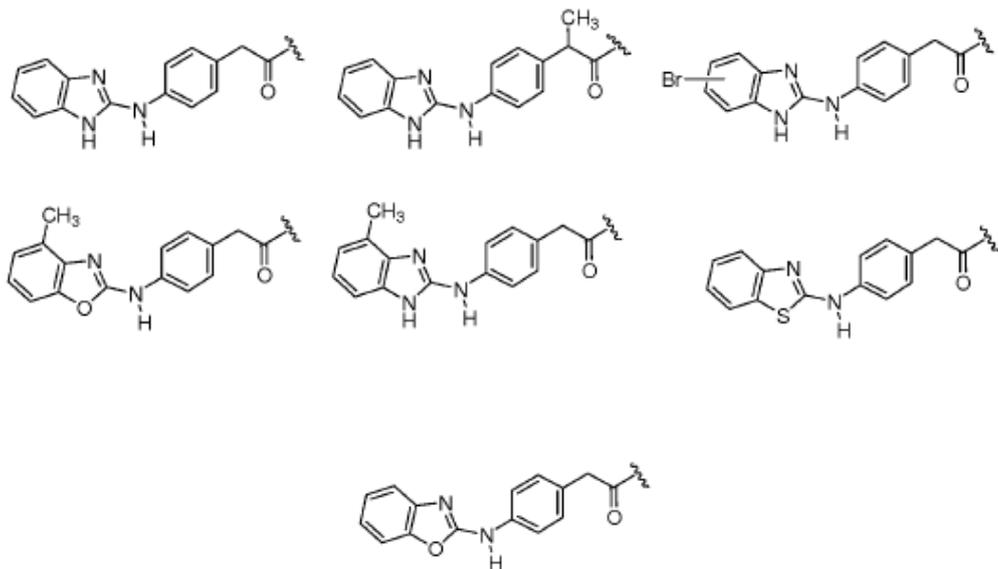
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la porción del compuesto unido a Z tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



25 preferiblemente, en el que la porción del compuesto unido a Z tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



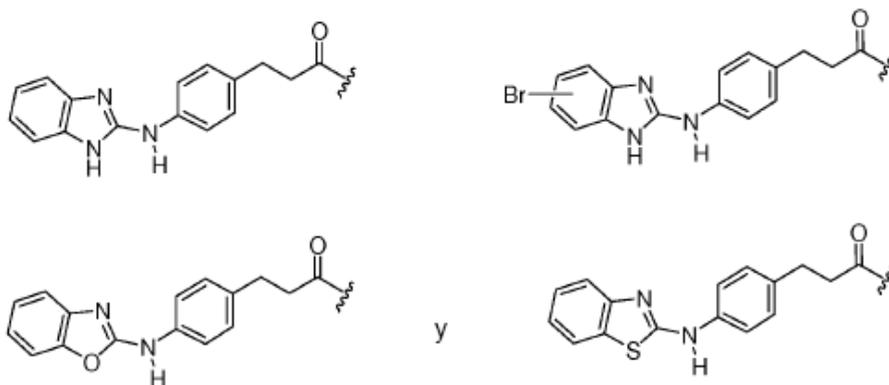
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la porción del compuesto unido a Z tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



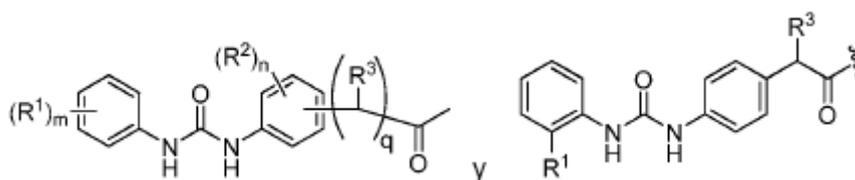
5

y

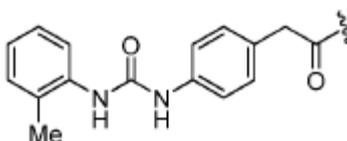
preferiblemente, en el que la porción del compuesto unido a Z tiene una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



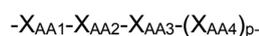
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la porción del compuesto unido a Z es una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



5 preferiblemente, en la que la porción del compuesto unido a Z tiene la fórmula:



5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el péptido Z tiene la fórmula:



en la que

10 X_{AA1} se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido hidrófobo y derivados de lisina, homolisina (Hly), ornitina (Orn) y ácido α , γ -diaminobutírico (Dbu);

X_{AA2} es un aminoácido cargado negativamente;

X_{AA3} es un aminoácido hidrófobo;

15 X_{AA4} se selecciona del grupo que consiste en un aminoácido de origen natural, un aminoácido no natural y un D-aminoácido; y

el subíndice p es 0 o 1

preferiblemente, en el que

X_{AA1} es lisina-A38 (Lys38);

X_{AA2} es ácido α -aminohexanodioico (Aad);

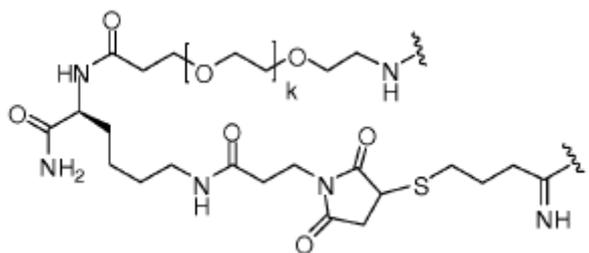
20 X_{AA3} es un D-aminoácido; y

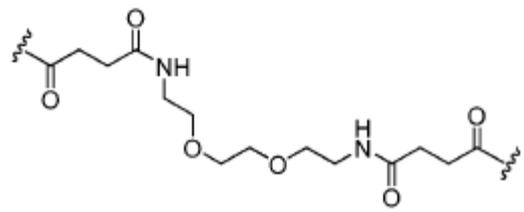
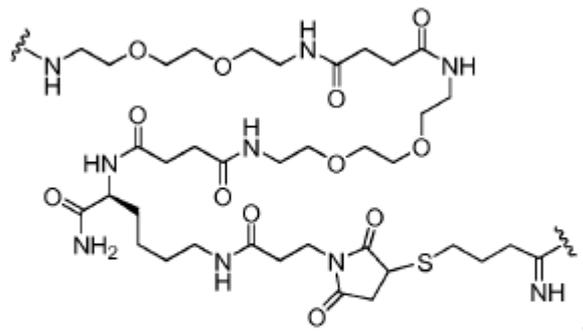
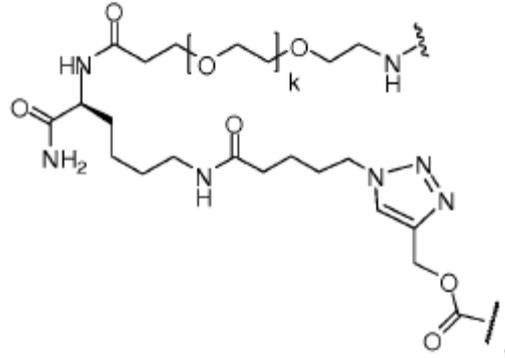
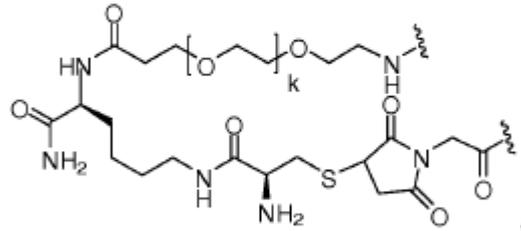
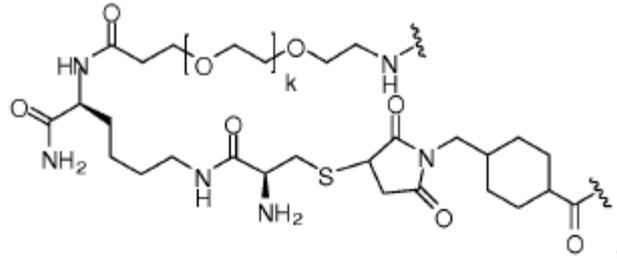
el subíndice p es 0.

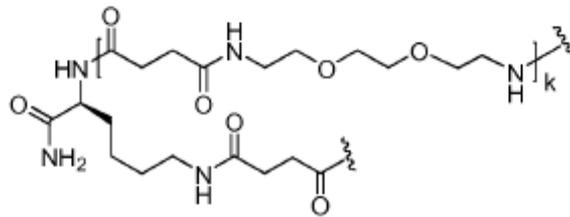
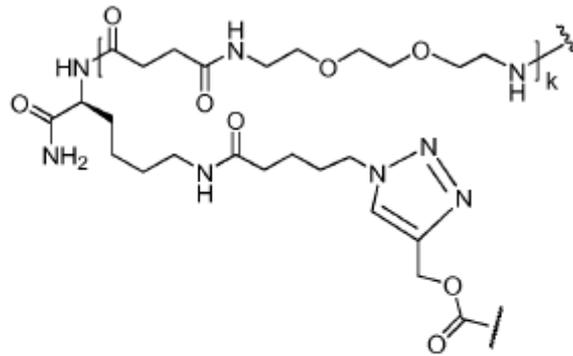
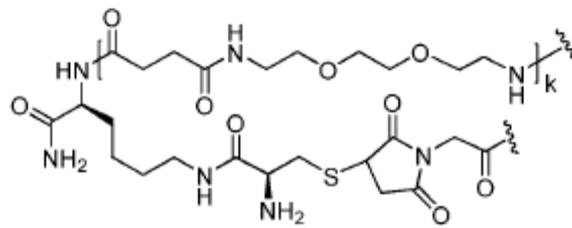
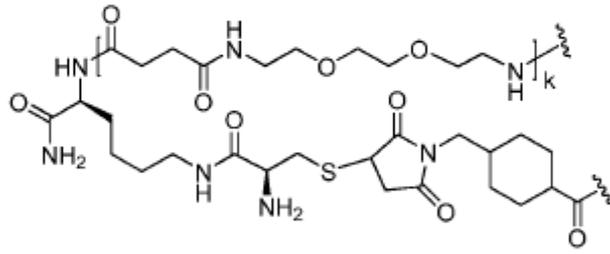
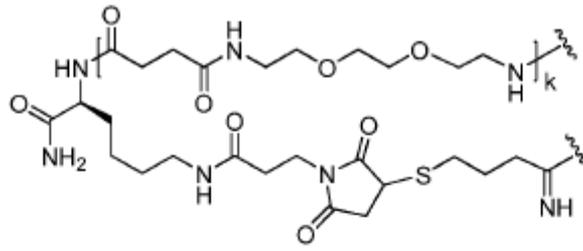
6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el péptido Z se selecciona del grupo que consiste en -Lys38-Aad-D-Phe, -Lys38-Aad-Ach, -Lys38-Aad-D-Nal-2, -Lys38-Aad-Ile, -Lys38-Aad-Val, y -Lys38-Aad-Leu preferiblemente, en el que el péptido Z es -Lys38-Aad-Ach.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el enlazante L comprende al menos uno de ácido N-(8-amino-3,6-dioxa-octil)succinámico (EBES) y polietilenglicol (PEG).

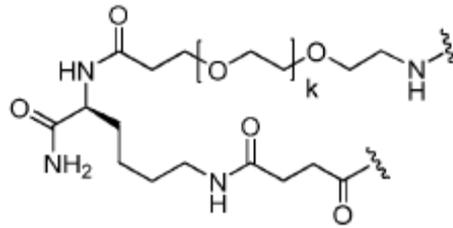
8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el enlazante L se selecciona del grupo que consiste en:





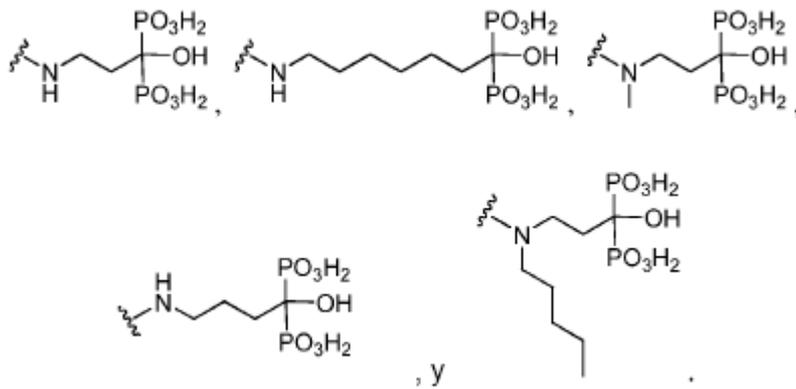


y



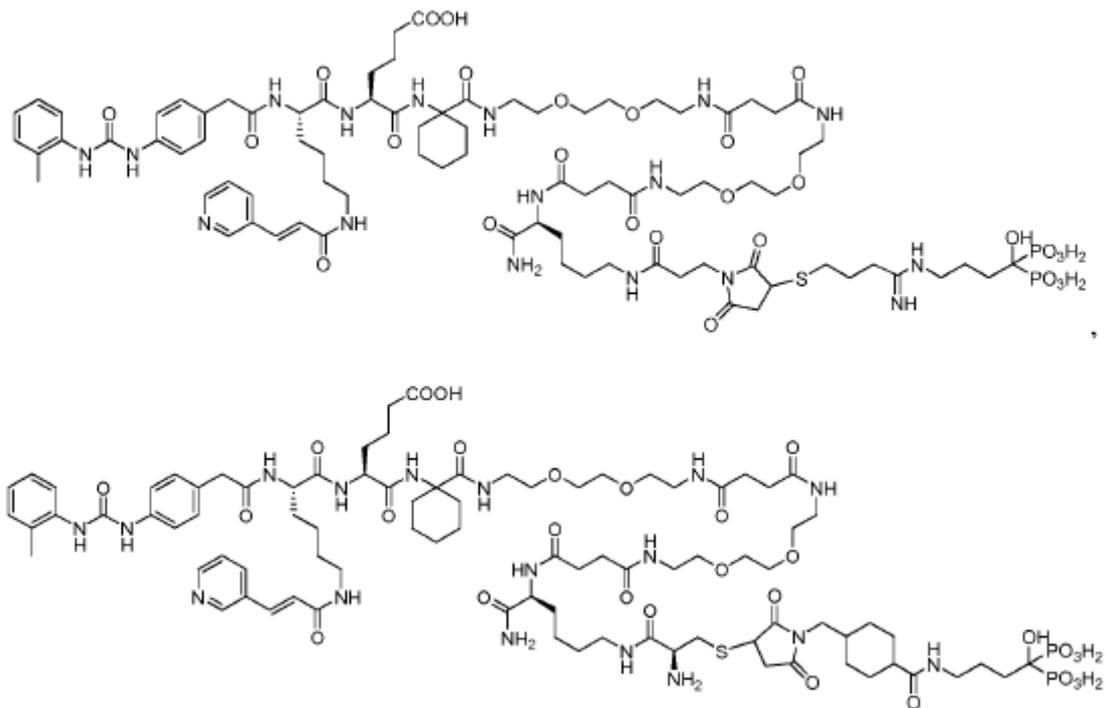
en la que k es desde 0 a 6.

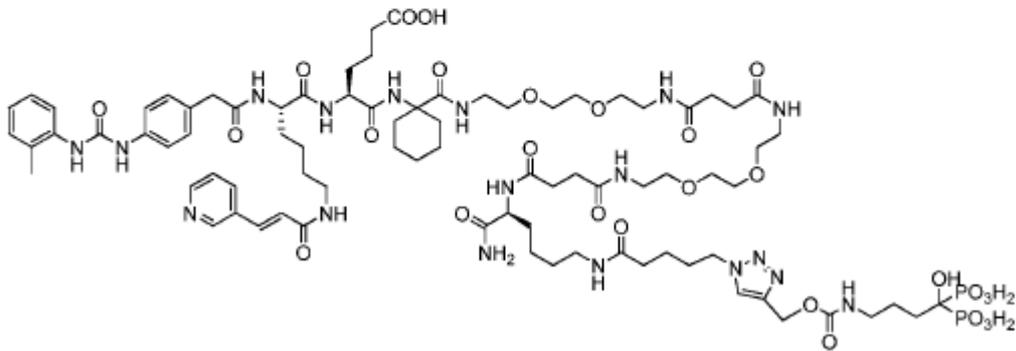
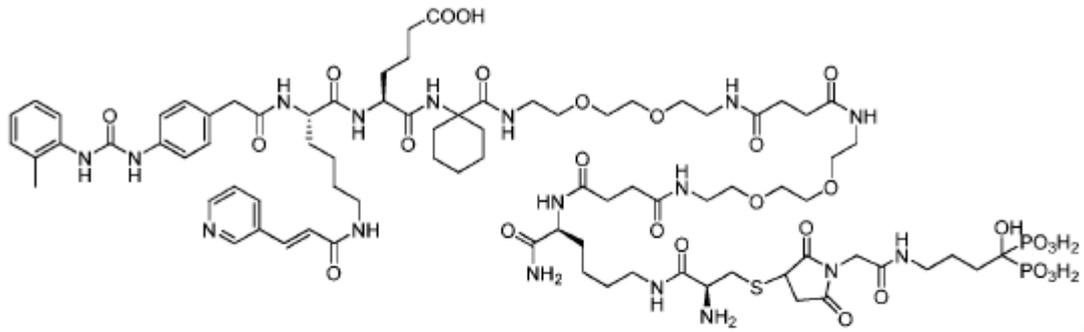
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que D tiene la fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



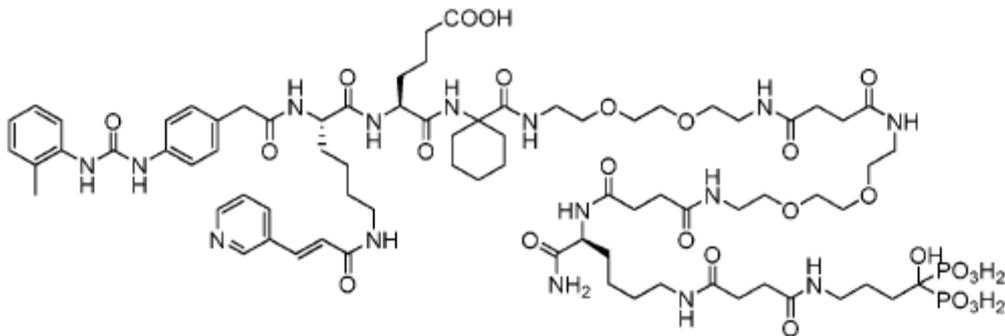
5

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que tiene la fórmula seleccionada del grupo que consiste en:





y



- 5 11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de la osteoporosis, promover el crecimiento óseo, o tratar una masa ósea baja, preferiblemente en el que dicho compuesto se usa en combinación con células madre mesenquimales.
- 10 13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por masa ósea baja secundaria inducida, preferiblemente en el que dicha enfermedad o afección es artritis, tratamiento con corticosteroides, masa ósea baja inducida por inmunosupresores o masa ósea baja inducida por quimioterapia.
14. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de lesión ósea, preferiblemente en el que dicha lesión ósea es una fractura.
- 15 15. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria del intestino y colitis ulcerosa.

Figura 1

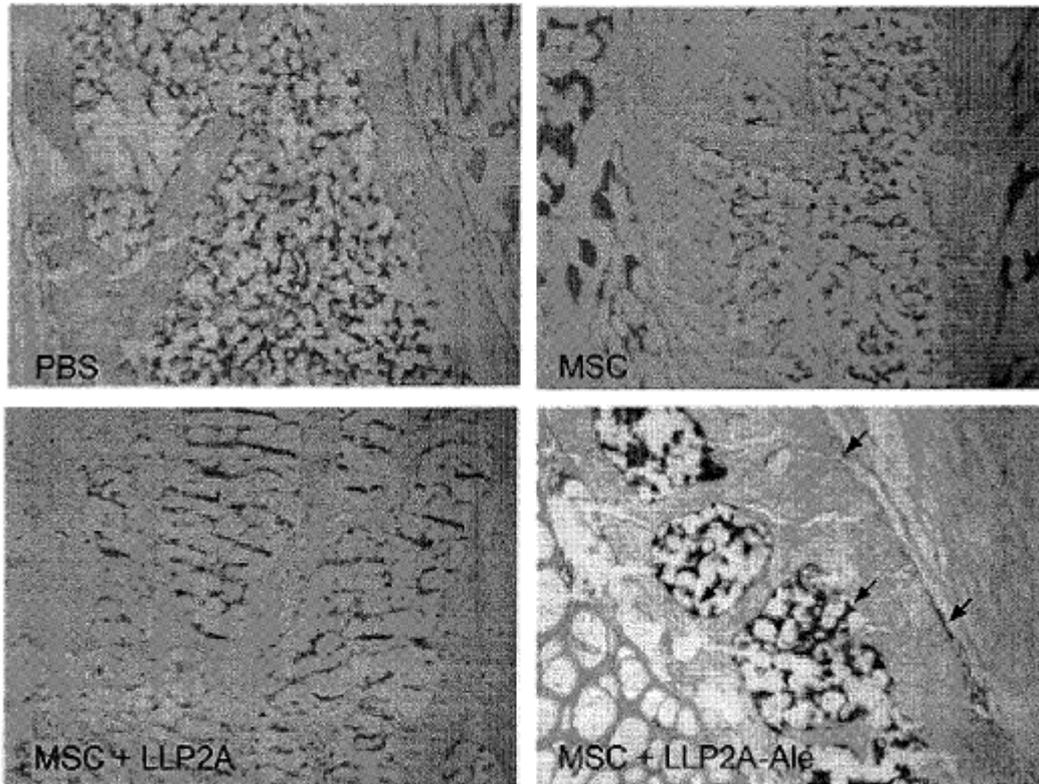


Figura 2

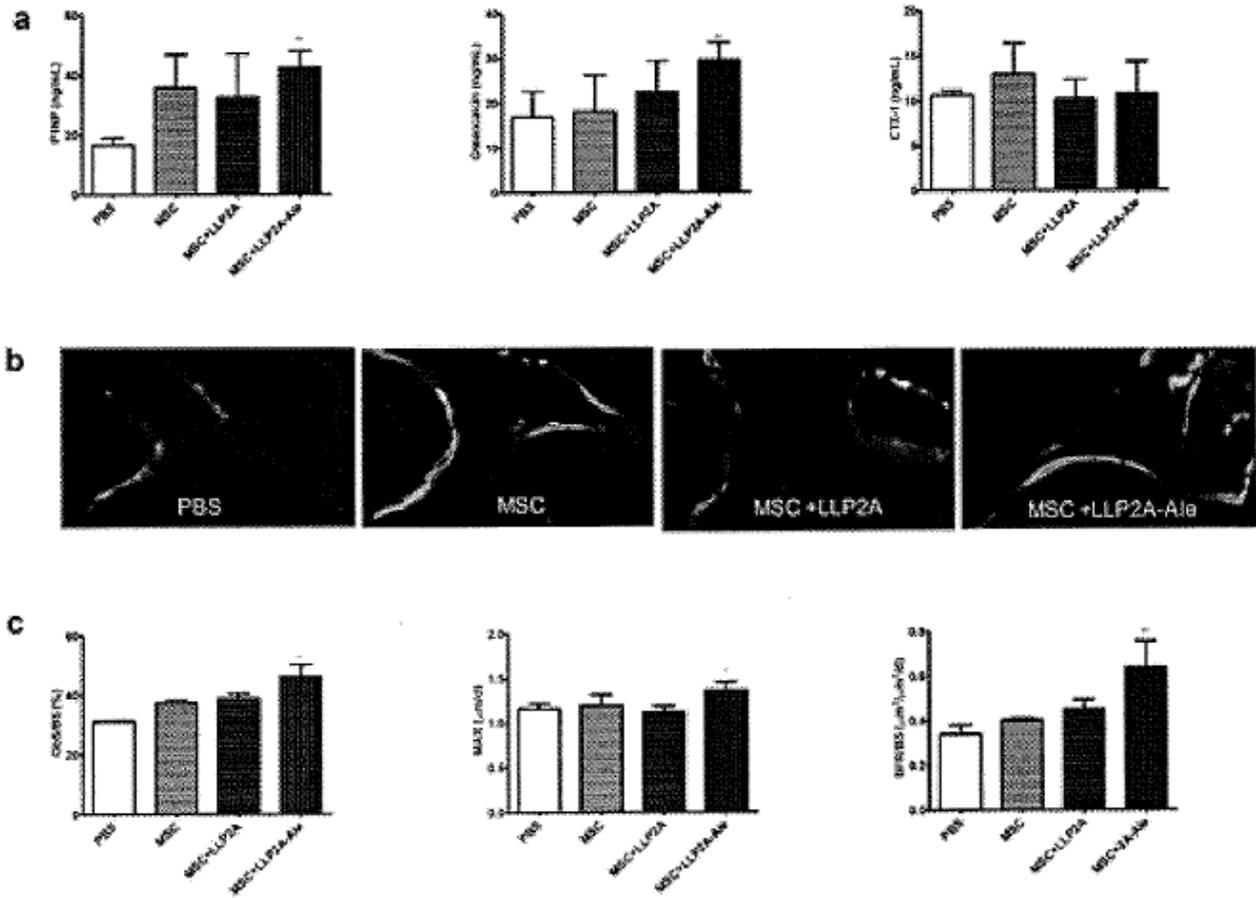


Figura 3

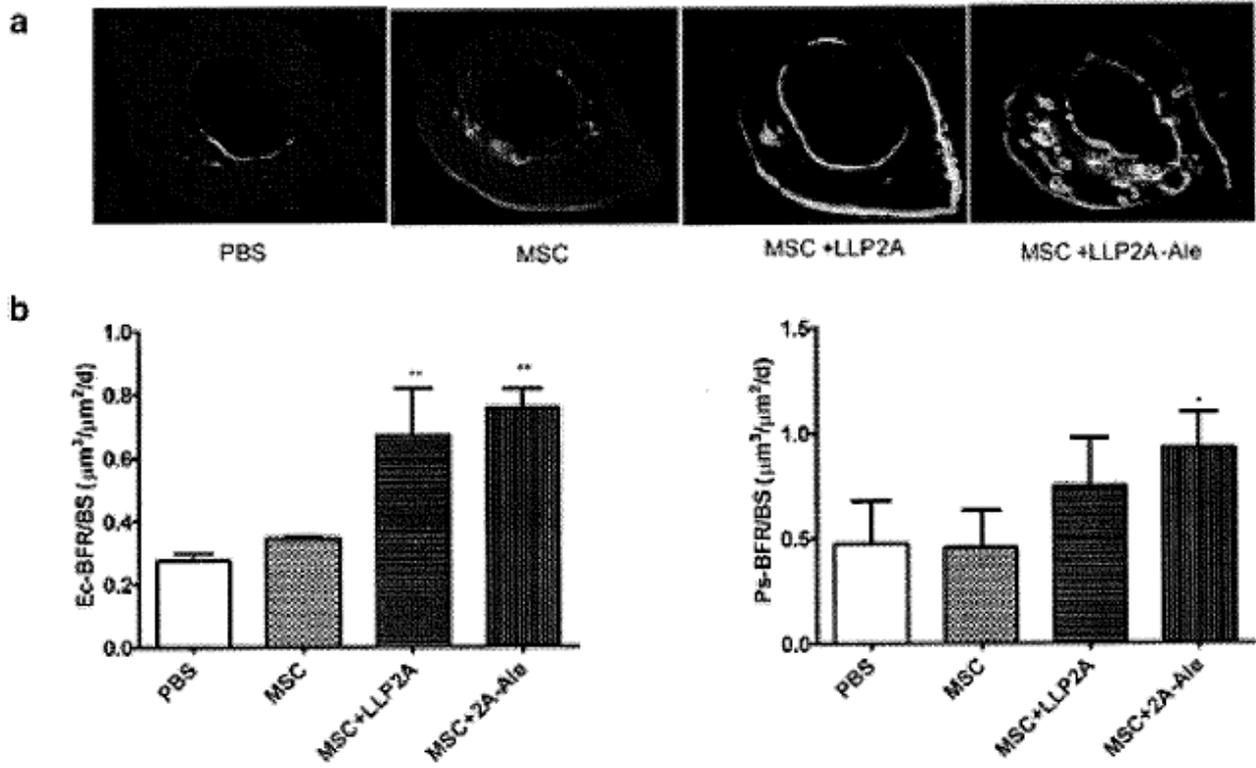


Figura 4

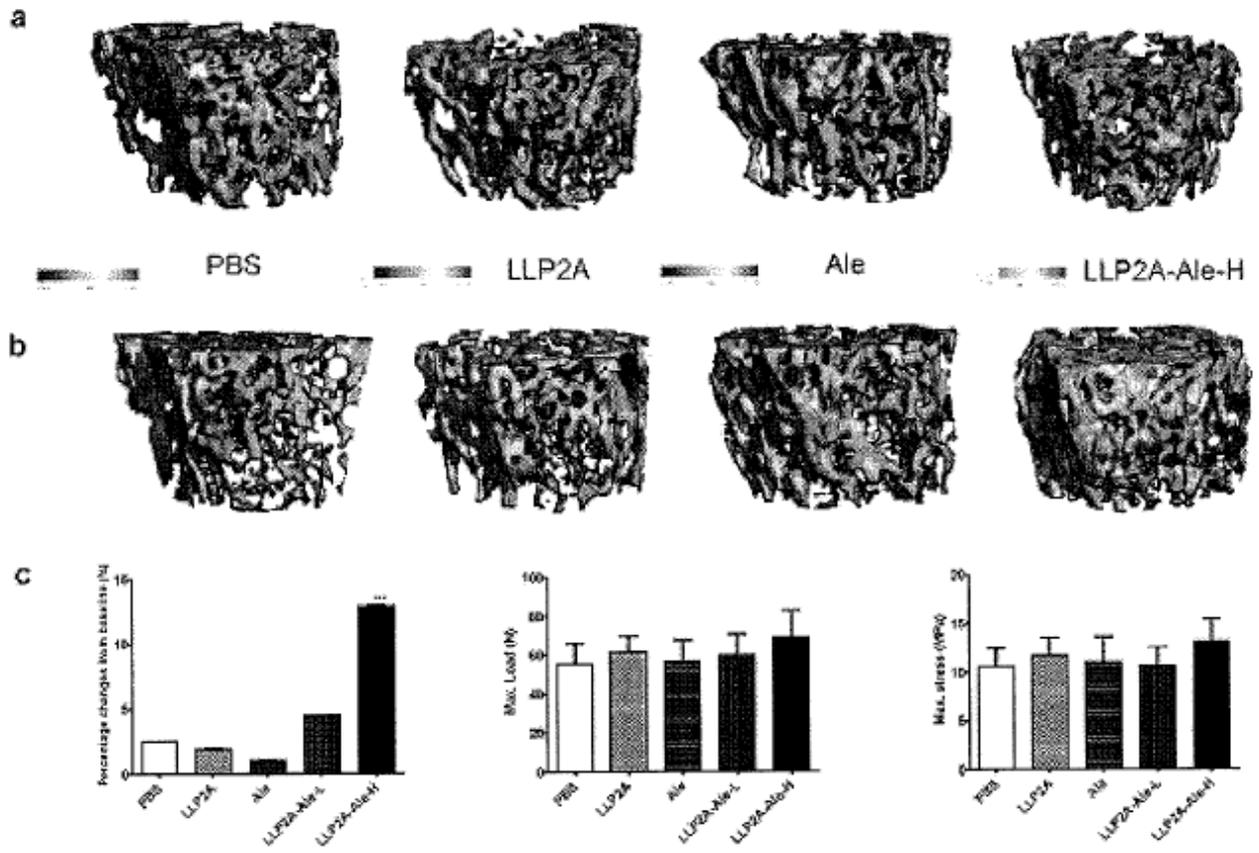


Figura 5

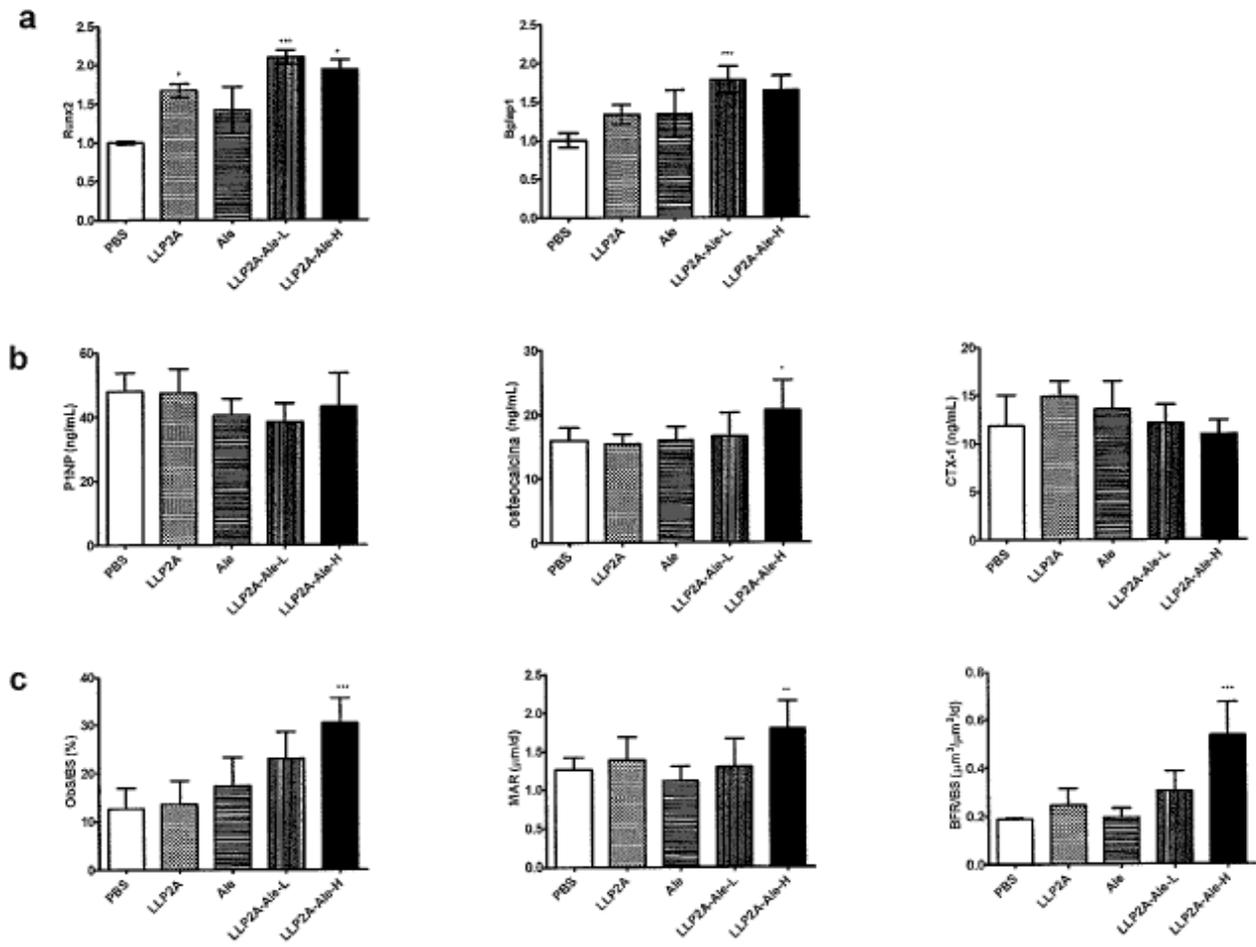


Figura 6

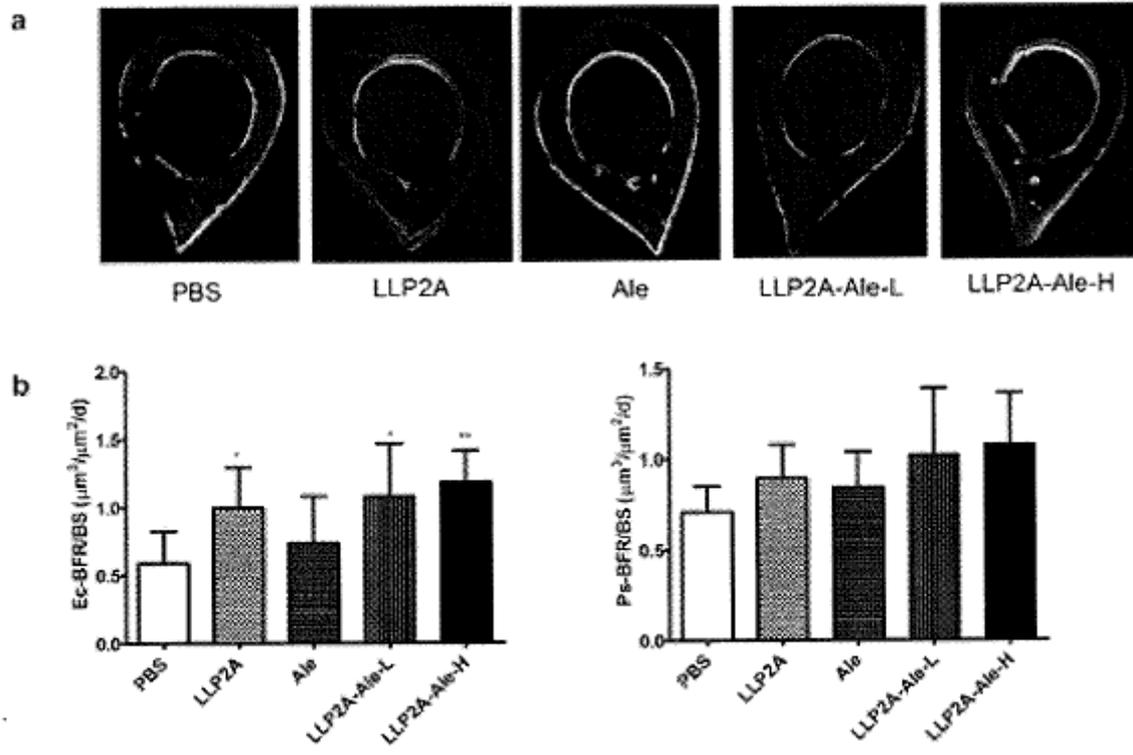
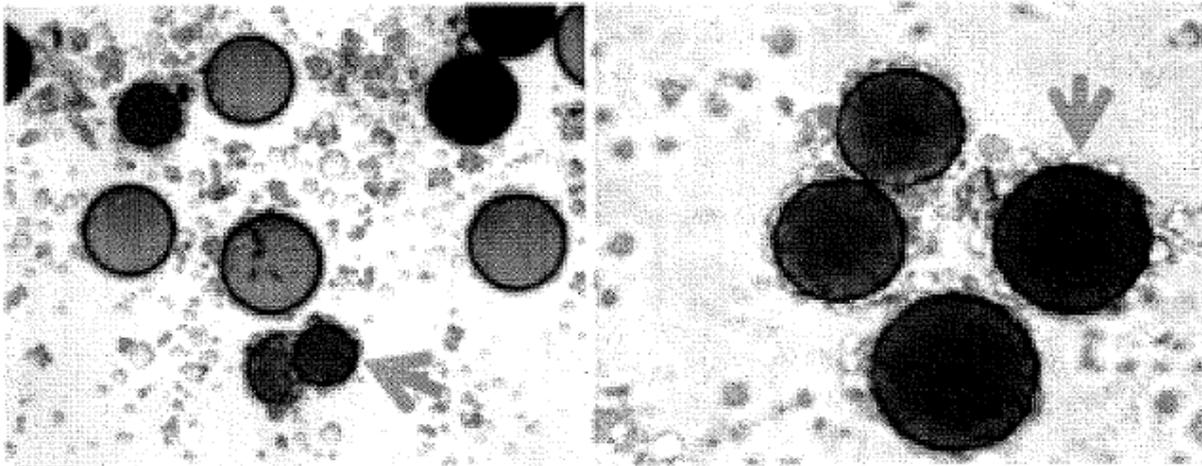


Figura 7



Color perlas	Nombre ligando	$\alpha 4\beta 1$	$\alpha 5\beta 1$	$\alpha v\beta 3$	$\alpha 3\beta 1$	$\alpha v\beta 5$
morado	LLP2A	++++
negro	RGD1	.	++++	++++	+	+++
rosa	RGD2	.	.	+	++++	++++
verde	LYK1	.	++	++++	+	+++

Figura 8

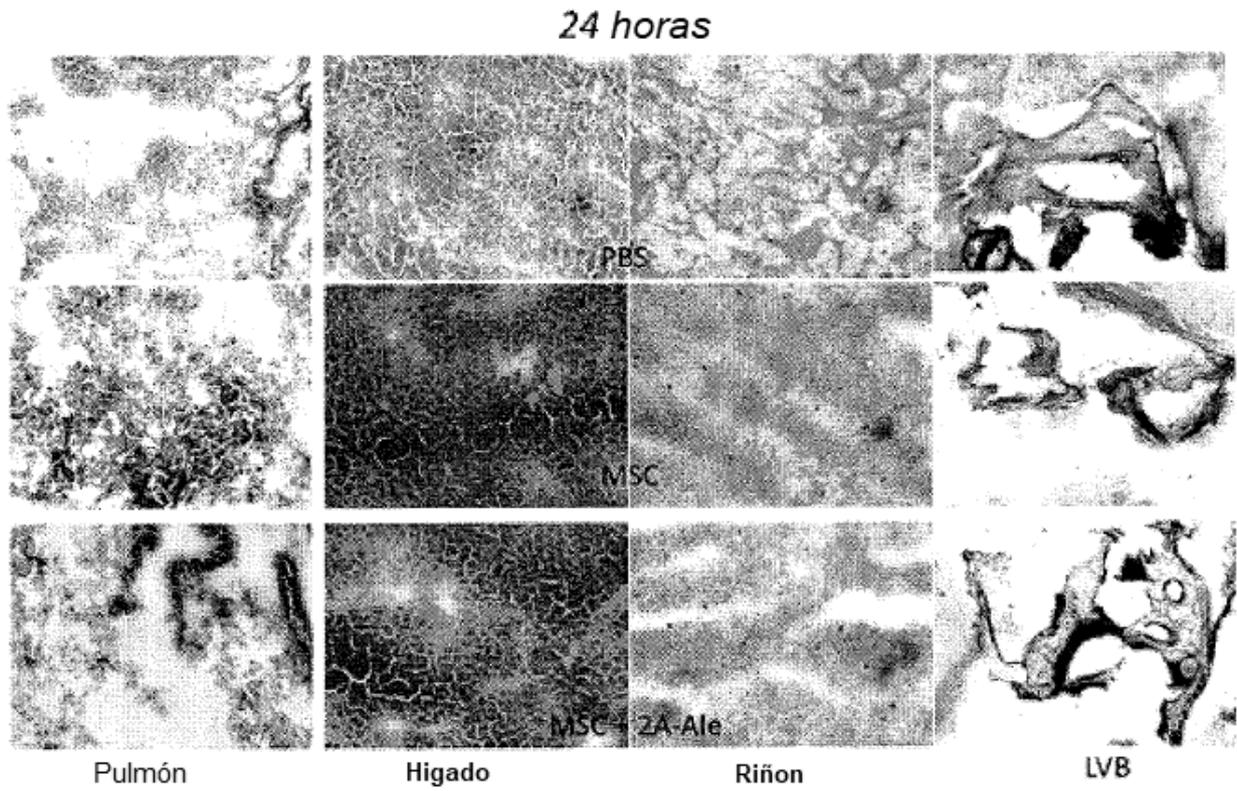


Figura 9

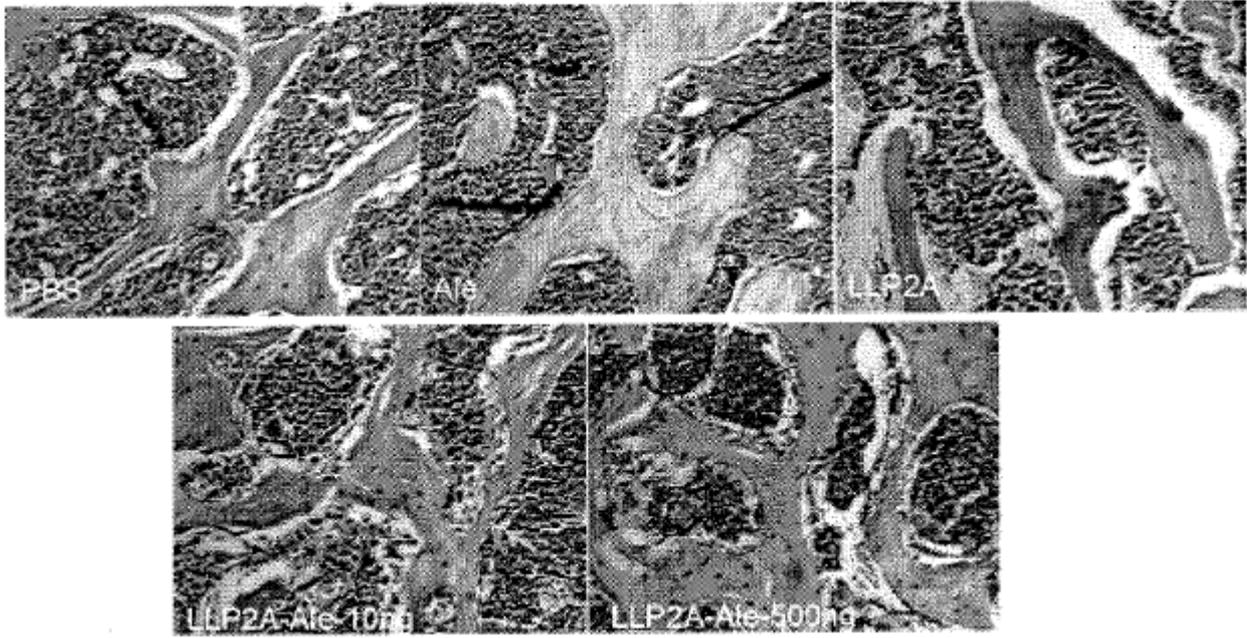


Figura 10

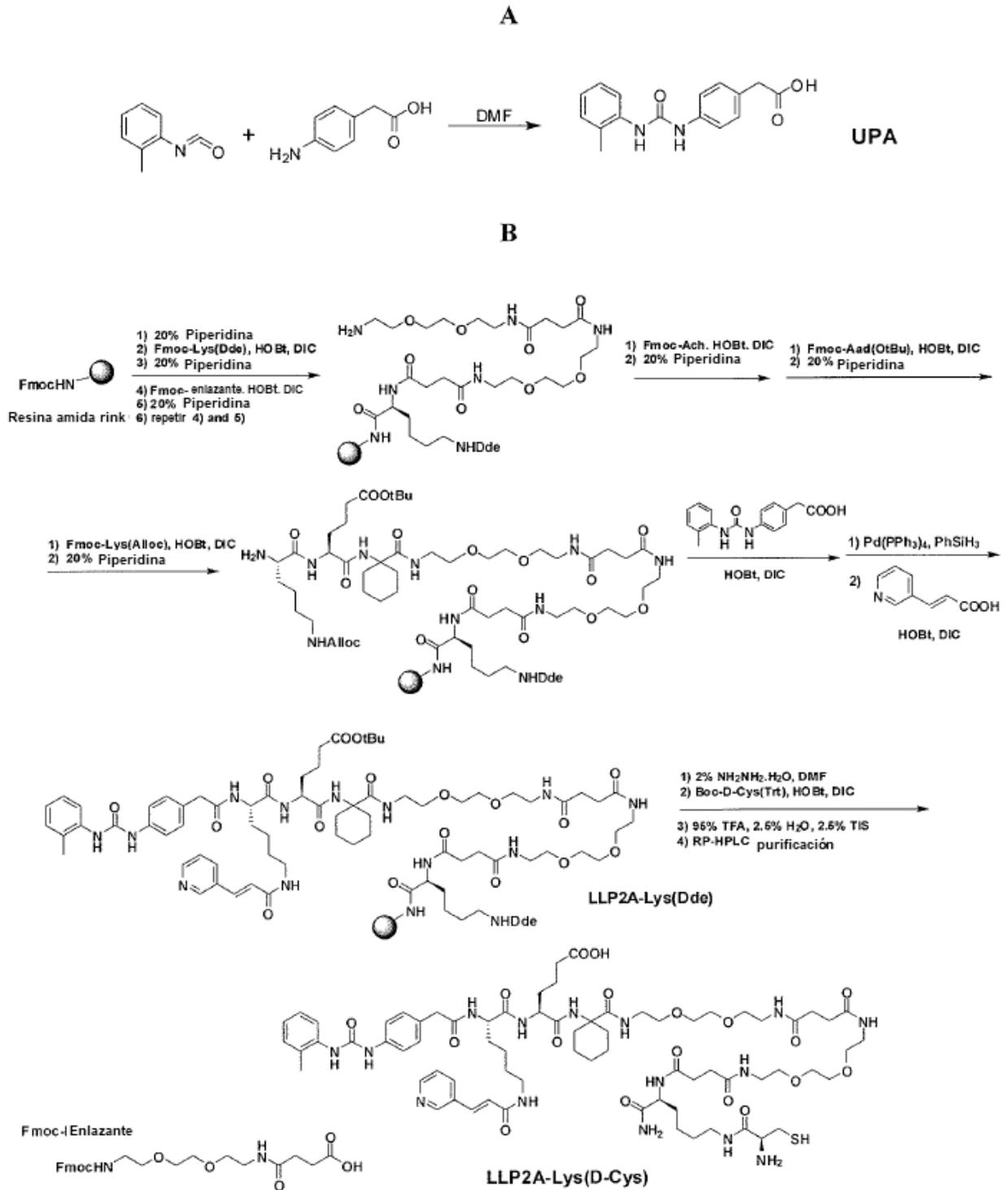


Figura 10

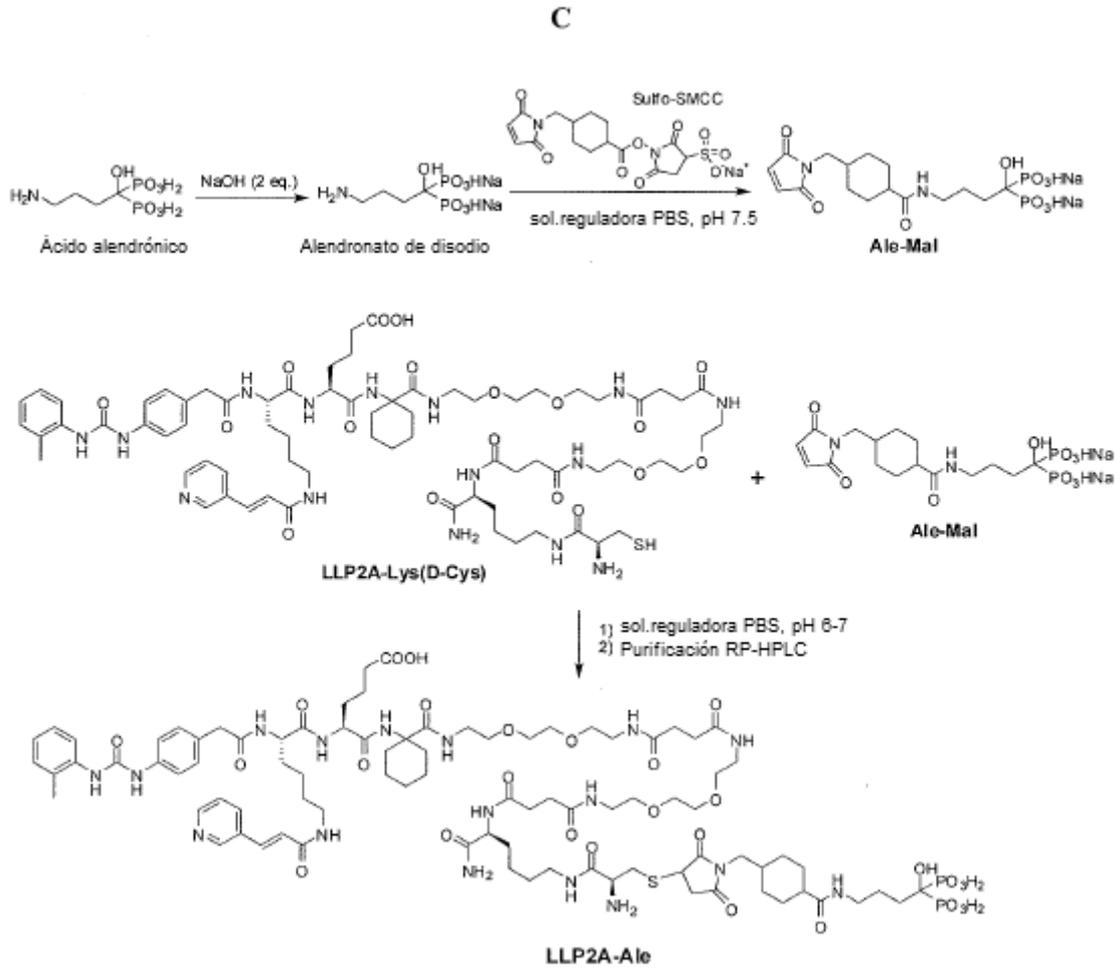


Figura 12

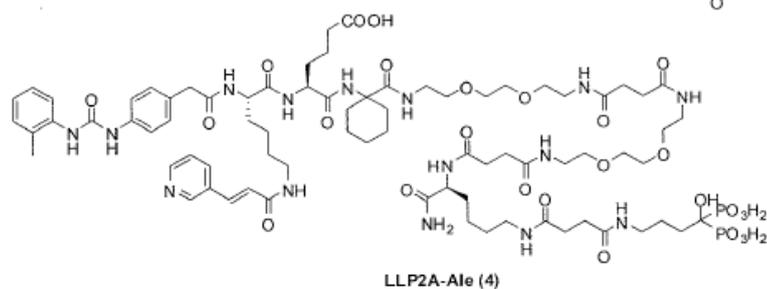
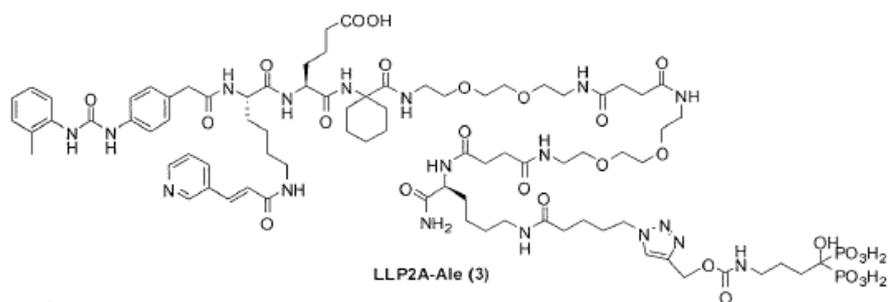
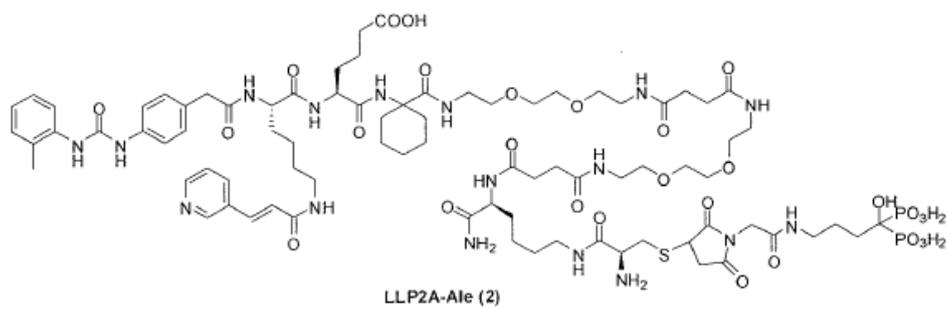
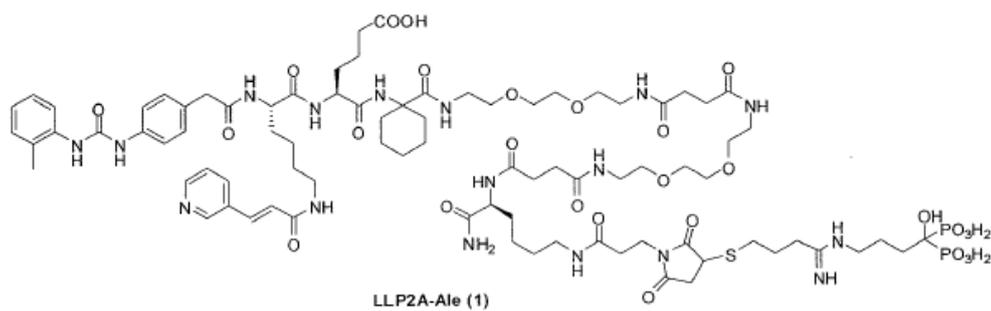
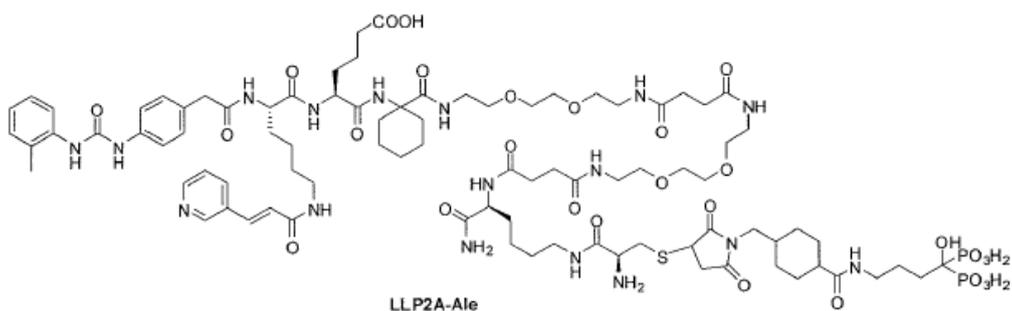


Figura 13A

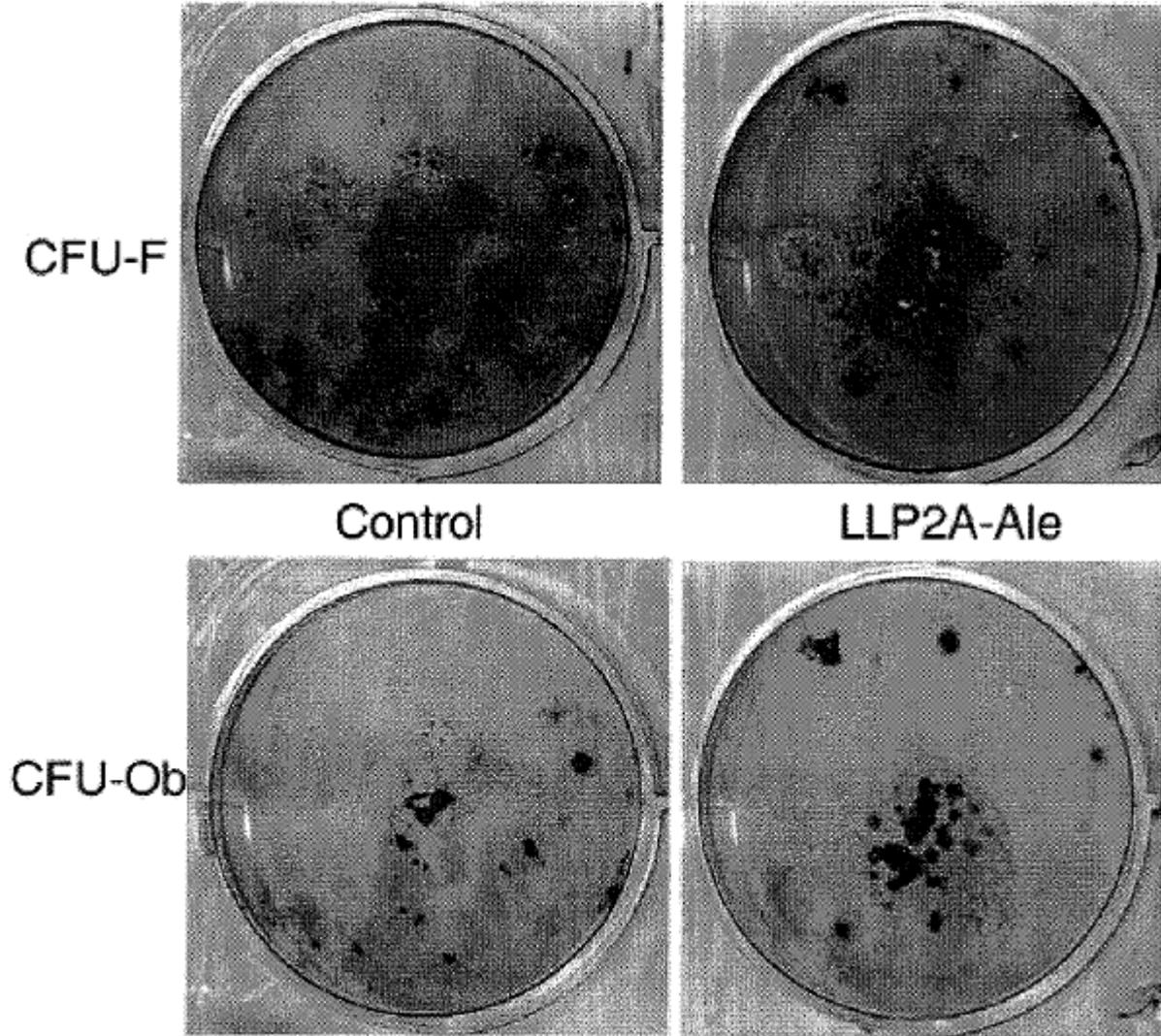


Figura 13B

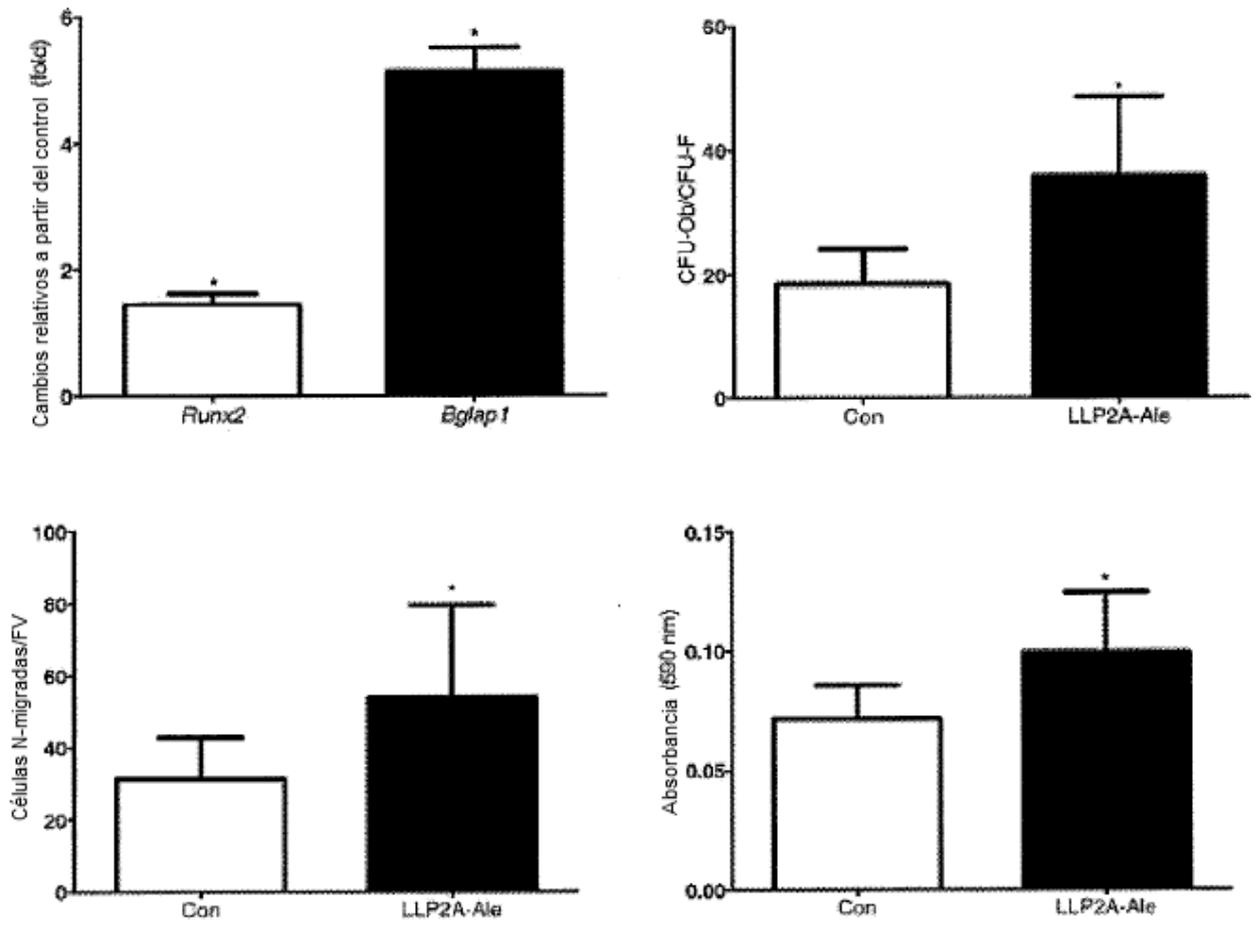


Figura 14

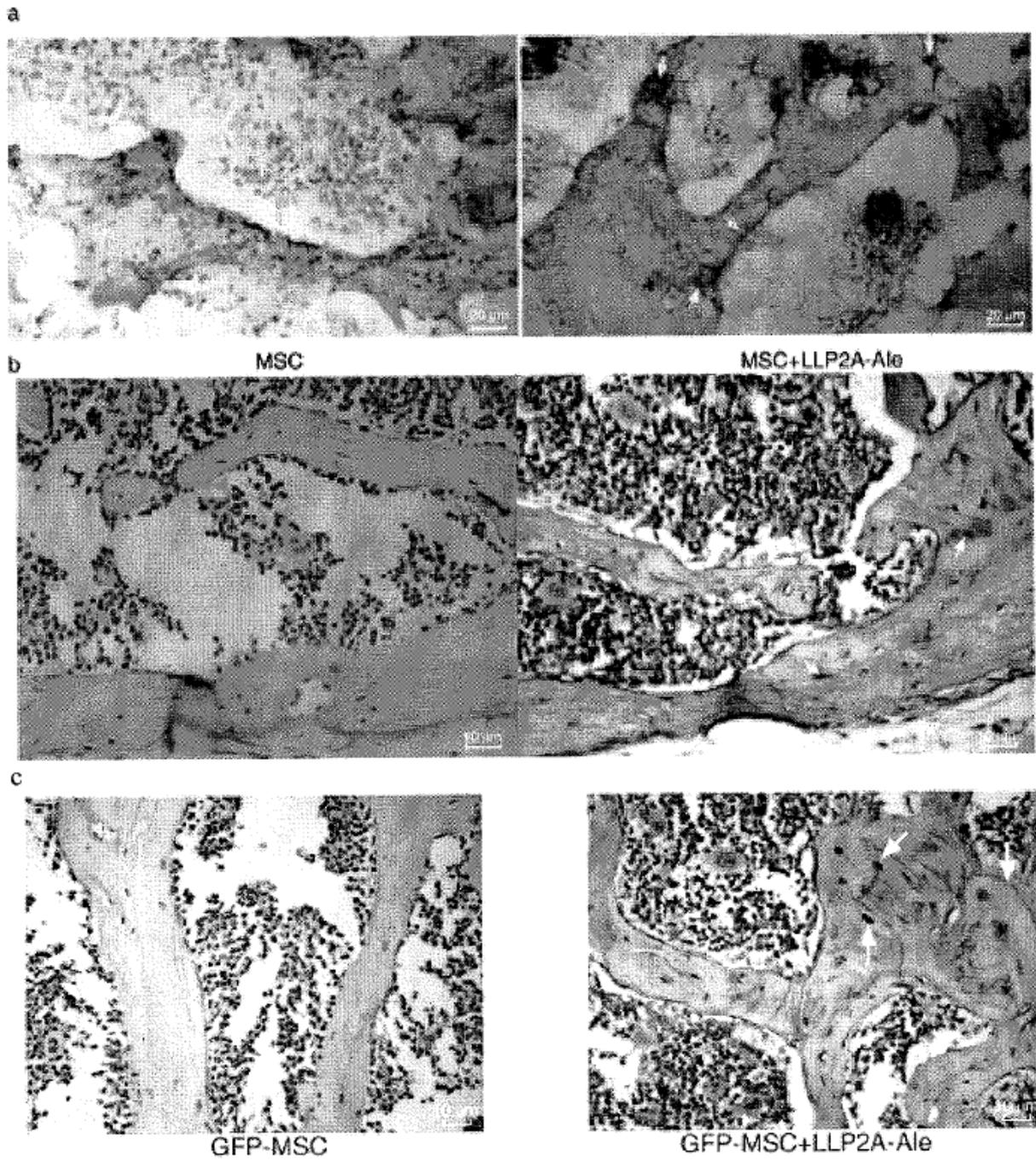


Figura 15

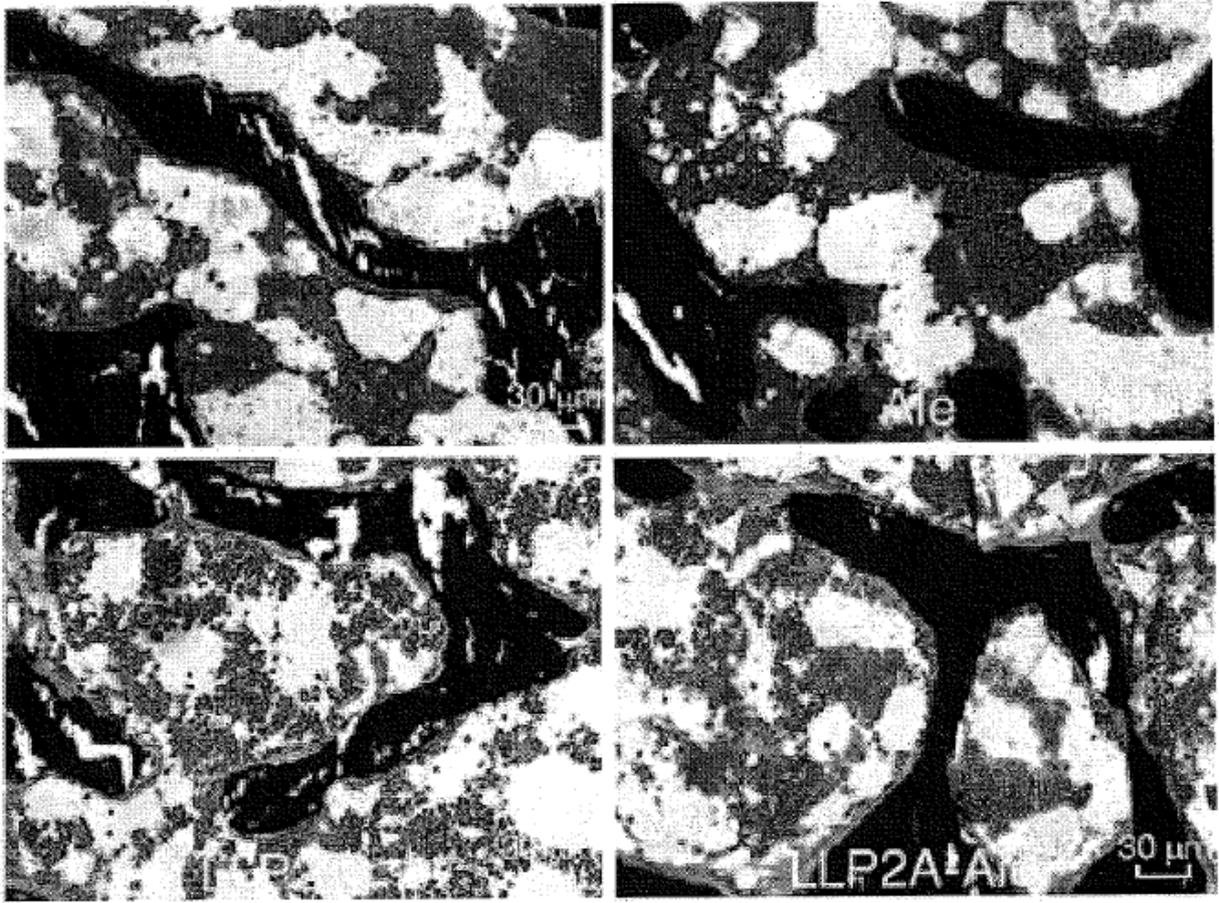
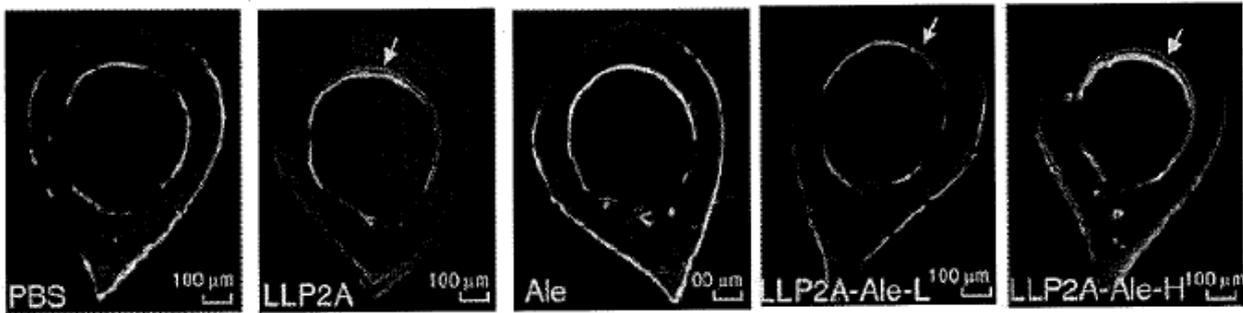


Figura 16

A



B

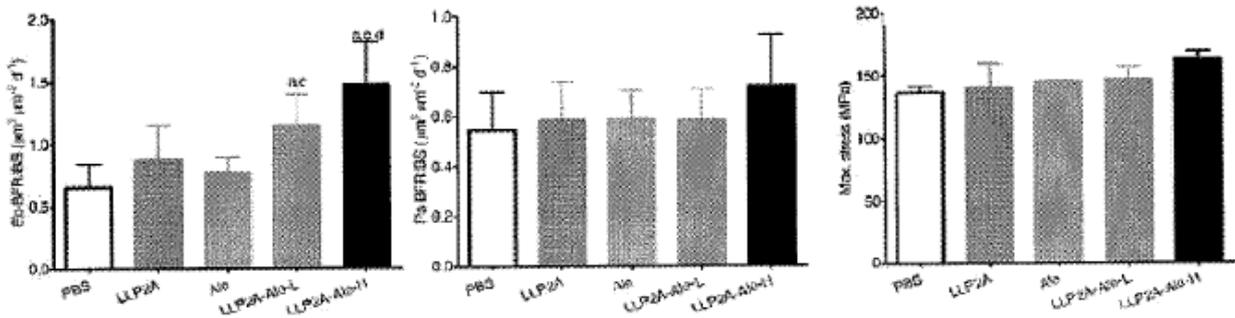


Figura 17

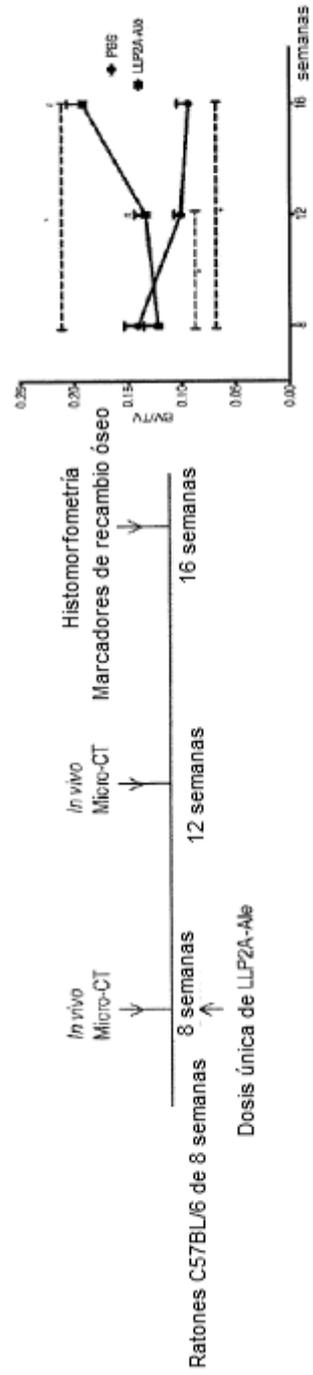


Figura 18

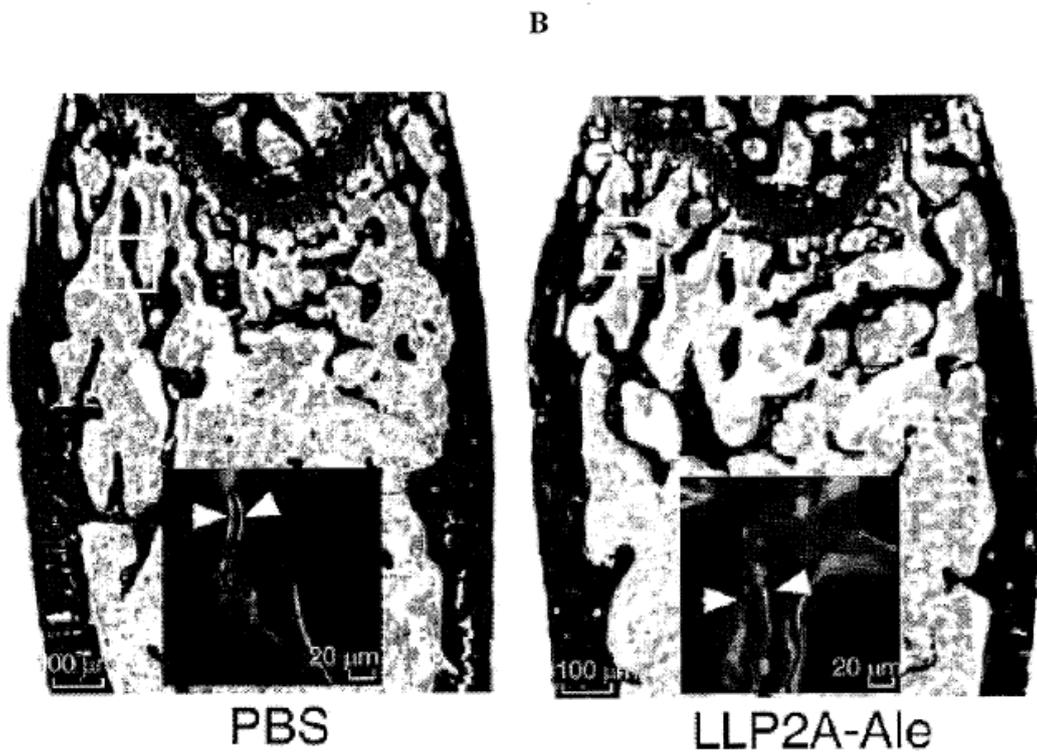
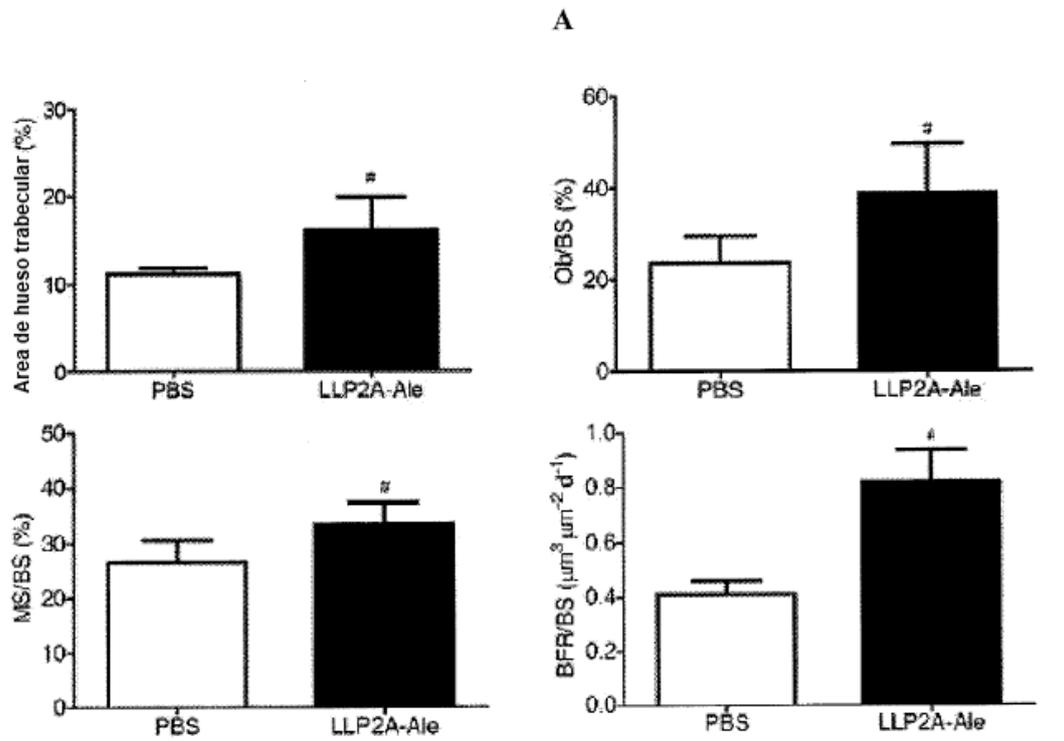


Figura 19

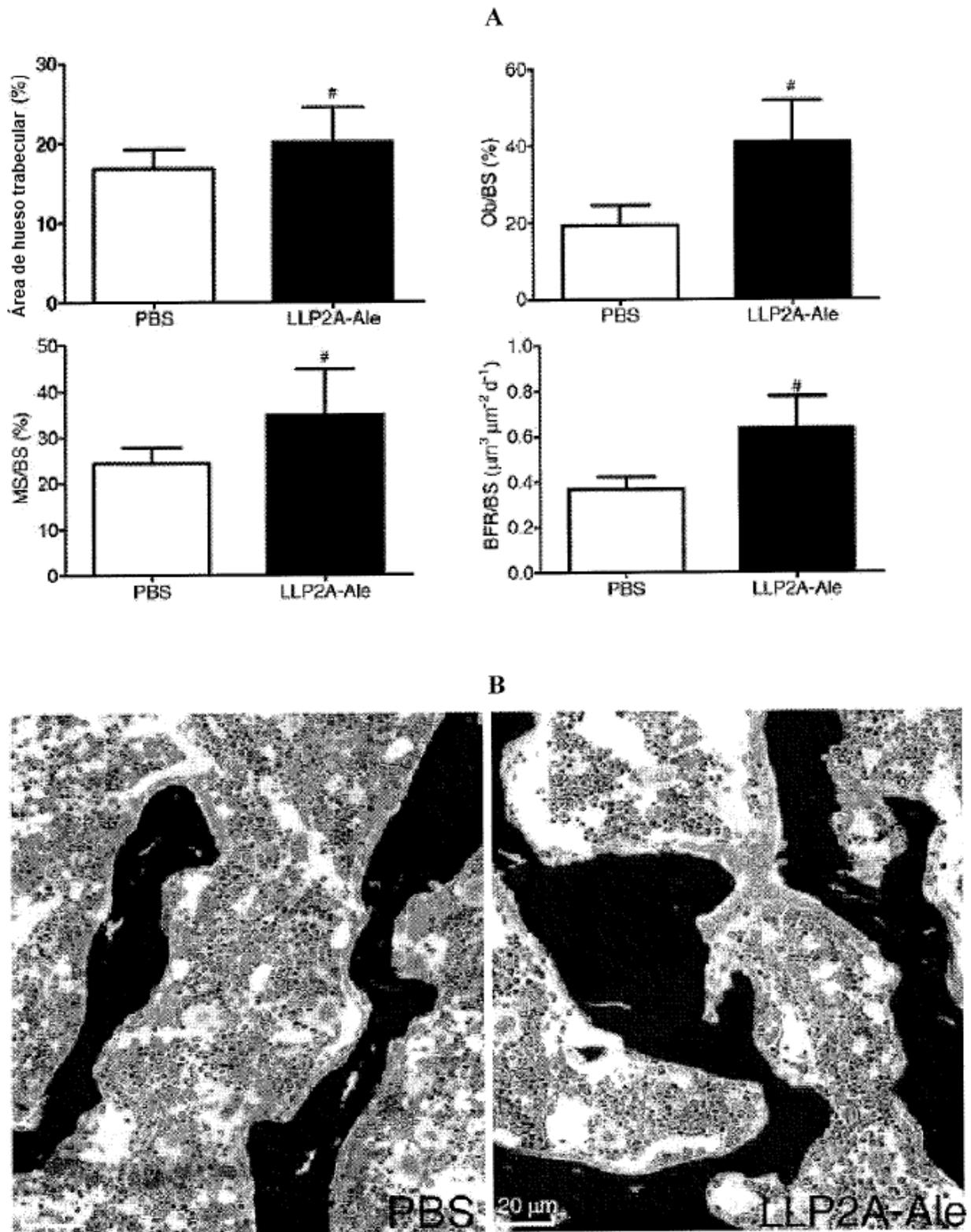
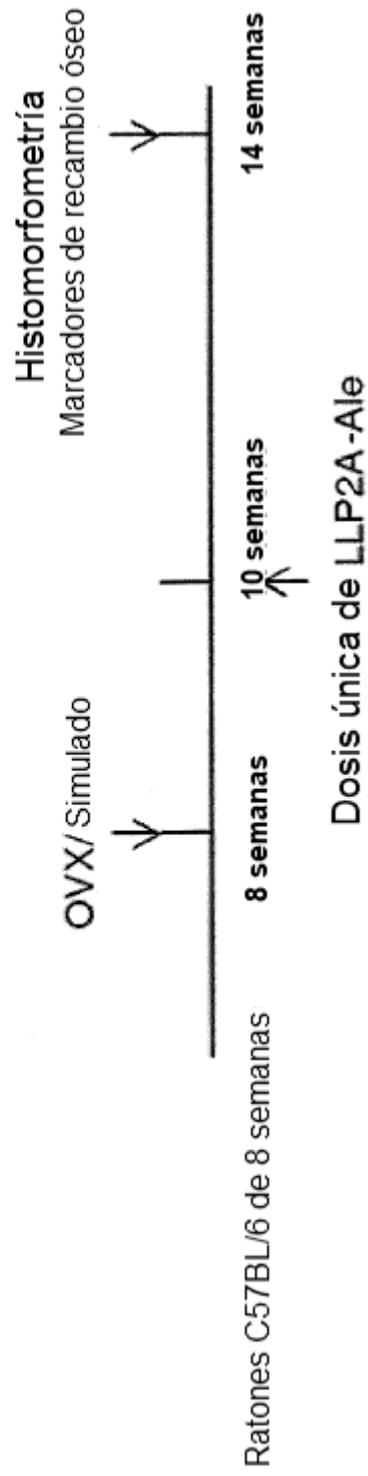


Figura 20



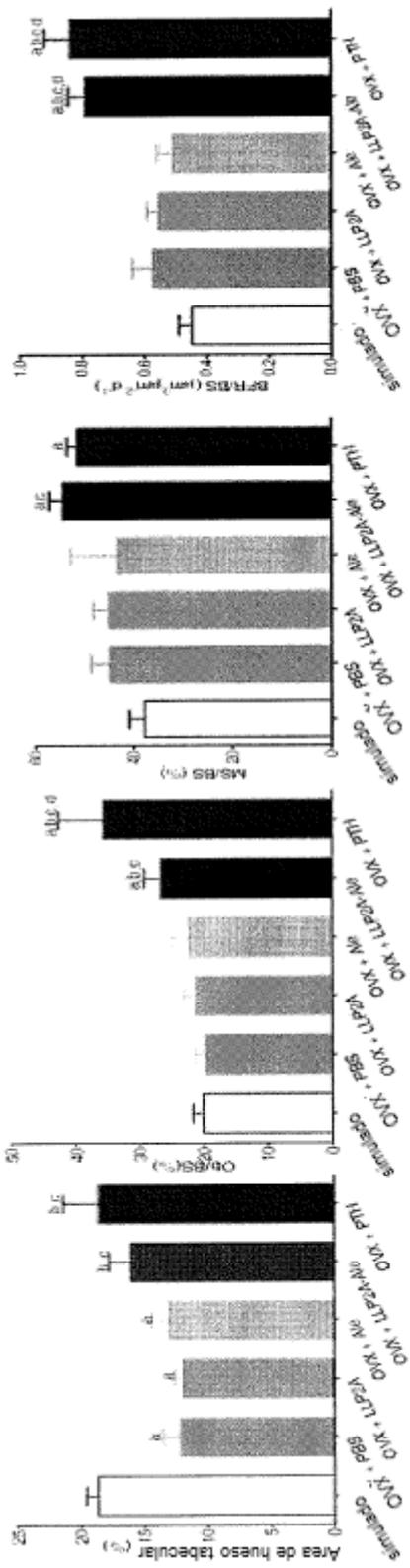
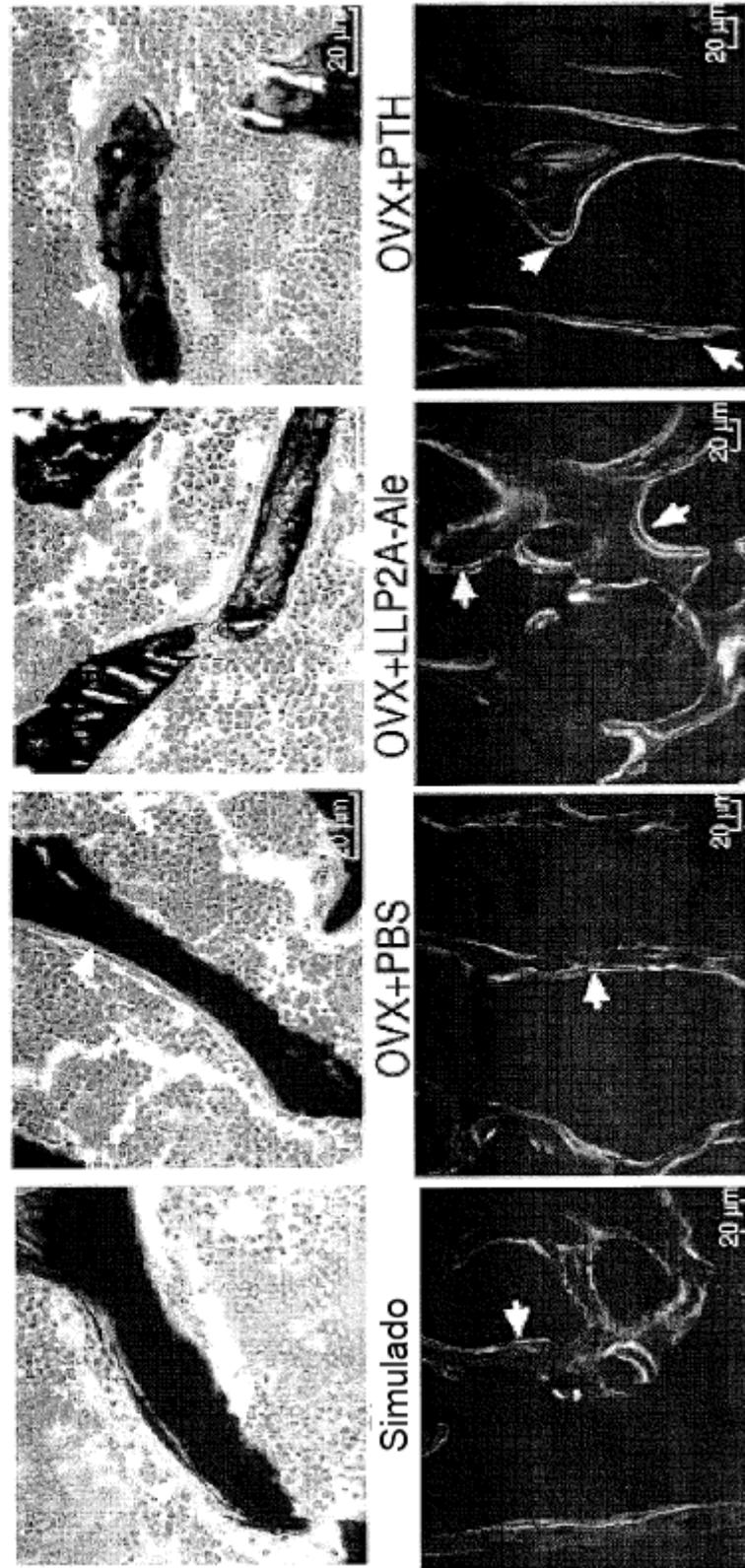


Figura 21

Figura 22



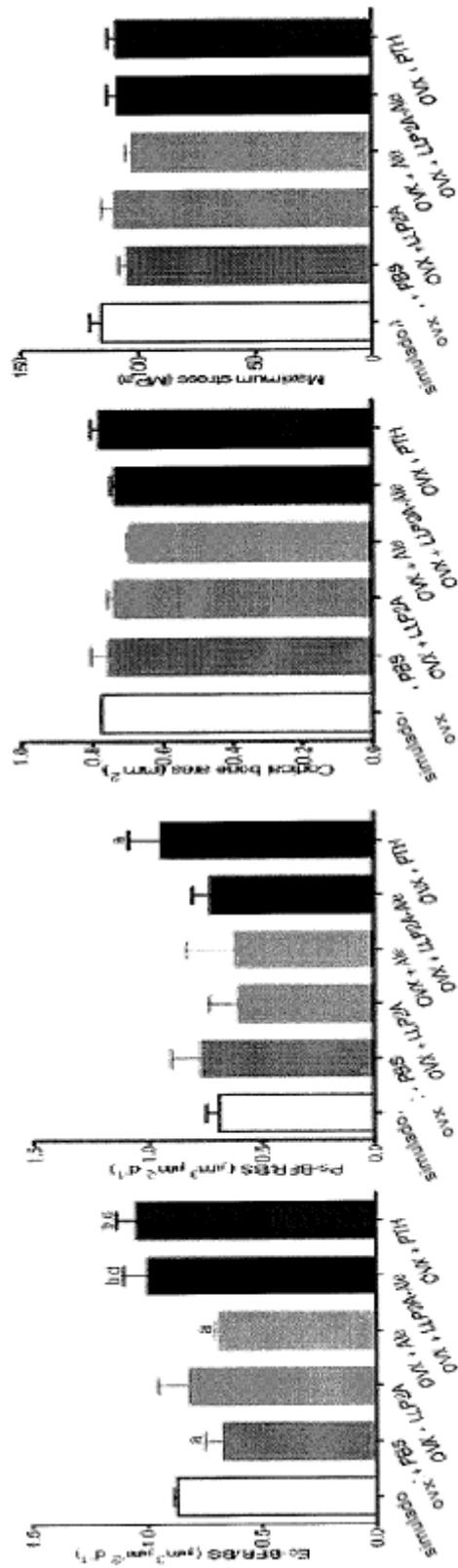


Figura 23

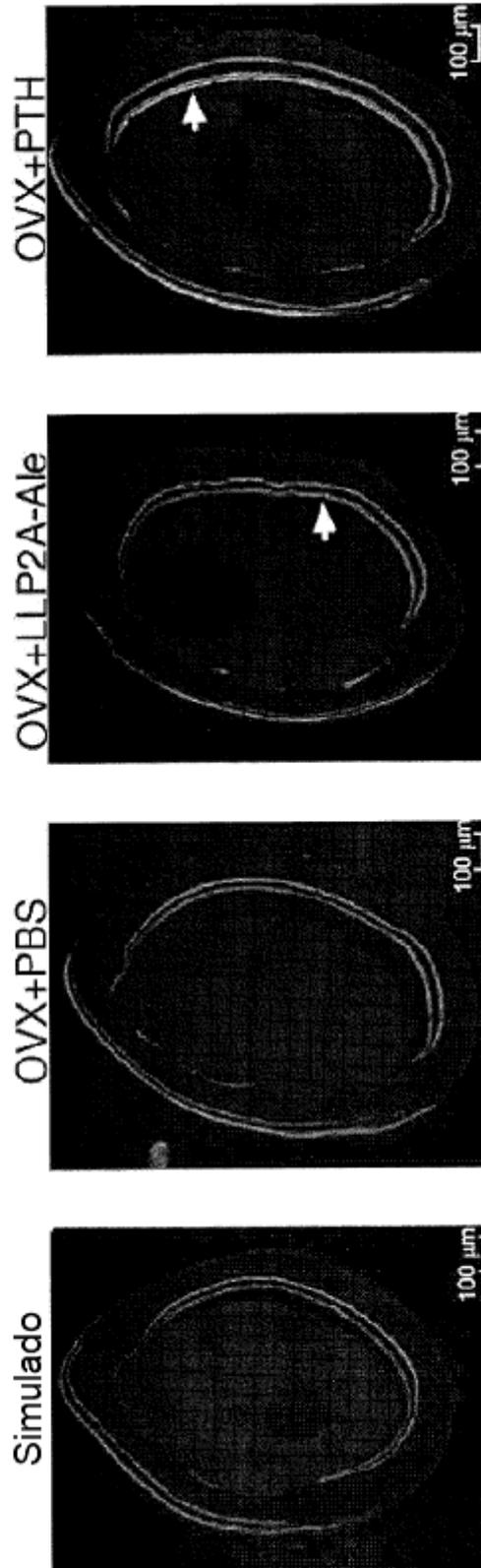


Figura 24

Figura 25

