

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 199**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61K 38/06** (2006.01)

**A61K 47/55** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008 E 15002508 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2977062**

54 Título: **Profármacos de doble acción**

30 Prioridad:

**16.02.2007 EP 07003342**

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

**14.03.2019**

73 Titular/es:

**VERGELL MEDICAL S.A. (100.0%)  
5, Rue de l'Evêché  
1204 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**KRATZ, FELIX y  
MERFORT, IRMGARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 704 199 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

Profármacos de doble acción

5 La presente invención se refiere a un profármaco que comprende al menos dos compuestos diferentes farmacéutica y/o diagnósticamente activos unidos de forma independiente por enlazadores escindibles y un resto de unión a proteínas que es capaz de unirse a una molécula portadora, en donde el primero de dichos compuestos es un agente citostático, y el segundo de dichos compuestos es un modulador de resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés).

10 La mayoría de los fármacos utilizados en la actualidad son compuestos que tienen pesos moleculares bajos y presentan, cuando se administran sistémicamente a un paciente, un aclaramiento plasmático alto o un aclaramiento corporal total. Además, dichos compuestos de bajo peso molecular muestran una alta tendencia a penetrar en los tejidos corporales por difusión, dando como resultado una biodistribución uniforme. Éstas son las dos razones principales por las que solo pequeñas cantidades del fármaco llegan al sitio de acción y, debido a la distribución sobre los tejidos sanos del cuerpo, dichos fármacos provocan efectos secundarios problemáticos. Estas desventajas son de particular interés para aquellos fármacos que tienen un alto potencial citotóxico, tales como agentes citotóxicos, agentes inmunosupresores o agentes virustáticos.

15 Se han perseguido varias estrategias para mejorar la selectividad de los fármacos de bajo peso molecular y, por lo tanto, aumentar la concentración del agente activo en el tejido deseado, mientras que la concentración de los mismos disminuye en los tejidos sanos para reducir los efectos secundarios.

20 Los portadores, como por ejemplo la albúmina, o sus conjugados con fármacos presentan una vida media considerablemente larga en la circulación sistémica de hasta 19 días (cf. Peters, T. J., "Serum Albumin", *Adv. Chem. Protein.*, 1985, 37, 161-245). Debido a una elevada permeabilidad de las paredes vasculares de p.ej. tejido maligno, infectado o inflamado en macromoléculas, el portador, como por ejemplo la albúmina de suero, entra preferentemente en el tejido diana (cf. Maeda, H., Mastumura, Y., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, 1989, 6, 193-210). En este contexto, se han presentado profármacos que se unen *in situ* a p.ej. albúmina de suero humana y muestran propiedades mejoradas en contraste con el fármaco solo (cf. DE 103 10 082 A1 y DE 10 2005 009 084 A1).

25 Además, se han investigado anticuerpos, péptidos o polímeros sintéticos como portadores de fármacos para el desarrollo de profármacos (Kratz et al., (2001): Anticancer drug conjugates with macromolecular carriers (Conjugados de fármacos anticancerígenos con portadores macromoleculares), en *Polymeric Biomaterials*, segunda edición, ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker, Nueva York, Capítulo 32, 851-894; R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2003, 347-360).

30 Sin embargo, aunque se ha demostrado que tales profármacos permiten una liberación más específica del agente activo en el tejido diana en la mayoría de los casos, se conoce una variedad de mecanismos bioquímicos que conducen a una disminución de la eficacia del fármaco respectivo.

35 Por ejemplo, la resistencia a múltiples fármacos (MDR) intrínseca o adquirida es un problema importante en el tratamiento de muchos cánceres. Se han descrito varios mecanismos bioquímicos que son responsables del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos que incluyen cambios en la diana celular del fármaco respectivo, alteraciones en la activación enzimática, mecanismos de desintoxicación o puntos de control del ciclo celular, vías apoptóticas defectuosas o insensibilidad a la apoptosis, cambios en la membrana, así como la eliminación del fármaco de la célula tumoral a través de la acción de las bombas de eflujo de fármacos. Muchos estudios han evaluado los mecanismos de resistencia celular, p. ej. en el cáncer de mama, que están mediados por las bombas de eflujo de membrana celular Glicoproteína P, Proteína de Resistencia Múltiple (MRP, por sus siglas en inglés) y Proteína de Resistencia al Cáncer de Mama (BCRP, por sus siglas en inglés) que pertenecen a la familia de transportadores dependientes de ATP (ABC, por sus siglas en inglés: ATP-binding cassette) (Ling et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997, 40: 3-8; Borst et al., *Biochim. Biofis Acta*, 1999, 1461:347-357; Thomas y Coley, *Cancer Control*, 2003, 10:159-165; Wang, J. *Clin. Pharm. Ther.*, 2003, 28:203-228; Leonessa y Clark, *Endocrine-Related Cancer*, 2003, 10 (1):43-73).

45 Otro ejemplo se refiere al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión de tumores, ya que controla varias vías de señalización en los procesos de apoptosis, ciclo celular y migración celular. La sobreexpresión de NF- $\kappa$ B que se desencadena inherentemente o en presencia de agentes citostáticos previene la apoptosis en las células tumorales y, por lo tanto, es responsable del desarrollo de la quimiorresistencia.

50 En este contexto, el documento GB 1 595 101 describe los reactivos para la determinación de materiales inmunológicamente activos y el método para el uso de los mismos. Además, el documento WO 2006/092230 A2 describe derivados peptídicos de camptotecina escindibles enzimáticamente. Además, Wang et al. (Wang, J.C. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (5); 2005, pp. 822-828) describe liposomas que comprenden doxorubicina y verapamilo.

Por lo tanto, existe la necesidad de fármacos mejorados que permitan el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad en un paciente, y que eviten o al menos reduzcan las desventajas descritas anteriormente.

55 En vista de lo anterior, el problema técnico que subyace en la presente invención es proporcionar nuevos profármacos que actuarán mediante un principio de doble efecto mediante efectos aditivos o sinérgicos, p. ej. modulando las

funciones celulares o la quimiosensibilización, mejorando así el efecto de los respectivos fármacos.

La presente invención se refiere a los siguientes elementos:

1. Un profármaco que comprende

(i) al menos un primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo,

5 (ii) al menos un segundo compuesto farmacéuticamente y/o diagnósticamente activo,

(iii) dos o más enlazadores escindibles, y

(iv) un resto de unión a proteína,

en donde el primer y el segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activos están unidos cada uno a un enlazador escindible,

10 en donde el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos son diferentes entre sí,

en donde el primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo es un agente citostático, seleccionado del grupo que consiste en N-nitrosoureas, las antraciclinas doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona y ametantrona; los agentes alquilantes clorambucil, bendamustina, melfalán y oxazafosforinas; los antimetabolitos 5-fluorouracilo, 2'-desoxi-5-fluorouridina, citarabina, cladribina, fludarabina, pentostatina, gemcitabina y tioguanina; los antagonistas del ácido fólico metotrexato, raltitrexed, pemetrexed y plevitrexed; los taxanos paclitaxel y docetaxel; las camptotecinas topotecan, irinotecan, 9-aminocamptotecina y camptotecina; los alcaloides de la *Vinca* vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; caliqueamicinas; maitansinoides; auristatinas; epotilones; bleomicina, dactinomicina, plicamicina, mitomicina C y complejos *cis*-configurados de platino (II),

20 en donde el segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo es un modulador de resistencia a múltiples fármacos (MDR), seleccionado entre un modulador MDR de primera generación, un modulador MDR de segunda generación, o un modulador MDR de tercera generación, en donde el modulador MDR de primera generación se selecciona del grupo que consiste en verapamilo, dihidrofidinas, ciclosporina A y D, tacrolismo, rapamicina, digitoxina y quinidina; el modulador MDR de segunda generación se selecciona del grupo que consiste en lovastatina, atorvastatina, análogos de reserpina, trifluoroperazina, pervilleinas A-F, valsopodar, dexverapamil, biricodar, bepridil, eritromicina, levofloxacín, losartán, morfina, rifampina, fenitoína, colchicina, rodamina 123, amprenavir, indinavir, nerfinavir, saquinavir, y ritonavir; y el modulador MDR de tercera generación se selecciona del grupo que consiste en XR9576, LY335979, OC-144-093, R101933, GF120918, ONT-093, MS-209, S-9788 y reversin 205 y 121, y en donde el resto de unión a proteína se selecciona del grupo que consiste en un grupo maleinimida, un grupo halogenacetamida, un grupo halogenacetato, un grupo pirilditio, un grupo aziridina, un grupo disulfuro, un grupo acetileno sustituido o no sustituido, o un grupo éster N-hidroxisuccinida.

30 2. El profármaco de acuerdo con el punto 1, en donde los dos o más enlazadores escindibles se pueden escindir independientemente hidrolítica y/o enzimáticamente y/o de manera dependiente del pH.

3. El profármaco de acuerdo con el punto 1, en donde el citostático es doxorubicina o un derivado de camptotecina, el modulador de MDR es un modulador de glicoproteína P y el resto de unión a proteína es un derivado de maleimida.

35 4. Una composición farmacéutica que comprende el profármaco de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente.

De acuerdo con la presente invención, no hay restricción específica en cuanto a cómo los componentes, es decir, los compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos, los enlazadores escindibles y el resto de unión a proteína, del profármaco definido anteriormente se conectan entre sí, siempre y cuando cada uno de los compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos se una a un enlazador escindible y la función biológica del resto de unión a proteína y los agentes farmacéutica y/o diagnósticamente activos no se vean afectados negativamente por la estructura establecida. La estructura molecular del profármaco de la presente invención puede tener, por ejemplo, una forma lineal o una forma ramificada o está presente en una forma circular.

45 De acuerdo con la presente invención, no hay restricción específica con respecto a la configuración estructural del profármaco de la presente invención; es decir, la forma en que los constituyentes mencionados en los puntos anteriores (i) a (iv) del profármaco definido anteriormente se unen químicamente entre sí. En particular, el profármaco de acuerdo con la presente invención puede contener uno o más espaciadores en cualquier posición entre los constituyentes del profármaco definido anteriormente, es decir, el resto de unión a proteína puede, por ejemplo, unirse al resto del profármaco a través de un espaciador o, como otro ejemplo, el primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo puede unirse a al menos un enlazador escindible a través de un espaciador. Además, la función de, por ejemplo, el enlazador escindible puede incorporarse en dicho espaciador, es decir, se puede usar un espaciador entre el compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo que también puede servir de enlazador escindible. También es posible unir el compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo, el enlazador escindible y/o el resto de unión a

proteína a un grupo central, que puede ser lineal o ramificado, como un péptido, un azúcar, un grupo heterocíclico, o cualquier compuesto inorgánico u orgánico adecuado para unir uno o más de los constituyentes del profármaco.

El término "profármaco" como se usa en el presente documento significa cualquier forma de un fármaco que se administra a un organismo, como un ser humano, en una forma inactiva o menos activa y se convierte, por ejemplo, por metabolización, en la forma activa. Dicha conversión del profármaco en la forma activa no está específicamente restringida e incluye cualquier alteración química y/o física del profármaco que se produce después de la administración, como por ejemplo la liberación de una parte activa del profármaco en el sitio de acción.

La expresión "compuesto farmacéuticamente activo" significa cualquier compuesto que produce un efecto farmacológico bien por sí mismo o bien después de su conversión en el organismo en cuestión, y por lo tanto también incluye los derivados de estas conversiones. El efecto farmacológico del compuesto farmacéuticamente activo descrito en el presente documento puede ser solamente un efecto individual, p. ej. un efecto citostático, o un amplio espectro farmacológico de acción, como un efecto inmunosupresor y antiflogístico al mismo tiempo.

La expresión "compuesto diagnósticamente activo" utilizada en el presente documento no está específicamente restringida e incluye cualquier compuesto que puede detectarse y cuantificarse preferiblemente, en un organismo o en partes de él, como por ejemplo células y/o fluidos, como por ejemplo el suero, a través de métodos adecuados de medición química y/o física.

La expresión "enlazador escindible" significa cualquier enlazador que puede ser escindido física o químicamente. Los ejemplos de escisión física pueden ser escisión por luz, emisión radiactiva o calor, mientras que los ejemplos de escisión química incluyen la escisión por reacciones redox, hidrólisis, escisión dependiente del pH o escisión por enzimas.

Según una realización preferida de la presente invención, el enlazador escindible comprende uno o más enlaces escindibles hidrolíticamente, cuya hidrólisis libera los compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos. Los ejemplos de enlaces escindibles hidrolíticamente son enlaces éster o enlaces de complejos metálicos, tales como los que están presentes en los complejos de platino-dicarboxilato, donde se libera un complejo de diaminodiquoplatino (II).

En otra realización preferida de la presente invención, el enlazador escindible puede ser escindible por una enzima. Por ejemplo, el enlazador escindible de la presente invención puede contener al menos un enlace peptídico que preferiblemente se encuentra dentro de una secuencia peptídica escindible de una proteasa. Por lo tanto, se puede implementar un enlace peptídico mediante la inserción de una secuencia peptídica respectiva en el enlazador escindible. Las enzimas adecuadas son, por ejemplo, proteasas y peptidasas, p. ej. metaloproteasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), proteasas cisteína, proteasas serina y activadores de plasmina, que se forman o activan de manera intensiva en enfermedades como la artritis reumatoide o el cáncer, lo que lleva a una degradación tisular excesiva, inflamaciones y metástasis. Los ejemplos preferidos de proteasas de acuerdo con la presente invención son en particular MMP-2, MMP-3 y MMP-9, catepsina B, H, L y D, plasmina, uroquinasa y antígeno específico de próstata (PSA, por sus siglas en inglés). Las secuencias peptídicas preferidas que se incorporan en el profármaco son: Arg, Arg-Arg, Phe-Arg, Phe-Cit, Ile-Pro Lys, Lys-Lys, Arg-Lys, Ala-Leu-Ala-Leu, Phe-Lys, Phe-Lys-Ala, Val-Cit, Val-Arg, Ala-Phe-Lys, D-Ala-Phe-Lys, Met, Met-Met, Phe-Met, Tyr-Met, Ala-Met, Ala-Phe-Met, Phe-Ala-Met, Ala-Tyr-Met, Phe-Tyr-Met, Ser-Ser-Tyr-Tyr-Ser-Arg, Phe-Pro-Lys-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln, Lys-Pro-Ile-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu, Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln, Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln, Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln, Gly-Phe-Leu-Gly. Además, el enlazador escindible enzimáticamente puede contener un enlazador autoinmolutivo tal como un enlazador autoinmolutivo de p-aminobenciloxicarbonilo (PABC) o un enlazador N-metil- o N, N-dimetiletileno simétrico.

En otra realización de la presente invención, el enlazador escindible de acuerdo con la presente invención contiene preferiblemente al menos un enlace lábil en medio ácido. Ejemplos de enlaces lábiles en medio ácido son los enlaces éster, acetal, cetal, imina, hidrazona, carboxilhidrazona y sulfonilhidrazona y los enlaces que contienen un grupo tritilo.

En caso de que el compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo sea un agente de diagnóstico activo que no necesite ser escindido, el enlazador escindible puede elegirse para que comprenda solo aquellos enlaces que son difíciles de escindir bajo condiciones fisiológicas tales como un enlace amida, enlaces carbono-carbono o enlaces entre carbono y un heteroátomo, en donde el heteroátomo se puede seleccionar entre O, N, S o P.

El término "resto de unión a proteína" utilizado en el presente documento no está específicamente restringido y significa cualquier grupo funcional que sea capaz de unirse a un grupo amino, hidroxilo o tiol de un compuesto que puede ser de origen endógeno o exógeno. El resto de unión a proteína según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en un grupo de maleinimida, un grupo halogenoacetamida, un grupo halogenoacetato, un grupo piridilto, un grupo aziridina, un grupo disulfuro, un grupo acetileno sustituido o no sustituido, y un grupo éster de N-hidroxisuccinimida. El grupo de unión a proteína también incluye grupos funcionales, tales como -COOH o SO<sub>3</sub>H, que puede ser activado por agentes de acoplamiento estándar, p. ej. dicitlocarbodiimidas, cloruros de ácido o reactivos de acoplamiento de péptidos (p. ej., BOP, HATU, PyBOP).

Uno o varios profármacos pueden unirse a cualquier portador adecuado, como péptidos, azúcares, proteínas de suero, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, factores de crecimiento, polisacáridos o polímeros sintéticos. En general el

- portador contiene grupos funcionales adecuados tales como grupos hidroxilo, amino o tiol para unir el profármaco de unión a proteína. Si es necesario, estos pueden introducirse en la molécula portadora mediante modificación química mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica (Kratz et al., (2001): Anticancer drug conjugates with macromolecular carriers (Conjugados de fármacos anticancerígenos portadores macromoleculares), en Polymeric Biomaterials, segunda edición, ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker, Nueva York, Capítulo 32, 851-894).
- 5 En una realización preferida, el resto de unión a proteína del profármaco de acuerdo con la presente invención permite que dicho profármaco se una *in situ* después de la administración por p. ej. inyección, a componentes de fluidos corporales y/o componentes de tejido, preferiblemente a proteínas de suero y más preferiblemente a albúmina de suero, particularmente a cisteína-34 de albúmina de suero y luego están presentes como profármacos macromoleculares que portan los compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos al sitio diana.
- 10 En una realización preferida adicional, el resto de unión a proteína del profármaco definido anteriormente se une *in situ* a la cisteína-34 de albúmina.
- Según la presente invención, el término "*in situ*" incluye la unión del profármaco según la presente invención a una biomolécula endógena, tal como una proteína de suero, particularmente albúmina de suero, dentro del organismo al que se ha administrado el profármaco.
- 15 De acuerdo con la presente invención, en el profármaco como se define anteriormente, el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un agente citostático y un modulador MDR.
- Los agentes citostáticos de acuerdo con la presente invención son las N-nitrosoureas tales como la nimustina, las antraciclinas doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona y ametantrona; los agentes alquilantes clorambucil, bendamustina, melfalán y oxazafosforinas; los antimetabolitos 5-fluorouracilo, 2'-desoxi-5-fluorouridina, citarabina, cladribina, fludarabina, pentostatina, gemcitabina y tioguanina; los antagonistas del ácido fólico metotrexato, raltitrexed, pemetrexed o plevitrexed; los taxanos paclitaxel y docetaxel; las camptotecinas topotecan, irinotecan, 9-aminocamptotecina y camptotecina; los alcaloides de *Vinca* vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; caliqueamicinas; maitansinoides; auristatinas, epotilonas, bleomicina, dactinomicina, plicamicina, mitomicina C y complejos cis-configurados de platino (II).
- 20 Los moduladores MDR de acuerdo con la presente invención son moduladores MDR de primera generación, seleccionados del grupo que consiste en verapamilo, dihidropiridinas, ciclosporina A y D, tacrolímo, rapamicina, digoxina, digitoxina y quinidina, los moduladores MDR de segunda generación, seleccionados del grupo que consiste en lovastatin, atorvastatin, análogos de reserpina, trifluoroperazina, pervilleines, A-F, valsopodar, dexverapamil, biricodil, bepridil, eritromicina, levofloxacín, losartán, morfina, rifampina, fenitoína, colchicina, rodamina 123, amprenavir, indinavir, nerflinavir, saquinavir, y ritonavir; y los moduladores MDR de tercera generación seleccionados del grupo que consiste en XR9576, LY335979, OC-144-093, R101933, GF120918, ONT-093, MS-209, S-9788 y reversin 205 y 121.
- 25 Para preparar los profármacos de unión a proteína de la presente invención, el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos se unen a un enlazador de unión a proteínas, bifuncional, a través de un enlace sensible en medio ácido y/o hidrolítica y/o enzimáticamente escindible. Esta modificación se lleva a cabo con un grupo funcional adecuado del primer y segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos que es un grupo HO-, NH<sub>2</sub>-, HOOC-, HO<sub>3</sub>S-, o carbonilo. Si el primer y segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos no contienen un grupo funcional adecuado, entonces este se introduce mediante modificación química; es decir, el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos mencionados más arriba incluyen además todos los derivados que poseen un grupo HO-, NH<sub>2</sub>-, HOOC-, HO<sub>3</sub>S-, y/o carbonilo.
- 30 En los profármacos de la presente invención, los dos o más enlazadores escindibles del profármaco definido más arriba pueden separarse de forma independiente hidrolítica y/o enzimáticamente y/o de manera dependiente del pH. De acuerdo con la presente invención, cada uno de los enlazadores escindibles en el profármaco definido anteriormente puede ser el mismo o diferente. El enlazador escindible del primero y del segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo puede ser, por ejemplo, sensible en medio ácido o escindible enzimáticamente, o según otro ejemplo, el enlazador escindible del primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo puede ser un enlazador lábil en medio ácido, mientras que el enlazador escindible del segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo puede ser un enlazador escindible por una enzima.
- 35 En un ejemplo específico del profármaco definido anteriormente, el citostático es doxorubicina, paclitaxel o un derivado de camptotecina, el modulador MDR es un modulador de tipo p-glicoproteína y el resto de unión a proteína es un derivado de maleimida.
- Según una realización preferida del profármaco como se define anteriormente, el citostático es camptotecina o un derivado de la misma, el modulador MDR es OC144093 y el resto de unión a proteína es un derivado de maleimida.
- 40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende el profármaco definido anteriormente, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 45
- 50
- 55

5 La composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, disolventes y diluyentes tales como una disolución de cloruro de sodio o una disolución que contenga cualquier tampón farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para la administración a un paciente, por ejemplo en una forma inyectable, como un comprimido o cápsula, o como una composición para inhalación.

De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica definida anteriormente es para el tratamiento del cáncer.

10 De acuerdo con otra realización descrita en el presente documento, el profármaco definido anteriormente puede estar comprendido en un kit, que puede contener además uno o más adyuvantes, tales como un tampón o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las figuras muestran:

Figura 1 muestra la estructura de un profármaco de doble acción que comprende el inhibidor de la glicoproteína P OC144093 y la camptotecina.

15 Figura 2 muestra la estructura de un profármaco de doble acción que comprende un derivado amino del inhibidor de la proteasa MG-132 (aminobenzoilamida-Leu-Leu-Leu-CHO) y el agente anticancerígeno paclitaxel:

Figura 3 muestra la estructura de un profármaco de doble acción que comprende los dos agentes anticancerígenos paclitaxel y doxorubicina (12)

Figuras 4a y 4b muestran la ruta sintética para obtener un profármaco de doble acción que comprende los dos agentes anticancerígenos paclitaxel y doxorubicina (12)

20 El profármaco de acuerdo con la presente invención es ventajosamente capaz de unirse *in situ* a un portador macromolecular que contiene tiol, como la albúmina endógena, lo que permite un transporte más específico al tejido diana en un paciente. Además, la presencia de al menos dos compuestos farmacéuticamente activos diferentes permite mejorar el tratamiento de una enfermedad en un paciente. En particular, al combinar dos compuestos diferentes farmacológicamente activos en un profármaco capaz de unirse *in situ* a una macromolécula que contiene tiol, como la albúmina, se logra sorprendentemente acumular eficientemente ambos fármacos en el tejido diana del paciente y, después de la escisión de los agentes activos, reducir ventajosamente al menos uno de los mecanismos bioquímicos conocidos para reducir la eficacia de uno o más de los agentes activos empleados.

La presente invención se ilustra en el siguiente ejemplo sin ninguna limitación a ello.

### Ejemplos

30 Ejemplo 1:

De acuerdo con la presente invención, se prepara un profármaco de doble acción que comprende el inhibidor de la glucoproteína P OC144093 y la camptotecina.

35 En este ejemplo, la camptotecina y OC144093 se unen a un derivado de maleimida bifuncional a través de un espaciador peptídico que se escinde por catepsina B u otras proteasas. Después del transporte a la célula tumoral, los profármacos ejercen su acción a través de un principio de doble acción: OC144093 inhibe la bomba de eflujo glicoproteína P que es responsable de la resistencia a múltiples fármacos, previniendo así el eflujo de camptotecina y permitiendo que este fármaco ejerza su eficacia antitumoral en la célula tumoral.

Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia):

40 Un profármaco de doble acción comprende un derivado amino del inhibidor de la proteasa MG-132 (aminobenzoilamida-Leu-Leu-Leu-CHO) y el agente anticancerígeno paclitaxel.

En este ejemplo, paclitaxel y el inhibidor de la proteasa aminobenzoilamida-Leu-Leu-Leu-CHO se unen a un derivado de maleimida bifuncional a través de un espaciador peptídico que se escinde por la catepsina B u otras proteasas.

Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia):

45 Se prepara un profármaco de doble acción **12** con los dos agentes anticancerígenos paclitaxel y doxorubicina (ver Fig. 3). Los compuestos farmacéuticamente activos, es decir, doxorubicina y paclitaxel, se liberan del profármaco por escisión de un enlazador de hidrazona lábil en medio ácido y un enlazador dipeptídico escindible de catepsina B. El profármaco de acuerdo con la presente invención es ventajosamente capaz de unirse *in situ* a un portador macromolecular que contiene tiol, como la albúmina, lo que permite un transporte más específico al tejido tumoral y liberar doxorubicina y paclitaxel en el tejido tumoral y las células tumorales.

50 En un ensayo de citotoxicidad 72 contra células de carcinoma de colon HT29, el profármaco **12** mostró un valor IC<sub>50</sub>

en la región baja nanomolar ( $IC_{50} \sim 11$  nM).

El profármaco **12** se sintetizó de acuerdo con las Figuras 4a y 4b como se describe a continuación.

Síntesis de EMC-Glu (NHNH-Mtt) -OH (**5**): Se agregaron DMAP (0,1 equiv, 14,8 mmol, 1,81 g) y DIPC (1,5 equiv, 222,3 mmol, 34,5 ml) bajo atmósfera de nitrógeno lentamente a 0 °C a una disolución de Cbz-Glu-OtBu (148,2 mmol, 50 g) y carbazato de terc-butilo (1,5 equiv., 222,3 mmol, 29,4 g) en DCM seco (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El sólido se separó por filtración con succión y se lavó con DCM. La capa orgánica se extrajo con HCl 0,1 M (10 x 100 ml). La fase orgánica se extrajo luego con salmuera, agua, se secó y el disolvente se separó a presión reducida para dar **1** como un sólido blanco (66,6 g).  $C_{22}H_{33}N_3O_7$ , Masa exacta: 451,23, MS (ESI): m/e 474,0 (M + Na)<sup>+</sup>. **1** (60 g) se disolvió bajo nitrógeno en metanol seco (200 ml). Se añadió Pd/C (10%, 2,5 g) y se aplicó un globo de hidrógeno al matraz. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días, durante los cuales los globos se intercambiaron por otros nuevos. La disolución se diluyó luego con metanol, se filtró sobre celite y el disolvente se separó a presión reducida. El residuo oleoso se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice con  $CHCl_3/MeOH$  20:1 para dar **2** como un sólido blanco (42 g, 50%).  $C_{14}H_{27}N_3O_5$ , Masa exacta: 317,2, MS (ESI): m/e 318,0 (M + H)<sup>+</sup>, m/e 340,0 (M + Na)<sup>+</sup>. El cloruro de ácido 6-maleimidocaproico se preparó a partir de ácido maleimidocaproico (82,78 mmol, 17,35 g) y cloruro de ácido oxálico (1,0 equiv, 82,78 mmol, 9,93 ml) en DCM seco (180 ml). Se añadió trietilamina seca (82,78 mmol, 11,47 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno a una disolución de **2** (82,78 mmol, 26,36 g) en DCM seco (300 ml) seguido por la adición lenta de la disolución de cloruro de ácido 6-maleimidocaproico. La disolución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El disolvente se separó a presión reducida. El residuo oleoso se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice eluyendo con EE/hexano (i) 1:1, (i) 2:1, (i) 4:1 para dar **3** como un sólido blanco (36 g, 76%).  $C_{24}H_{38}N_4O_8$ , Masa exacta: 510,27, (ESI): m/e 533,1 (M + H)<sup>+</sup>. Una disolución de **3** (32,4 g) y TFA (165 ml) en  $CH_2Cl_2$  (165 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 80 min. El producto precipitó con dietil éter (4 l) como una sal de TFA. Luego **4** se recogió por filtración con succión, se lavó con éter y se secó (20 g, 68%).  $C_{15}H_{22}N_4O_6$ , Masa exacta: 354,15, (ESI): m/e 355,1 (M + H)<sup>+</sup>. Una suspensión agitada de **4** (11 mmol, 5 g) en DCM seco (50 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente se trató con cloruro de trimetilsililo (2,1 equiv., 23,1 mmol, 3 ml) y DIEA (1,05 equiv., 11,55 mmol, 1,9 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, y luego se enfrió a 0°C. Se añadió DIEA (3,1 equiv, 63,8 mmol, 5,8 ml), seguido de cloruro de 4-metiltrilito (1,05 equiv, 11,55 mmol, 3,41 g). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió metanol (50 ml) y la disolución se agitó durante 5 min. El disolvente se evaporó a 30°C y el residuo se repartió entre DCM y un tampón de pH 5 (acetato). La fase orgánica se lavó con un tampón de pH 5, agua y salmuera, se secó y se evaporó el disolvente. El residuo oleoso se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice eluyendo con  $CHCl_3/CH_3OH$  (10:1) para dar **5** como espuma de color amarillo pálido (4,5 g, 83%).  $C_{35}H_{38}N_4O_6$ , Masa exacta: 610,28, (ESI): m/e 633,1 (M + Na)<sup>+</sup>.  $^{13}C$  RMN (100,61 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 21 (-,  $CH_3$ ), 25, 26, 28, 37, 39, 41, 44 (-, 7  $\times CH_2$ ), 55 (+, CONHCH), 72 (+,  $Ar_3C$ ), 135 (+, CHCH), 127, 128, 129, 130 (-, Ar), 138, 141, 144 (-, Ar), 170, 171, 174 (-, HOCO, 4  $\times$  NCO). Una disolución agitada de **5** (6,22 mmol, 3,8 g) y HOSu (1,05 equiv., 6,60 mmol, 755 mg) en THF seco (25 ml) a 0 °C se trataron con DCC (1,05 equiv., 6,60 mmol, 1,36 g). Después de 20 min, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. El subproducto sólido se separó por filtración, se lavó con THF seco y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en diol, eluyendo con THF/hexano (1:1) para proporcionar **6** como un sólido blanco (2,70 g, 62%).  $C_{39}H_{41}N_5O_8$ , Masa exacta: 707,30, (ESI): m/e 730,2 (M + Na)<sup>+</sup>.

Síntesis de EMC-Glu (NH-NHMtt)-Phe-Lys(MMT)-PABC-PNP (**9**): Una disolución agitada de **7** (1,11 mmol, 0,73 g) y **6** (1,2 equiv, 1,33 mmol, 0,95 g) en THF seco (20 ml) se trató a temperatura ambiente con  $Et_3N$  seco (1,0 equiv, 1,11 mmol, 155  $\mu$ L). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 h y luego se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con  $CHCl_3/CH_3OH$  (15:1) + 2%  $Et_3N$  para dar **8** como un sólido blanco (0,93 g, 75%).  $C_{77}H_{82}N_8O_8$ , Masa exacta: 1246,63, (ESI): m/e 1247,4 (M + H)<sup>+</sup>. Se disolvieron **8** (0,2 mmol, 255 mg) y carbonato de bis-PNP (5 equivalentes, 1 mmol, 348 mg) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente en DCM seco (15 ml) y se trataron con DIEA (3 equivalentes, 0,6 mmol, 102  $\mu$ l). La mezcla de reacción se agitó durante 3 días. El disolvente se eliminó y el residuo se purificó por cromatografía instantánea en diol eluyendo con THF/hexano (3:2) para dar **9** como un sólido amarillo pálido (150 mg, 52%).  $C_{84}H_{85}N_9O_{12}$ , Masa exacta: 1411,63, (ESI): m/e 1412,2 (M + H)<sup>+</sup>.

Síntesis de **12**: Se añadió DMAP (417 mg) a una disolución de **9** (550 mg) y paclitaxel (332 mg) en DCM seco (20 ml). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El producto precipitó en éter y luego se purificó por cromatografía instantánea sobre sílice eluyendo con  $CHCl_3/MeOH$  20:1 para dar **10** como un sólido (200 mg, 67%). Una disolución de **10** (180 mg) en 1% de TFA en DCM (2 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El producto **11** precipitó en éter como un sólido blanco (100 mg, 66%).  $C_{35}H_{99}N_9O_{23}$ , Masa exacta: 1613,69, (ESI): m/e 1636,3 (M + Na)<sup>+</sup> se disolvieron **11** (5 equiv, 20 mg) y doxorubicina HCl (1 equiv, 1,2 mg) en metanol seco (1 ml) y la disolución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El producto precipitó en isopropanol/éter y luego se purificó por HPLC (25 cm Synergi 4 u Max-RP 80 A (Phenomenex), caudal: 1 ml/min, fase móvil A: pH 7/AcN 80:20, fase móvil B: pH7/AcN 40:60, tiempo de retención: 29,63 min) para producir 3 mg **12**.  $C_{114}H_{127}ClF_3N_{10}O_{35}$ , Masa exacta: 2138,85, (ESI): m/e 2140,0 (M + H)<sup>+</sup>.

60

## REIVINDICACIONES

1. Un profármaco que comprende

- (i) al menos un primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo,
- (ii) al menos un segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo,
- 5 (iii) dos o más enlazadores escindibles, y
- (iv) un resto de unión a proteína,

en donde el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos están unidos cada uno a un enlazador escindible,

en donde el primer y el segundo compuestos farmacéutica y/o diagnósticamente activos son diferentes entre sí,

- 10 en donde el primer compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo es un agente citostático, seleccionado del grupo que consiste en N-nitrosoureas, las antraciclinas doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona y ametantrona; los agentes alquilantes clorambucil, bendamustina, melfalán y oxazafosforinas; los antimetabolitos 5-fluorouracilo, 2'-desoxi-5-fluorouridina, citarabina, cladribina, fludarabina, pentostatina, gemcitabina y tioguanina; los antagonistas del ácido fólico metotrexato, raltitrexed, pemetrexed y plevitrexed; los taxanos paclitaxel y docetaxel; las camptotecinas topotecan, irinotecan, 9-aminocamptotecina y camptotecina; los alcaloides de la *Vinca* vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; caliqueamicinas; maitansinoides; auristatinas; epotilonas; bleomicina, dactinomicina, plicamicina, mitomicina C y complejos *cis*-configurados de platino (II),

- 15 en donde el segundo compuesto farmacéutica y/o diagnósticamente activo es un modulador de resistencia a múltiples fármacos (MDR), seleccionado entre un modulador MDR de primera generación, un modulador MDR de segunda generación, o un modulador MDR de tercera generación, en donde el modulador MDR de primera generación se selecciona del grupo que consiste en verapamilo, dihidrofidinas, ciclosporina A y D, tacrolismo, rapamicina, digitoxina y quinidina; el modulador MDR de segunda generación se selecciona del grupo que consiste en lovastatina, atorvastina, análogos de reserpina, trifluoroperazina, pervilleinas A-F, valspodar, dexverapamil, biricodar, bepridil, eritromicina, levofloxacín, losartán, morfina, rifampina, fenitoína, colchicina, rodamina 123, amprenavir, indinavir, nerlfinavir, saquinavir, y ritonavir; y el modulador MDR de tercera generación se selecciona del grupo que consiste en XR9576, LY335979, OC-144-093, R101933, GF120918, ONT-093, MS-209, S-9788 y reversin 205 y 121, y en donde el resto de unión a proteína se selecciona del grupo que consiste en un grupo maleinimida, un grupo halogenacetamida, un grupo halogenacetato, un grupo pirilditio, un grupo aziridina, un grupo disulfuro, un grupo acetileno sustituido o no sustituido, o un éster N-hidroxisuccinida grupo.

- 20 **2.** El profármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los dos o más enlazadores escindibles se pueden escindir de forma independiente hidrolítica y/o enzimáticamente y/o de manera dependiente del pH.

**3.** El profármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el citostático es doxorubicina o un derivado de camptotecina, el modulador MDR es un modulador de glicoproteína P y el resto de unión a proteína es un derivado de maleimida.

- 25 **4.** Una composición farmacéutica que comprende el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente.



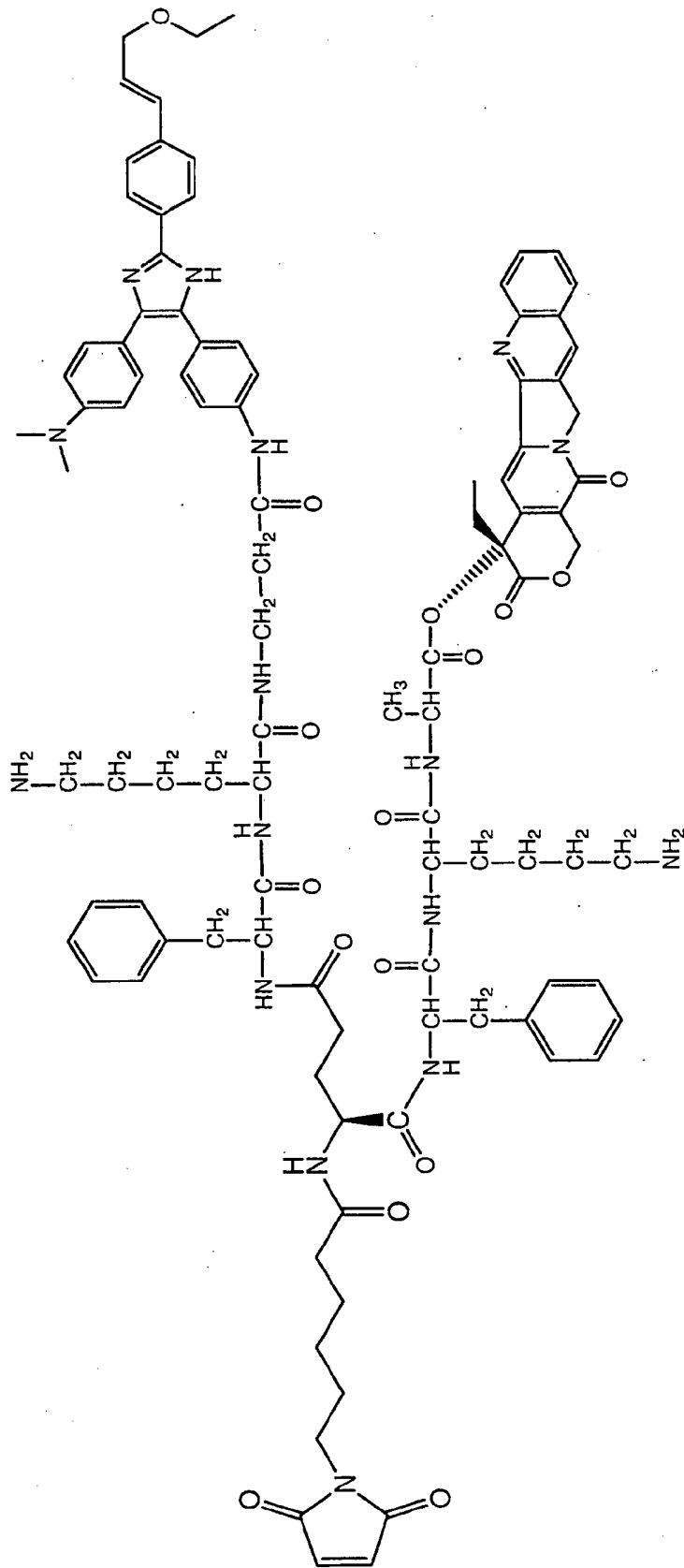


Fig. 1

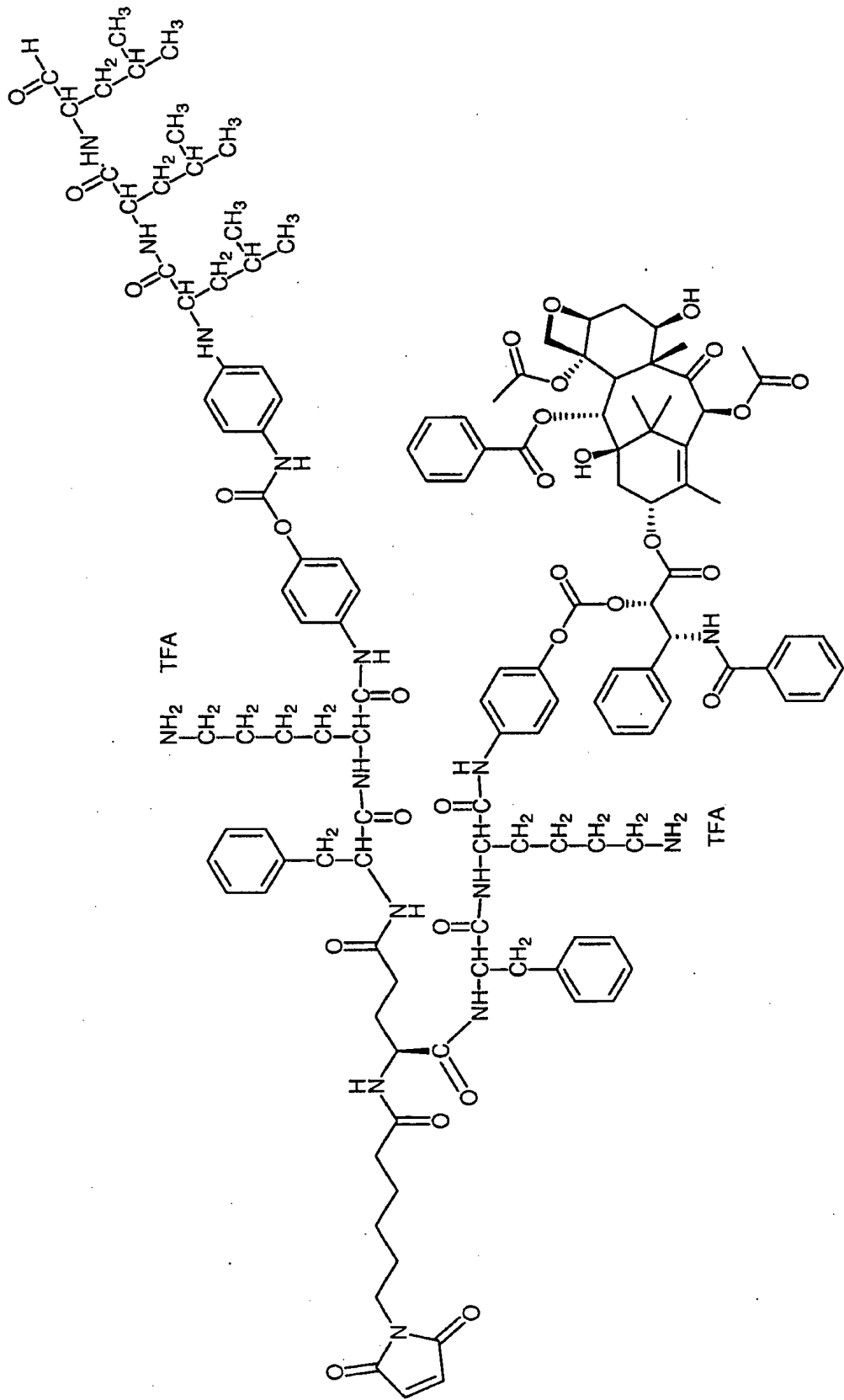


Fig. 2

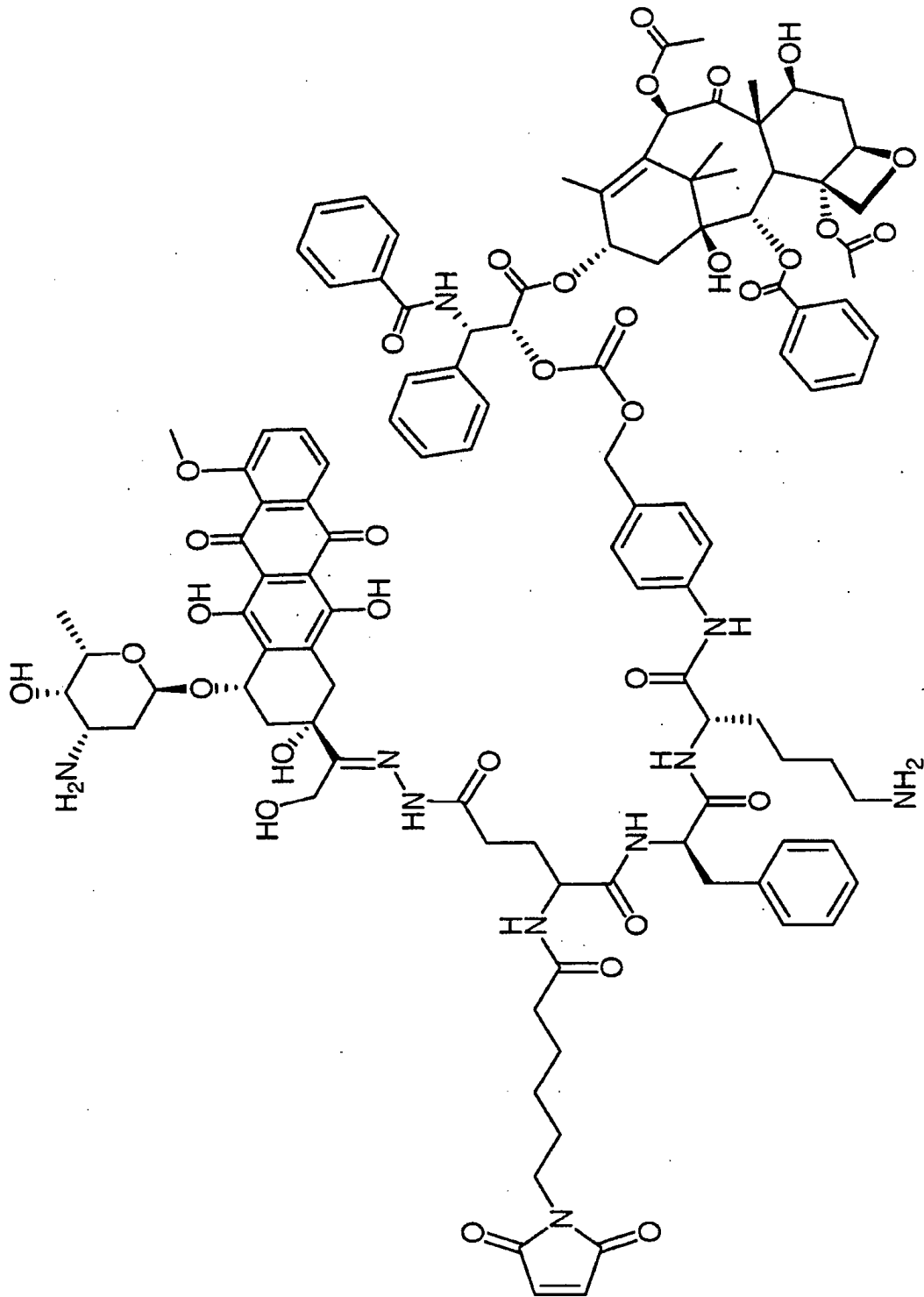


Fig. 3

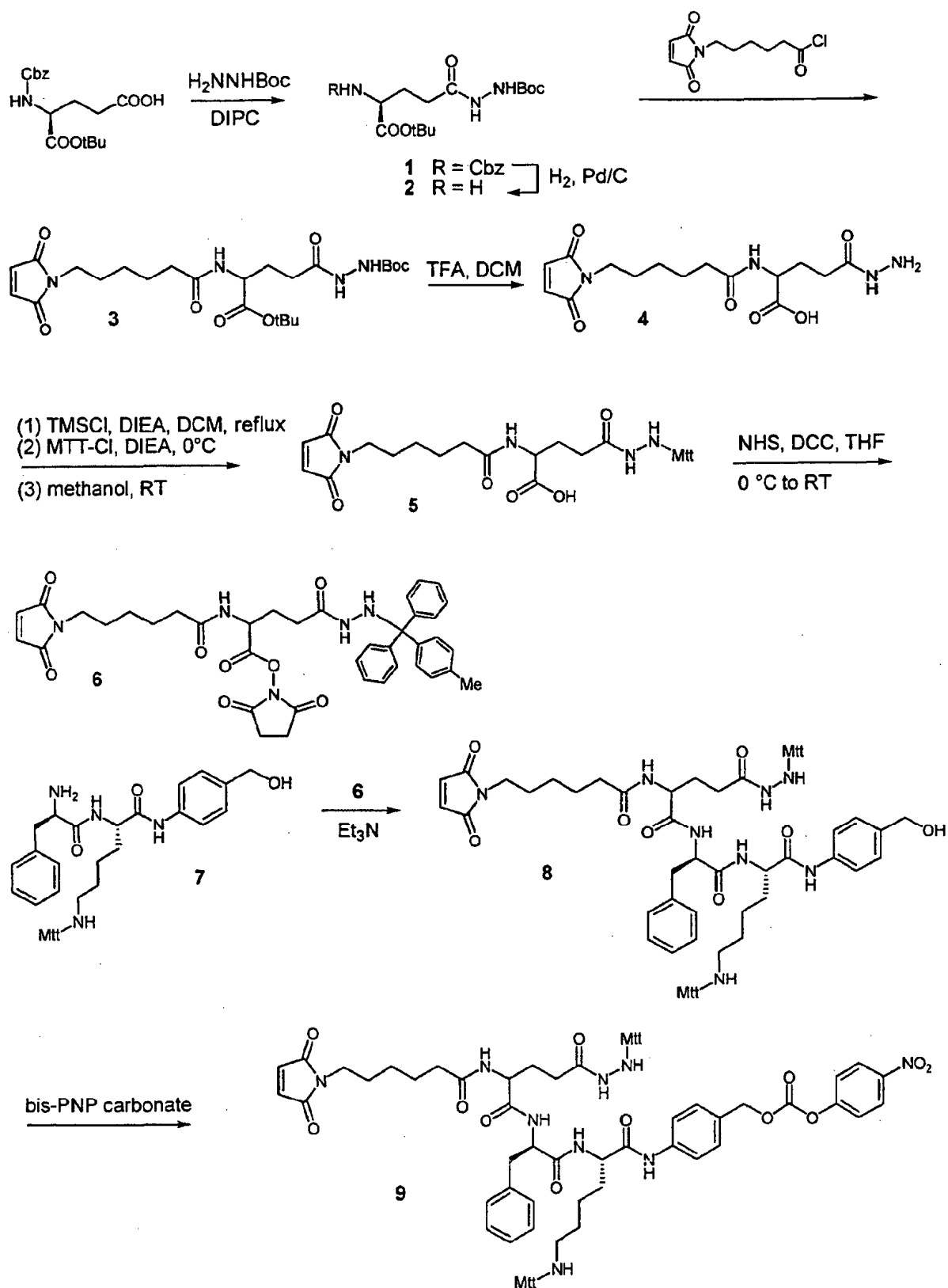


Fig. 4a

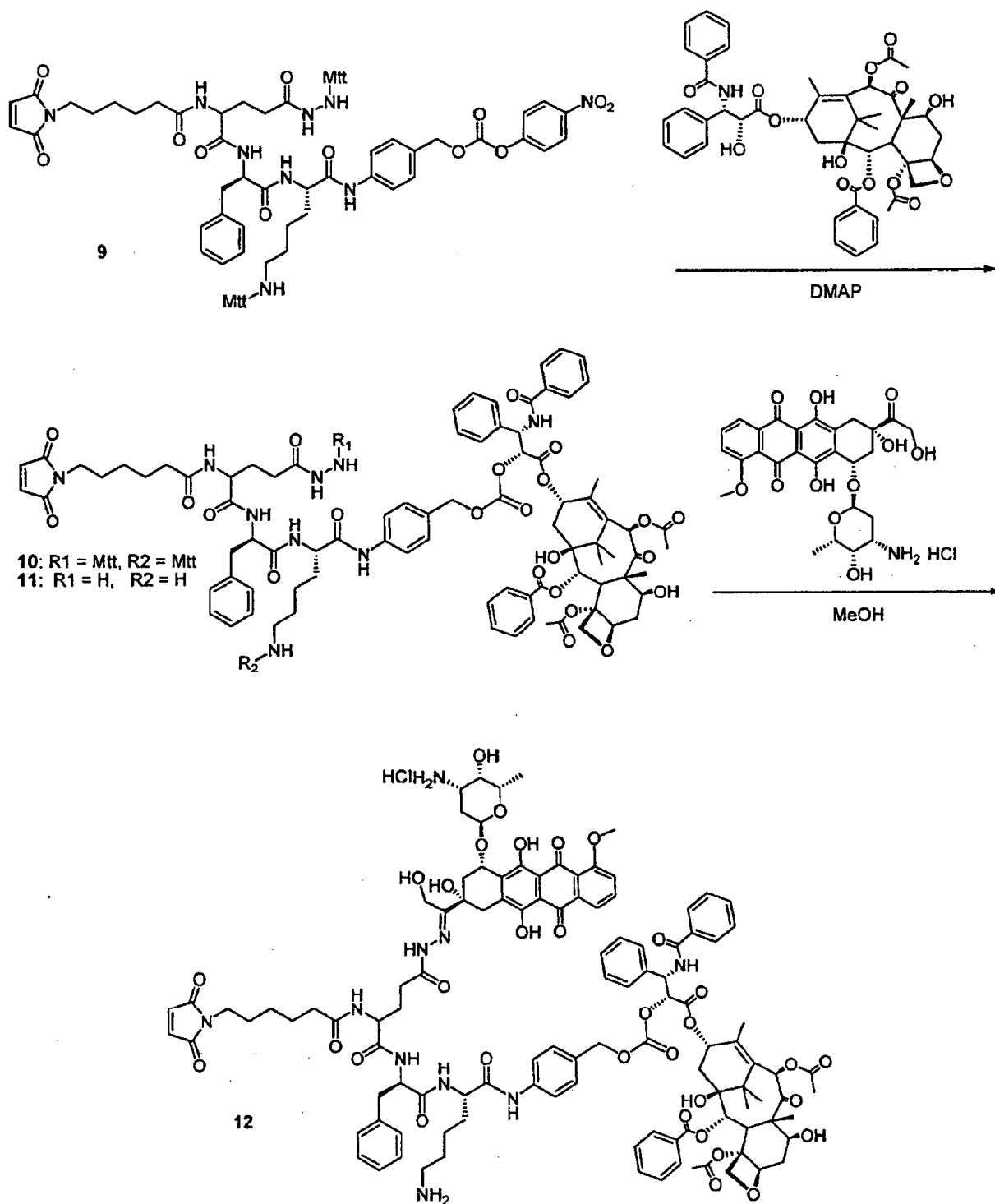


Fig. 4b