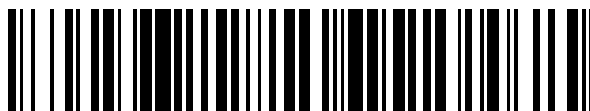


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 590**

51 Int. Cl.:

A61K 47/55 (2007.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2009** **PCT/GB2009/002484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010** **WO10046628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009** **E 09760548 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 2349344**

54 Título: **Agentes perturbadores vasculares activados MMP**

30 Prioridad:

22.10.2008 GB 0819287

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

ELLIPSES PHARMA LIMITED (100.0%)
Berkeley Square House, Berkeley Square
London W1J 6BD, GB

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 714 590 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes perturbadores vasculares activados MMP

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a profármacos de agentes perturbadores vasculares y al uso de tales compuestos en el tratamiento dirigido del cáncer.

Antecedentes de la invención

Dirigir la vasculatura tumoral como un enfoque molecular para las quimioterapias del cáncer se está convirtiendo en una de las prioridades científicas más altas. Están surgiendo dos modelos de fármacos, uno que previene la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor (antiangiogénesis) y otro que apunta destrucción vascular.

10 Se ha demostrado que la perturbación de incluso una pequeña proporción de la vasculatura del tumor induce una muerte tumoral amplia y un retraso de la metástasis, ya que un solo vaso sanguíneo es responsable de apoyar la supervivencia de muchas células tumorales. Las células endoteliales, que forman el componente principal de la vasculatura, dependen en gran medida del citoesqueleto de tubulina para su motilidad, invasión, unión, alineación y proliferación (Denekamp, J, Br J Cancer, 45, 136-139 (1982)). Por lo tanto, los agentes que perturban la red de
15 microtúbulos endoteliales causarán un rápido colapso en el flujo sanguíneo del tumor y un período prolongado de parada vascular, que culminará en una extensa necrosis de células tumorales (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Lippert JW, Bioorg Med Chem, 15, 605-615 (2007)).

Una de las clases más potentes de fármacos terapéuticos contra el cáncer son los agentes perturbadores vasculares (VDA) que, de manera característica, tienen buenas citotoxicidades celulares in vitro, pero a menudo muestran una
20 especificidad deficiente para matar tumores en tejidos normales in vivo. Además, muchos VDA, como los agentes aglutinantes de tubulina, son insolubles en agua y requieren una formulación antes de la evaluación en la clínica. La presente invención tiene como objetivo abordar los problemas mencionados anteriormente.

La colchicina y sus análogos son VDA potentes que causan hemorragia y posterior necrosis extensa en tumores (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005)), como consecuencia directa de la unión de tubulina y la inducción de la
25 despolimerización de microtúbulos (Chaudri et al., J Mol Biol, 303, 679-692 (2000)). Sin embargo, la colchicina no ha mostrado un valor intrínseco como un agente terapéutico contra el cáncer clínicamente aplicable debido a un alto nivel de toxicidad y el consiguiente índice terapéutico muy estrecho (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Quinn et al., J Med Chem, 24, 636-639 (1981)). Sería deseable, por lo tanto, poder dirigir un VDA, como la colchicina, selectivamente a un tumor.

30 Los presentes inventores han desarrollado un sistema para superar el efecto tóxico de la administración sistémica de agentes antineoplásicos potentes en particular agentes perturbadores vasculares.

Declaraciones de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en la selección de un sitio de escisión proteolítica que permite la liberación selectiva de un agente perturbador vascular, tal como colchicina, en la vasculatura del tumor.

35 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un agente perturbador vascular (VDA) asociado con un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de metaloproteinasa de matriz (MMP), en el que el VDA es un agente de unión a tubulina y anticáncer, y el sitio de escisión proteolítica de MMP comprende una secuencia de aminoácidos - Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-P2'-Leu- en donde P2' es un aminoácido y no es tirosina. El término "asociado con" en el contexto de la invención
40 pretende incluir todos los medios de asociación directos e indirectos, generalmente covalentes, incluidos, entre otros, enlaces químicos o enlaces peptídicos.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma de sales. En particular, las sales pueden ser sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales.
45 Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU., 1985, p. 1418, véase también Stahl et al, Eds, "Handbook of
50 Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002.

La divulgación incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en los cuales el compuesto padre se modifica haciendo sales ácidas o básicas de los mismos. Por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo. A partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de dichas sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tosilato y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro de metilo, etilo, propilo y butilo, bromuros y yoduros; sulfatos de dialquilo como dimetilo, dietilo, dibutilo; y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros.

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



en la que

X es un agente de perturbador vascular (VDA);

Y es un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de metaloproteínasa de matriz (MMP); como se define en las reivindicaciones.

Los compuestos de acuerdo con la invención proporcionan profármacos que se convierten en un VDA activo y potente dentro del entorno del tumor mediante los MMP sobreexpresados. La activación selectiva del tumor de un profármaco de la invención aumenta los niveles tumorales y disminuye los niveles sistémicos del VDA y, opcionalmente, de ingredientes activos adicionales, lo que aumenta considerablemente su índice terapéutico y su eficacia.

Los VDA comprenden un sistema de anillos múltiples, por ejemplo, un sistema de anillos tricíclicos o bicíclicos fusionados o no fusionados. Por lo tanto, X incluye cualquier sistema de múltiples anillos de un VDA que sea capaz de unirse y romper los vasos sanguíneos del tumor.

Los VDA se pueden dividir en tres clases:

(i) aquellos compuestos que interactúan con la tubulina en el sitio de unión a la colchicina en la tubulina;

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

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

En un aspecto preferido de la invención, el VDA es un agente de unión a tubulina. El agente de unión a la tubulina se puede seleccionar del grupo que consiste en i) aquellos que interactúan con la tubulina en el sitio de unión a la colchicina: incluidos, pero no limitados a colchicina (incluidos los análogos de la colchicina, como el N-acetilcolchinol-O-fosfato (ZD6126) y ABT 751), colchicinoides, combretastatinas fenstatina, podofilotoxinas, esteganacinas, anfetinilo y estilbenos; y ii) aquellos que interactúan con el sitio de unión a Vinca de la tubulina: incluidos, pero no limitados a vincristina, vinblastina, vinflunina, maitansinoides, fomopson A, rizoxina, auristatina (incluidos sus análogos) y dolastatina.

En un aspecto preferido de la invención, el VDA es un agente de unión a la tubulina que interactúa con el sitio de unión a la colchicina dentro de la tubulina. En una realización de la invención, el VDA es colchicina o un análogo/derivado de la misma. Los análogos o derivados de la colchicina pueden incluir, pero no se limitan a, azademetilcolchicina, azacolchicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina.

En una realización de la invención, el VDA es un VDA no peptídico. Por ejemplo, un VDA según la invención puede ser un agente de unión a tubulina que no es auristatina o un derivado de la misma.

Alternativamente, el VDA puede ser un agente de unión a tubulina seleccionado del grupo que consiste en, pero no limitado a, combretastatinas (por ejemplo, combretastatina A-4 3-O-fosfato), auristatina (incluyendo sus análogos),

dolastatina; y flavenoides (por ejemplo, factor de necrosis tumoral α y ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA), ácido acético de flavona (FAA)). Por lo tanto, en una realización alternativa de la invención, la VDA es una combretastatina.

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

La familia de MMP se divide en ocho grupos estructurales: cinco de los cuales son MMP secretados y tres de los cuales son MMP de tipo membrana (MT-MMP). Las MT-MMP están localizadas en la superficie celular.

10 En un aspecto preferido de la invención, la MMP es un tipo de membrana (MT-MMP). Por lo tanto, la invención proporciona un compuesto de fórmula I en donde Y comprende una secuencia peptídica que se escinde selectivamente por un MT-MMP

Las MT-MMP pueden seleccionarse del grupo que consiste en

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

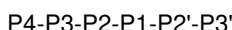
15 (ii) grupo estructural anclado con glicosilfosfatidilinositol (GPI) de MT-MMP, por ejemplo, MMP-17 (MT4-MMP) y MMP-25 (MT6-MMP);

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

El sitio de escisión de MMP comprende una secuencia peptídica que tiene un enlace amida, típicamente un enlace peptídico, que es escindible por una MMP. Preferiblemente Y es una secuencia peptídica que comprende entre 7 y veinte aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser D-aminoácidos o L-aminoácidos.

20 Preferiblemente, el sitio de escisión proteolítica de MMP es un sitio de escisión específico de MT-MMP tal que la escisión entre P1 y P1' tiene lugar selectivamente por una MT-MMP, por ejemplo, MT-MMP14.

El sitio de escisión proteolítica de MMP comprende la secuencia:



25 en donde P1' a P3' y P1 a P4, son como se definen en las reivindicaciones y en donde se lleva a cabo la escisión proteolítica entre los residuos P1' y P1.

La divulgación proporciona un sitio de escisión de MMP que comprende una secuencia peptídica que se escinde selectivamente por una MT-MMP. Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en donde Y comprende una secuencia peptídica en la que P1' es un aminoácido hidrófobo. Como se usa en el presente documento, el término "hidrófobo" puede referirse a aminoácidos que tienen una hidrofobicidad que es mayor o igual a -1.10 y/o una carga neta que es mayor o igual a 0 como se describe en Fauchere y Pliska Eur. J. Med Chem. 10:39 (1983). Un aminoácido hidrófobo o no polar también puede referirse a un aminoácido que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, no es polar que es generalmente repelido por una solución acuosa. Un aminoácido hidrófobo puede seleccionarse del grupo que consiste en leucina, fenilalanina, prolina, alanina, triptófano, valina, isoleucina, metionina, tirosina y treonina. P1' puede ser un aminoácido con una cadena lateral alifática. Alternativamente, P1' puede ser un aminoácido con una cadena lateral aromática. P1' también puede incluir aminoácidos hidrófobos no naturales y en una realización de la invención es homofenilalanina (Hof).

40 Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que, Y comprende una secuencia peptídica en la que P1 es un aminoácido polar, por ejemplo, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asparagina (N), Serina (S) o Glicina (G). Para mejorar la selectividad para un MT-MMP en el sitio de escisión, generalmente P1 no es prolina. Por lo tanto, P1 es un aminoácido que excluye la prolina. En una realización de la invención, P1 es glicina.

Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende una secuencia peptídica en la que P2' se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos polares no cargados y/o aminoácidos básicos que incluyen, por ejemplo, arginina (R), alanina (A), Leucina (L), Ácido Aspártico (D), Treonina (T), Serina (S) y Prolina (P). Para mejorar la selectividad para una MT-MMP en el sitio de escisión, P2' puede ser un aminoácido metilado.

45 Los presentes inventores han encontrado que la escisión por no MT-MMP, por ejemplo, MMP2, tiene lugar en los sitios P1'-P2' y P2'-P3' cuando P2' es tirosina. Así, en una realización de la invención, P2' no es tirosina.

Como se usa en el presente documento, el residuo P3' puede comprender cualquier aminoácido. En una realización de la invención, P3' es leucina (L). Cuando esté presente, el residuo P4' puede comprender un aminoácido con una cadena lateral nucleófila, por ejemplo, lisina (L), cisteína (C), serina (S), tirosina (Y), treonina (T), ácido glutámico (E), o ácido aspártico (D)

5 Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende una secuencia peptídica en la que P2 se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico), básicos, hidrófobos o polares. P2 también puede incluir aminoácidos hidrófobos no naturales, por ejemplo, citrulina (Cit). Para mejorar la selectividad para un MT-MMP en el sitio de escisión, se prefiere que P2 no sea prolina. Así, P2 es un aminoácido que excluye la prolina.

10 Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que, Y comprende una secuencia peptídica en la que P3 es un aminoácido polar, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), serina (S), Leucina (L), Isoleucina (I) y Treonina (T). Se prefiere que P3 no sea prolina. En una realización de la invención, P3 es serina.

15 Esta divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que, Y comprende una secuencia peptídica en la que P4 es un aminoácido que contiene una cadena lateral sustancial, por ejemplo, un aminoácido que tiene un grupo básico en su cadena lateral, incluidos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en arginina (R) y lisina (K). Para mejorar la selectividad para un MT-MMP en el sitio de escisión, se prefiere que P4 sea arginina. Así, en una realización de la invención, P4 es arginina.

20 La invención puede proporcionar un compuesto de fórmula (I) en el que el sitio de escisión, Y, comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos de la secuencia están glicosilados para mejorar la hidrofiliidad y, como tal, la solubilidad. La glicosilación de residuos puede ser como sigue:

O-glicosilación de aminoácidos en la secuencia a través de las cadenas laterales de serina, treonina, tirosina;

N-glicosilación de aminoácidos en la secuencia a través de las cadenas laterales de ácido aspártico, ácido glutámico; y/o

25 S-glicosilación de aminoácidos en la secuencia a través de cisteína.

La invención puede proporcionar un compuesto de fórmula (I) en el que el sitio de escisión, Y, comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos de la secuencia están fosforilados para mejorar la hidrofiliidad y, como tal, la solubilidad. Los aminoácidos adecuados incluyen serina, treonina, tirosina. En una realización de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende una secuencia peptídica en la que P2' está fosforilada. En una realización adicional de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) en el que, Y comprende una secuencia peptídica en la que P3, y opcionalmente P2', están/son aminoácidos fosforilados.

35 La invención también proporciona un compuesto de fórmula (I) en el que el sitio de escisión, Y, incluye un análogo peptídico, por ejemplo, un imitador de péptido, en el que, a modo de ejemplo, un enlace amida se reemplaza por enlaces olefinicos, aminoácidos N α - y/o C α -metilados, aminoácidos no naturales y otros enfoques conocidos en la técnica. Dichos enfoques peptidomiméticos se usan en la técnica para mejorar la especificidad de la escisión, sirviendo de ese modo para disminuir la hidrólisis enzimática no deseada. En una realización de la invención, Y incluye un análogo en el que uno o más enlaces amida dentro de la secuencia de aminoácidos se reemplazan con aminoácidos N α y/o C α metilados.

40 Una realización de la invención comprende un compuesto de fórmula (I) en la que Y comprende un sitio C-extremo y un sitio N-extremo y en la que dicho sitio C-extremo está directa o indirectamente unido a X y dicho sitio N-extremo está enlazado directa o indirectamente a un resto adicional, por ejemplo, c o Z como se describe a continuación.

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

45 En una realización preferida de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que X es colchicina o un análogo de la misma e Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se define en el presente documento.

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

X-Y-c (II)

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

c es un grupo final o "grupo tope". Los grupos tope pueden usarse para limitar una cadena peptídica en uso farmacéutico para prevenir la degradación no específica del péptido, por ejemplo, por enzimas distintas de las MMP. c puede incluir cualquier resto apropiado en el extremo N- o C- que actúe como un grupo bloqueador seleccionado del grupo que incluye, entre otros, alifáticos, aromáticos, policíclicos, carbohidratos (por ejemplo, azúcares simples), aminoácidos (incluido D-aminoácidos). Para mejorar la solubilidad, c puede ser un grupo hidrófilo, por ejemplo, cualquiera de los grupos funcionales polares adicionales que se mencionan anteriormente (por ejemplo, ácidos, aminas, alcoholes, fenoles).

10 c puede representarse por la fórmula (c)_n, donde n es un número entero entre 1 y 5. En una realización de la invención, c se representa (c)_n donde c es un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido no natural) y n es 3. En una realización de la invención, c no es serina, donde n es 3. En una realización adicional, c no es serina o ácido quínico.

15 La presente invención puede proporcionar además un "enlazador". El enlazador puede proporcionarse en el extremo C y/o N de Y. Preferiblemente, el enlazador se proporciona en el extremo C de Y. Preferiblemente, el enlazador es continuo con la secuencia de aminoácidos de Y. El enlazador puede incluir cualquier resto que esté asociado con Y y que puede eliminarse químicamente, enzimáticamente o descomponerse espontáneamente. El enlazador puede consistir en un solo aminoácido (por ejemplo, tirosina) o puede comprender una secuencia de aminoácidos. Cuando el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos, la secuencia puede proporcionar una región hidrófila que puede facilitar la escisión mediante una MMP en Y. La O-glicosilación de aminoácidos adecuados en la secuencia a saber, serina, treonina y tirosina puede mejorar la hidrofiliidad y, como tal, la solubilidad.

20

Por lo tanto, en un aspecto preferido de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (III)

X-a-Y (III)

en donde X e Y son como se definen en el presente documento; y

a es un enlazador en el que el enlazador está asociado directa o indirectamente con X

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

X-a-Y-c (IV)

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

En un aspecto aún más preferido de la invención, se proporciona un "espaciador" que puede ser el mismo o diferente al enlazador descrito en el presente documento. El espaciador puede proporcionarse en el extremo C y/o N de Y. Preferiblemente, el espaciador se proporciona en el extremo N de Y y sirve para evitar la eliminación no deseada de c durante la síntesis. El espaciador puede estar asociado directa o indirectamente con Y. El espaciador puede incluir cualquier aminoácido individual (por ejemplo, β-alanina), secuencia de aminoácidos o un grupo succinilo. Por lo tanto, la invención proporciona preferiblemente un compuesto de fórmula (V)

30

X-Y-b-C (V)

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

b es un espaciador como se define aquí.

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

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

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

40 En una realización de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (VI) en la que X es colchicina (o un análogo de la misma), Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en el presente documento, a es tirosina y b es alanina.

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



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

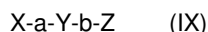
- 5 Preferiblemente, Z es un agente anticanceroso seleccionado del grupo que consiste en un agente perturbador vascular, que puede ser igual o diferente a X, un antimetabolito (por ejemplo, 5-fluorouracilo), un agente citotóxico o antiproliferativo (por ejemplo, antraciclina (por ejemplo, doxorrubicina), alcaloide de la vinca, taxano, nucleótido citotóxico) una biotoxina, un agente radioterapéutico, un agente hormonal o cualquier producto natural o agente conocido por inducir un efecto citotóxico, citostático, antiangiogénico o de perturbación vascular.

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



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

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



- 15 en la que X, a, Y, b y Z son como se definen aquí. En este aspecto de la invención, el propósito del espaciador b es convertir la amina N-extremo de Y en un ácido carboxílico para permitir la unión de un compuesto Z en el que Z contiene una amina libre (por ejemplo, donde Z es doxorrubicina). Donde Z lleva un ácido carboxílico libre, no se requiere b.

- 20 En un aspecto preferido de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (VII) en la que X es colchicina o un derivado de la misma, por ejemplo, azademetilcolchicina y Z es un agente citotóxico, por ejemplo, doxorrubicina. Preferiblemente, todavía Y es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en el presente documento.

- 25 En un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (VII) en la que X y Z se seleccionan de colchicina o un análogo o derivado de la misma. También se proporciona un compuesto de la invención en el que X y Z pueden ser ambos colchicina. En este aspecto, Y puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se define en el presente documento.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar en fase sólida, por ejemplo, unidos a un soporte polimérico, o síntesis en fase de solución, por ejemplo, en presencia de un agente de acoplamiento o utilizando una síntesis convergente.

- 30 En el presente documento también se describe un proceso para preparar un compuesto de acuerdo con la invención, comprendiendo el proceso las etapas de

i) proporcionar un soporte sólido unido a X;

ii) unir opcionalmente un enlazador al extremo C o N de X;

- 35 iii) unir los residuos de aminoácidos por etapas al extremo C o N de X, o al enlazador unido a X para proporcionar la secuencia peptídica Y que contiene la secuencia de escisión proteolítica MMP;

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

- 40 En un proceso, el soporte sólido es cualquier soporte polimérico tal como cualquier resina a base de poliestireno o a base de PEG, por ejemplo, resinas a base de trítulo. El enlazador puede ser un derivado de succinato o malonato, por ejemplo, anhídrido succínico.

Un proceso adicional para preparar un compuesto de acuerdo con la invención comprende las etapas de

i) preparar la secuencia peptídica Y;

ii) unir un grupo tope c al extremo C o N respectivo de Y;

iii) preparar una solución de X y el péptido de tope preparado en (ii) en presencia de un agente de acoplamiento y aislar el compuesto deseado.

5 En un proceso Y se prepara mediante la unión gradual de aminoácidos a un soporte sólido para proporcionar una secuencia peptídica. Alternativamente, la secuencia Y puede sintetizarse en solución.

Cualquier agente de acoplamiento conocido en la técnica se puede usar en un proceso de la invención, por ejemplo, EDAC, DCC, DIC, PyBOP, HCTU, etc. en un disolvente adecuado (por ejemplo, DMF, THF, etc.).

10 En una síntesis alternativa en fase de solución, uno o más aminoácidos del extremo C de la secuencia Y pueden conjugarse con X en solución, para permitir el resto de la secuencia peptídica (por ejemplo, presintetizada en un soporte sólido como se describió previamente) para ser conjugado en solución en una síntesis convergente.

Un proceso proporciona la unión de X al extremo C de Y. Además, el proceso puede incluir la unión de Z al extremo N de Y. Por ejemplo, el proceso puede comprender los pasos de:

i) Introducción de un grupo amino a X para la unión al extremo C de Y; y, opcionalmente,

15 ii) introducción de un grupo ácido carboxílico (o un grupo isotiocianato o isocianato) en Z para unirse al extremo N de Y.

Un proceso adicional proporciona la unión de X al extremo N de Y. Además, el proceso puede incluir la unión de Z al extremo C de Y. Por ejemplo, el proceso puede comprender los pasos:

i) introducción de un grupo ácido carboxílico (o un grupo isotiocianato o isocianato) a X para la unión al extremo N de Y; y opcionalmente

20 ii) introducción de un grupo amina a Z para la unión al extremo C de Y.

En un proceso X es colchicina o un análogo o derivado de la misma, por ejemplo, azademtilcolchicina y Z es un agente citotóxico, por ejemplo, doxorubicina.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un sitio de escisión proteolítico de MMP, en particular un sitio de escisión específico de MT-MMP tal como se define aquí, en la activación específica de sitio de un VDA. El término "activación específica de sitio" como se usa en este documento significa, en términos generales y no limitados a, la activación de un VDA por escisión específica de sitio en el sitio de escisión proteolítica MMP. Se espera que la escisión específica del sitio en el sitio de escisión proteolítica tenga lugar concomitantemente con la liberación y, por lo tanto, con la activación del VDA.

Composiciones farmacéuticas y usos

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

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

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

40 Las composiciones de la invención se administran típicamente en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" es la cantidad de una composición que solo, o junto con otras dosis, produce la respuesta deseada. Cuando se administran, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Dichas preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos (por ejemplo, cisplatina; carboplatina; ciclosfosfamida; melfalán; carmuslina; metotrexato; 5-fluorouracilo; citarabina; mercaptopurina; daunorrubicina; doxorubicina, epirubicina, vinblastina; vincristina; dactinomicina; mitomicina C; taxol; L-asparaginasa; G-CSF; etopósido; colchicina; mesilato de derferoxamina y camptotecina).

45

Las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía convencional, incluida la inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica. En el caso de tratar una enfermedad particular, como el cáncer, la respuesta deseada es inhibir la progresión de la enfermedad. Esto puede implicar solo retardar la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferiblemente, implica detener la progresión de la enfermedad permanentemente. Esto puede controlarse mediante métodos de rutina conocidos en la técnica.

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponantes adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal. Las composiciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, que contienen cada una, una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como jarabe, elixir o una emulsión.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa o no acuosa de compuesto, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación puede formularse de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o di-glicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico en la preparación de inyectables. Las formulaciones de portadores adecuadas para administraciones orales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, etc. se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar una enfermedad o afección asociada con el tejido que sobreexpresa una MMP, en particular una MT-MMP. Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención. En un método preferido de la invención, dicho sujeto es humano.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a las células que poseen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento celular de proliferación rápida. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de manera maligna, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasión. El término "cáncer" incluye tumores malignos de origen epitelial, endodérmico y mesenquimatoso, particularmente carcinomas y sarcomas, como los que afectan el sistema respiratorio (boca, nariz, tráquea, pulmón), tracto gastrointestinal (lengua, esófago, estómago, intestino delgado, colon, hígado, páncreas, vesícula biliar, recto), sistema endocrino (tiroides, pituitaria, glándulas suprarrenales), tracto genitourinario (vejiga urinaria, riñón), sistema reproductivo (mama, ovarios, útero, cuello uterino, próstata, pene, escroto, testículos), piel (melanocitos, epidermis, endodermis), sistema nervioso (cerebro, médula espinal, células gliales, neuronas) y sistema linfático.

El término carcinoma se reconoce en la técnica y se refiere a tumores malignos de origen epitelial que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema endocrino, carcinomas del tracto genitourinario, carcinomas de la piel y carcinomas del sistema reproductor. El término

“carcinoma” también incluye “adenocarcinomas” que se refieren a carcinomas derivados de tejido glandular, “carcinomas escamosos” que se refieren a carcinomas de origen escamoso y “carcinosarcomas” que se refieren a tumores compuestos por tejido carcinomatoso y sarcomatoso. Los carcinomas ejemplares incluyen los que se forman a partir de los epitelios del cuello uterino, próstata, mama, nariz, cabeza y cuello, cavidad bucal, esófago, estómago, hígado, páncreas, colon, ovario, vejiga urinaria y pulmón, particularmente carcinoma pulmonar no pequeño.

El término “sarcoma” es reconocido en la técnica y se refiere a las neoplasias malignas de los tejidos blandos o del tejido conjuntivo o de soporte, que incluyen hueso, cartilago, tejido adiposo, músculo liso, músculo esquelético, vaina nerviosa, vasos sanguíneos, mesotelio y estroma gastrointestinal. Otros tipos de cáncer incluyen “leucemias”, que se refieren a tumores derivados de glóbulos blancos, y “linfomas”, que se refieren a tumores del sistema linfoide.

Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención se puede administrar en combinación, secuencialmente o en un tiempo sustancialmente similar, como un agente anticanceroso (agente quimioterapéutico) que incluye, entre otros, un antimetabolito (por ejemplo, 5-fluorouracilo), un agente citotóxico o antiproliferativo (por ejemplo, antraciclina, alcaloide de la vinca, taxano, nucleótido citotóxico), una biotoxina, un radioterapéutico, un agente hormonal o cualquier producto natural o agente conocido por inducir un efecto citotóxico, citostático, anti-angiogénico o de perturbación vascular.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula que se está tratando, y puede realizarse para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica.

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

En un aspecto de la presente invención, los compuestos o composiciones de la invención se pueden usar para tratar un trastorno inflamatorio y/o una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, según una invención adicional, se proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención.

El trastorno inflamatorio puede seleccionarse del grupo que consiste en aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis, gota, lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, poli y dermatomiositis, vasculitis, tendinitis, sinovitis, endocarditis bacteriana, periodontitis, osteomielitis, psoriasis, neumonía, alveolitis fibrosa, bronquitis crónica, bronquiectasia, enfisema, silicosis, neumoconiosis, tuberculosis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, polirradiculoneuropatías desmielinizantes inflamatorias crónicas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillan Barre, y miastenia gravis, mastitis, laminitis, laringitis, colecistitis crónica, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad inflamatoria de la mama. En una realización, el trastorno inflamatorio puede ser el resultado de rechazo de tejido u órgano después del trasplante. En realizaciones particulares, el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis, sepsis y poliartritis.

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

En una realización de la presente invención, los compuestos de la invención pueden ser útiles para tratar una herida (por ejemplo, úlceras, lesiones que incluyen cortes o quemaduras cutáneas). Por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar una herida en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención. En un método preferido de la invención, dicho sujeto es humano.

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

Se proporciona además un paquete o kit de partes que comprende:

- (1) un compuesto o composición descrita en el presente documento; junto con
- (2) instrucciones para usar el compuesto en un método o uso descrito aquí.

El paquete definido en el presente documento puede comprender más de una unidad de dosificación para proporcionar una dosificación repetida. Si está presente más de una unidad de dosificación, dichas unidades pueden ser las mismas, o pueden ser diferentes en términos de la dosis de la composición del compuesto y/o la forma física.

El alcance de la protección incluye productos falsificados o fraudulentos que contienen o pretenden contener un compuesto de la invención independientemente de si contienen de hecho un compuesto de este tipo e independientemente de si cualquiera de dichos compuestos está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 5 Se incluyen en el alcance de la protección paquetes que incluyen una divulgación o instrucciones que indican que el paquete contiene una especie o formulación farmacéutica de la invención y un producto que es o comprende, o pretende ser o comprende, tal formulación o especies. Dichos paquetes pueden ser, pero no necesariamente, falsificados o fraudulentos.

- 10 A lo largo de la divulgación y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras “comprenden” y “contienen” y las variaciones de las palabras, por ejemplo “que comprende” y “comprende”, significa “que incluye, pero no se limita a”, y no se pretende para (y no) excluye otros restos, aditivos, componentes, enteros o pasos

A lo largo de la divulgación y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se debe entender que la especificación contempla la pluralidad y la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

- 15 Los rasgos, enteros, características, compuestos, restos químicos o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, a menos que sea incompatible con ellos.

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

La Figura 1 es un gráfico que muestra el metabolismo de profármaco-1 en versus el tiempo en tejidos tumorales y no tumorales ex vivo;

- 20 La Figura 2 es un gráfico que muestra la acumulación y los niveles de profármaco-1 en ratones portadores de tumores después de la administración intraperitoneal;

La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de VDA que se acumulan después de la administración intraperitoneal del profármaco-1 de ratones portadores de tumores;

- 25 La Figura 4 es una gráfica que muestra el metabolismo diferencial del profármaco-2 en homogenados de tumores que expresan niveles altos de MT1-MMP (HT1080) frente a homogenados de tumores que expresan niveles bajos de MT1-MMP (MCF-7);

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

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

La Figura 7: pesos corporales relativos del ratón durante el estudio de aumento de dosis

La Figura 8: Crecimiento tumoral durante el tratamiento con ICT-2522 (cabeza activa)

La Figura 9: Crecimiento tumoral durante el tratamiento con ICT-2588 (profármaco)

- 35 La Figura 10: Curvas de crecimiento tumoral en ratones tratados con profármacos (ICT-2588) en comparación con la cabeza activa (ICT-2552) administradas a la dosis molar equivalente a) ICT-2588, 37.5 mg/kg e ICT-2552, 7.5 mg/kg; b) ICT-2588, 50.0 mg/kg e ICT-2552, 10.0 mg/kg; c) ICT-2588, 62.5 mg/kg e ICT-2552, 12.5 mg/kg; y d) ICT-2588, 75.0 mg/kg & ICT-2552, 15.0 mg/kg;

La Figura 11: Profármaco, ICT-2588, que muestra las modificaciones que incluyen los residuos de aminoácidos fosforilados, la tapa extremo, la cabeza activa y las alternativas P2';

- 40 La Figura 12: un gráfico que demuestra la estabilidad de ICT 3053 (P2'= Ala) tanto en homogenados de tumor (HT1080) como de hígado (murino). Este es un ejemplo de los datos obtenidos para esta serie de moléculas y en la tabla 1 se presenta un resumen de los datos; y

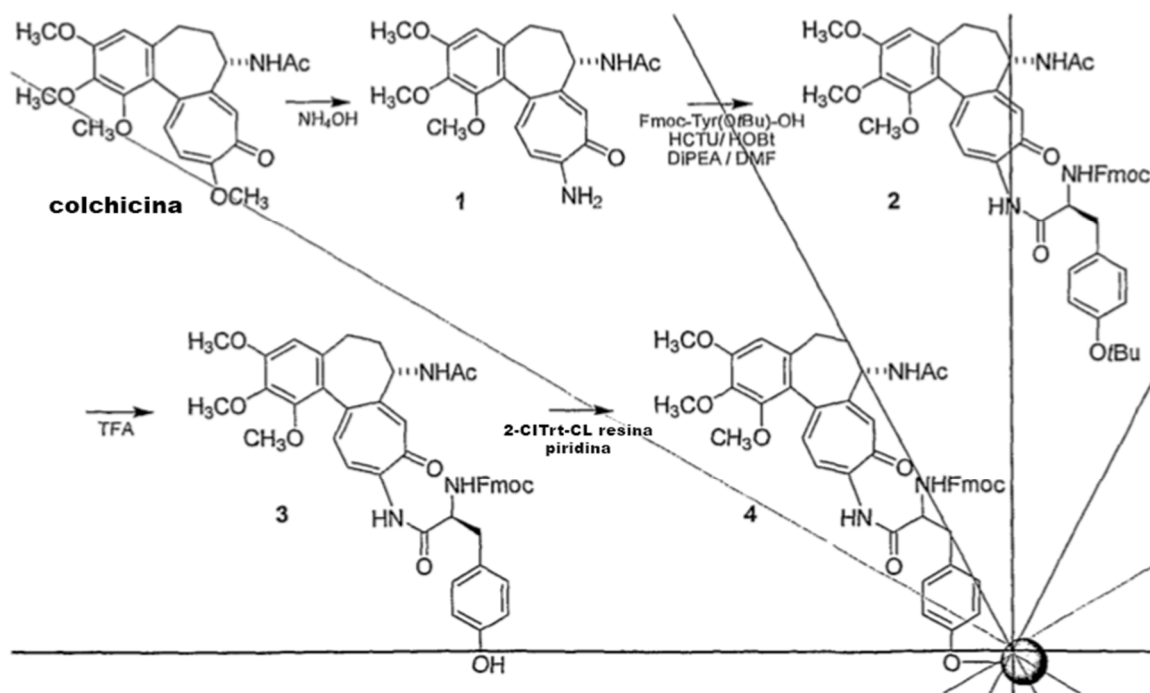
- 45 La Figura 13: Datos de estabilidad para moléculas con fosfato unido a la serina (ICT3047) tirosina (ICT 3048) y tanto serina como tirosina (ICT3028). Los datos muestran el porcentaje de la molécula padre que queda después de las incubaciones en el homogenado de tumor (HT1080, símbolos cerrados) e hígado murino (símbolos abiertos) durante

el tiempo indicado. Estos son datos representativos de múltiples experimentos. Se establecieron separaciones cromatográficas para monitorizar la desfosforilación de cada molécula.

Materiales y métodos

Ejemplo 1

5 Síntesis de un derivado de colchicina inmovilizado, azademetilcolchicina



Síntesis de 1:

Se añadió solución de amoníaco (35%, 15 ml) a colchicina (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto bruto se lavó con KHSO_4 (1 M, ac.), se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. Posteriormente se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice (elución en gradiente: CH_2Cl_2 /metanol 95:5 a 10:1) para dar 1 como un sólido amarillo (427 mg, 1.11 mmol, 59%).

δ_{H} (600 MHz, CDCl_3), 7.99 (1 H, amplio s, NH), 7.56 (1 H, d, J 2.1, C8-H), 7.32 (1H, d, J 10.7, C11-H), 6.88 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 6.52 (1 H, s, C4-H), 6.03 (2 H, amplio s, NH_2), 4.68 (1 H, ddd, J 12.6, 6.5 y 6.5, C7-H), 3.93 (3 H, s, OCH_3), 3.88 (3 H, s, OCH_3), 3.60 (3 H, s, OCH_3), 2.47 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5- CH_2), 2.35 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5- CH_2), 2.29-2.23 (1 H, m, C6- CH_2), 1.98 (3 H, s, CH_3), 1.90-1.88 (1 H, m, C6- CH_2); ES m/z (%) 385 [$\text{M}^+ + \text{H}$] (100).

Síntesis de 2:

Se agregaron HCTU (642 mg, 1.55 mmol, 1.50 eq) y diisopropiletilamina (DiPEA, 516 μL , 404 mg, 3.11 mmol, 3.00 eq) a una solución de Fmoc-tyr(tBu)-OH (714 mg, 1.55 mmol, 1.50 eq) en DMF (10 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadió 1 (398 mg, 1.04 mmol, 1.00 eq) a la solución. La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 22 h. La DMF se eliminó al vacío y el aceite resultante se disolvió en CH_2Cl_2 (20 ml). La fase orgánica se lavó con KHSO_4 (ac, 2 x 20 ml), se secó con MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía flash (elución en gradiente: CH_2Cl_2 /metanol 100:0 a 99:1 a 98:2) para dar 2 como un sólido amarillo (530 mg, 642 mmol, 67%).

δ_{H} (600 MHz, CDCl_3), 10.42 (1 H, amplio s, NH), 9.02 (1 H, d J 10.7, C11-H), 7.75 (2 H, d, J 7.2, C23-H, C24-H), 7.54 (2 H, d, J 7.2, C20-H, C27-H), 7.45 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 7.39 (2 H, dd, J 7.2 y 7.2, C22-H, C25-H), 7.29 (2 H, dd, J 6.6 y 6.6, C21-H, C26-H), 7.19 (1 H, amplio s, C8-H), 7.03 (2 H, d, J 7.9, C14-H, C17-H), 6.81 (2 H, d, J 7.9, C15-H,

C16-H), 6.50 (1 H, s, C4-H), 5.88 (1 H, amplio s, NH), 5.25 (1 H, amplio s, C12-H), 4.73-4.67 (1 H, m, C7-H), 4.43 (1 H, dd, J 10.0 y 7.6, C18-CH₂), 4.28 (1 H, dd, J 10.0 y 7.2, C18-CH₂), 4.16 (1 H, dd, J 7.2 y 6.19, C19-H), 3.93 (3 H, s, OCH₃), 3.88 (3 H, s, OCH₃), 3.62 (3 H, s, OCH₃), 3.21 (1 H, dd, J 13.1 y 4.8, C13-CH₂), 3.11 (1 H, dd, J 13.1 y 5.5, C13-CH₂), 2.53 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5-CH₂), 2.40 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5-CH₂), 2.22-2.15 (1 H, m, C6-CH₂), 1.88 (3 H, s, CH₃), 1.80 (1 H, ddd, J 11.5, 11.3 y 6.9, C6-CH₂), 1.22 (9 H, s, C(CH₃)₃); ES m/z (%) 826 [M⁺] (100).

Síntesis de 3:

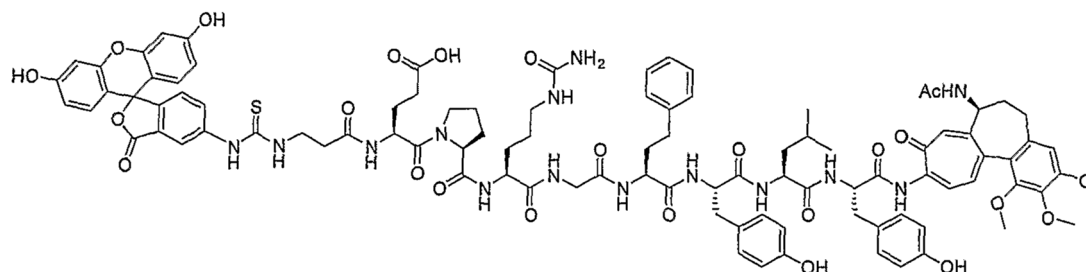
Se añadió TFA (2 ml) a una solución de 2 (486 mg, 589 µmol, 1.00 eq) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min. La TLC indicó una conversión cuantitativa al producto. El producto se concentró a presión reducida, con coevaporación de tolueno para dar 3 en rendimiento cuantitativo.

δ_H (600 MHz, CDCl₃), 10.08 (1 H, amplio s, NH), 8.99 (1 H, d J 10.7, C11-H), 7.71 (2 H, d, J 6.2, C23-H, C24-H), 7.55 (1 H, s, C8-H), 7.49 (2 H, dd, J 6.5 y 6.5, C20-H, C27-H), 7.41 (1 H, d, J 10.2, C10-H), 7.33 (2 H, dd, J 6.2 y 6.2, C22-H, C25-H), 7.26-7.21 (2 H, m, C21-H, C26-H), 6.91 (2 H, d, J 8.3, C14-H, C17-H), 6.56 (2 H, d, J 7.2, C15-H, C16-H), 6.45 (1 H, s, C4-H), 5.93 (1 H, amplio s, NH), 5.28 (1 H, s, NH), 4.95-4.90 (1 H, m, C12-H), 4.60 (1 H, ddd, J 11.7, 5.8 y 6.9, C7-H), 4.39 (1 H, dd, J 8.9 y 8.6, C18-CH₂), 4.29-4.24 (1 H, m, C18-CH₂), 4.12 (1 H, dd, J 6.9 y 6.9, C19-H), 3.90 (3 H, s, OCH₃), 3.84 (3 H, s, OCH₃), 3.54 (3 H, s, OCH₃), 3.08 (2 H, d, J 5.2, C13-CH₂), 2.44 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5-CH₂), 2.33-2.26 (1 H, m, C5-CH₂), 2.15-2.09 (1 H, m, C6-CH₂), 1.82 (3 H, s, CH₃), 1.75-1.69 (1 H, m, C6-CH₂); ES m/z (%) 770 [M⁺] (100).

Preparación de 4:

Se suspendió resina de cloruro de 2-clorotritilo (Novabiochem, malla 100-200, sustitución 1.4 mmol g⁻¹, 589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eq) en una solución de 3 (589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eq), dimetilaminopiridina (10 mg, 76.5 µmol, 0.01 eq), DiPEA (247 mg, 1.913 mmol, 333 µl, 2.50 eq) y piridina (241 mg, 3.061 mmol, 248 ml, 4.00 eq) en THF (10 ml) y se agitó durante 6 horas a 50°C. La resina se filtró posteriormente y se lavó a fondo con THF. La resina se tapó luego lavando cuidadosamente la resina con metanol (CH₂Cl₂: MeOH: DiPEA 17:2:1, 100 ml). La resina 4 se secó durante la noche sobre P₂O₅. Peso de la resina seca: 593 mg (carga 56%).

Procedimiento general para la síntesis de profármacos activados por endopeptidasa.



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

Como ejemplo, el conjugado peptídico 5 se sintetizó utilizando la síntesis peptídica en fase sólida convencional, a partir del derivado de colchicina 4 inmovilizado, utilizando una estrategia basada en Fmoc.

La síntesis de la estrategia de Nα-Fmoc se logró manualmente utilizando una resina derivatizada con 2-clorhidrato. La resina se hinchó completamente en DMF, seguido de la eliminación del grupo protector NFmoc mediante tratamiento con 20% v/v de piperidina en DMF (3 x 3 min). Todos los acoplamiento se realizaron en DMF, empleando un exceso molar de 2.5 veces de aminoácidos protegidos con Nα-Fmoc (con grupos protectores de cadena lateral apropiados), y se activaron usando HCTU/HOBt/DiPEA. Las desprotecciones de Nα-Fmoc se realizaron con piperidina al 20% en DMF (3 X 3 min). El éxito de los acoplamiento y las desprotecciones se supervisó mediante la prueba Kaiser basada en ninhidrina. Se repitieron los acoplamiento fallidos. Después de la desprotección final de Nα-Fmoc, la cadena peptídica se limitó al final con isotiocianato de fluoresceína (2.50 eq, en presencia de DiPEA, 1.50 eq). El éxito de esta reacción también fue supervisado por la prueba de Kaiser.

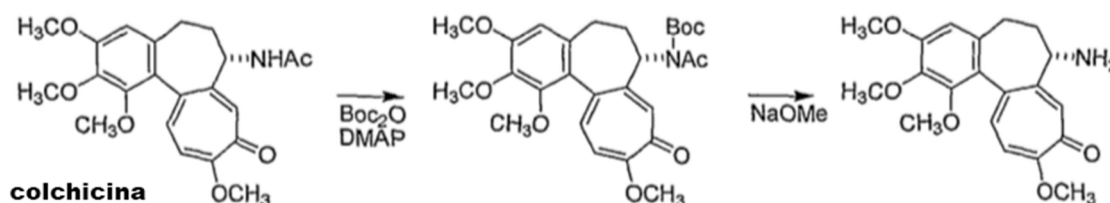
Se incorporó un residuo de β-alanina adicional en la secuencia para superar la incompatibilidad del enlace tiourea y las condiciones ácidas de escisión (la tiourea puede reorganizarse, y el carbono carbonilo del enlace amida precedente puede sufrir un ataque nucleofílico por la función similar a sulfidriló así formada. Esto conduce a la escisión del enlace amida, con la formación concomitante de una tiazolinona cíclica. La tiazolinona puede sufrir un reordenamiento en presencia de ácido acuoso para formar una tiohidantoína.

Al completar la secuencia, la resina se lavó (DMF, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH) y se secó al vacío sobre KOH hasta peso constante. Los péptidos se escindieron de la resina mediante acidólisis suave usando TFA-H₂O-triisopropilsilano 95:2.5:2.5 durante 2 horas a temperatura ambiente, con desprotección de cadena lateral simultánea. Después de la escisión, el TFA se eliminó a presión reducida. El producto bruto se extrajo en ácido acético acuoso al 95% y se liofilizó.

5 El péptido crudo se analizó posteriormente usando HPLC de fase inversa y se purificó usando HPLC preparativa (pureza >97%). Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron. Se usó una columna preparativa C18 (Zorbax Eclipse, 21.2 x 150 mm XDB-C18, Agilent) para la purificación del conjugado peptídico. Las fases móviles fueron las siguientes; Fase móvil A: agua de grado HPLC y 0.045% de TFA. La fase móvil B consistió en un 10% de agua de grado HPLC, 90% de acetonitrilo y 0.045% de TFA. La fase móvil se desgasificó mediante filtración al vacío a través de un filtro de nitrato de celulosa de poro de 0.45 µm (Sartolon, Sartorius, Reino Unido). La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y la velocidad de flujo se mantuvo en 21.2 ml/min. Los gradientes de fase móviles se optimizaron y escalaron a partir de un gradiente previamente diseñado internamente para compuestos estructuralmente similares. La detección de absorbancia UV fue óptima a 255 nm. ES m/z (%) 951.8 [M+H]²⁺ (100). RP-HPLC (Gradiente: 0 min 30% B; 5 min 35% B; 25 min 80% B; 26 min 100% B; 27 min 100% B; 30 min 30% B) Rt = 11.98 min.

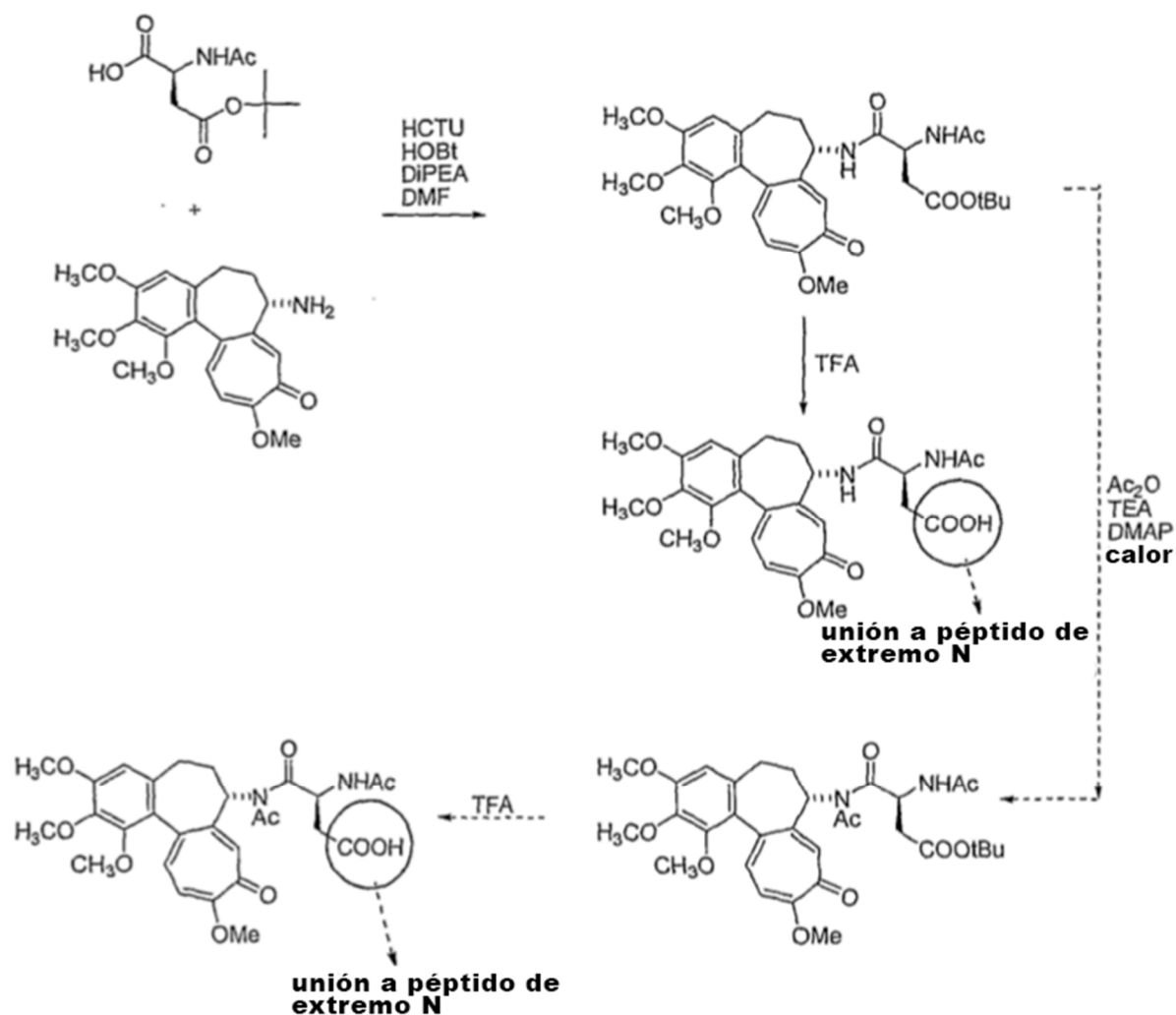
15 Unión de colchicina a una secuencia peptídica a través de su anillo B al extremo N del péptido

Para permitir la unión de un resto de colchicina a través del extremo N del péptido, se utilizará la siguiente estrategia. La amina de anillo B se puede desenmascarar utilizando métodos publicados. La acilación con ácido aspártico introducirá un ácido carboxílico en la molécula (de la cadena lateral del aminoácido), lo que permite la conjugación con la amina libre en el extremo N del péptido (ver más abajo).



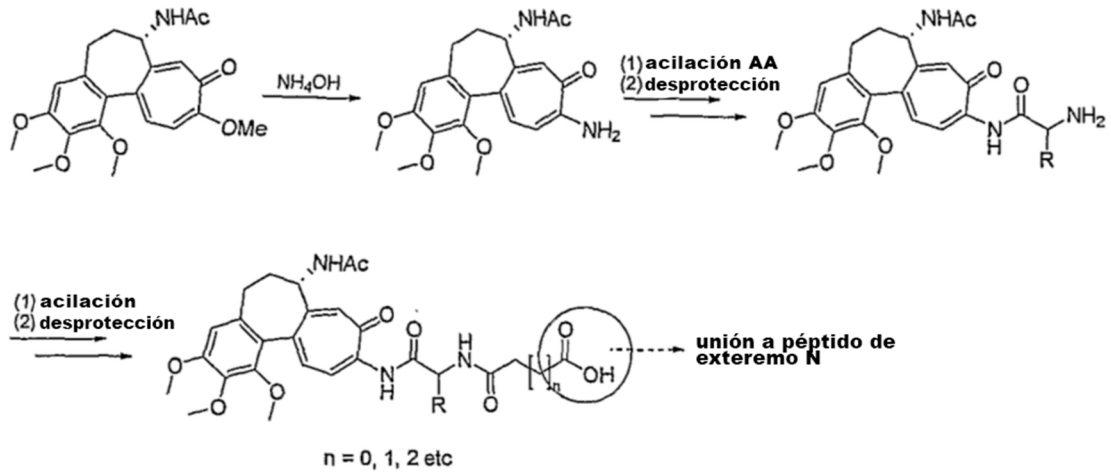
20

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



Unión del análogo de la colchicina a una secuencia peptídica a través de su anillo C al extremo N del péptido

Para permitir la unión de un análogo de colchicina a través de su extremo N, se utilizará la siguiente estrategia. La acilación de azademetilcolchicina se puede efectuar como se describe anteriormente. Al quitar el enmascaramiento del grupo protector de Boc, sigue la acilación con anhídrido succínico (o un derivado de succinato o malonato mono-prottegido (o similar)). La desprotección proporcionará entonces una funcionalidad de ácido carboxílico adecuada para la unión al extremo N del péptido.

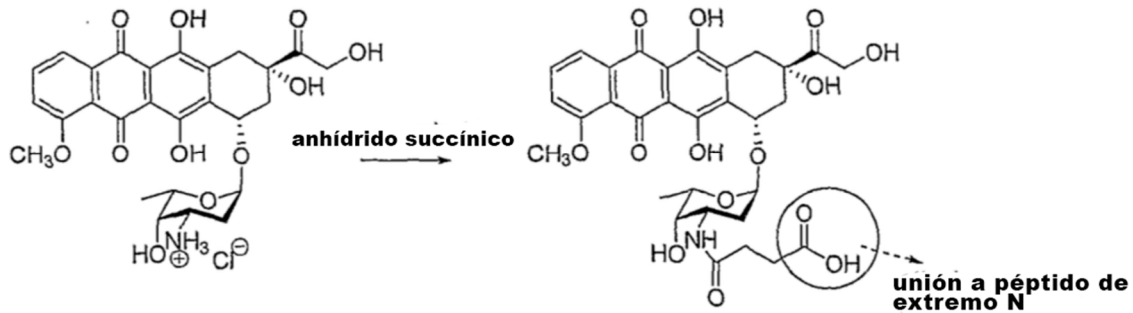


Estrategias para la unión de doxorubicina a una secuencia peptídica:

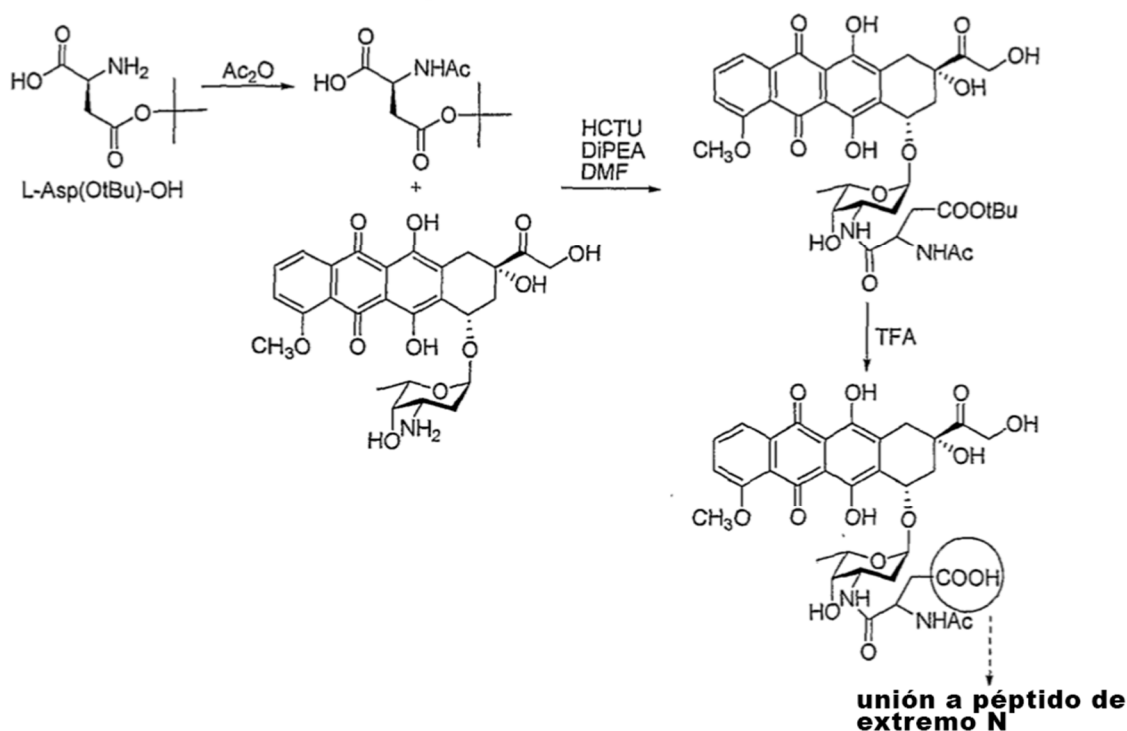
1) Enlace doxorubicina N-extremo

- 5 Para permitir la unión de doxorubicina a través del extremo N del péptido (después de la síntesis de péptidos utilizando la resina derivatizada con colchicina inmovilizada descrita anteriormente), primero se debe modificar para introducir un ácido carboxílico. Los ejemplos incluyen la reacción con anhídrido succínico (estrategia 1, a continuación). Sin embargo, al utilizar la cadena lateral del ácido aspártico (ambos aminoácidos naturales), como se muestra a continuación (estrategia 2), se libera un aminoácido natural (a diferencia de una entidad química extraña) en el metabolismo:

10 Estrategia 1: (espaciador de succinilo)

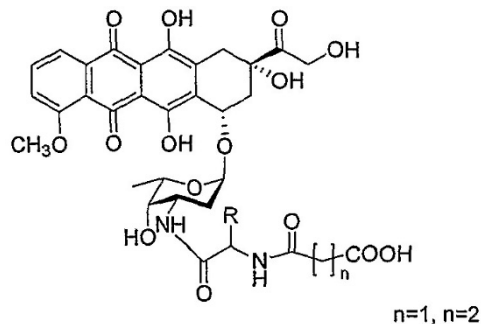


Estrategia 2: (espaciador de aminoácido)



Estrategia 3

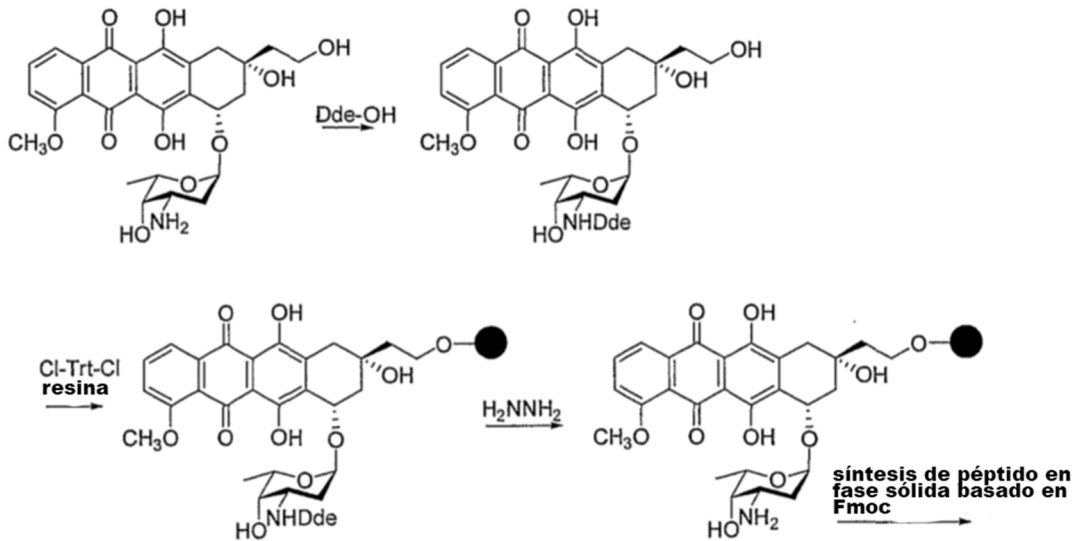
De una manera análoga a la descrita en las Estrategias 1 y 2, la amina del azúcar de la doxorubicina puede ser acilada por un aminoácido, que en la desprotección se puede derivar más mediante un espaciador de succinato (o de otro modo) para producir un derivado que puede estar unido al extremo N del péptido.



2) Enlace de la doxorubicina al extremo C

La protección del grupo amina de la doxorubicina con Dde (un grupo protector usado comúnmente en la química de péptidos y por nuestro grupo) permitiría la inmovilización del agente en una resina basada en tritilo (o de otra manera). La eliminación posterior del grupo Dde eliminaría la máscara de la amina, permitiendo construir una secuencia peptídica desde este punto (es decir, a través del extremo C). La síntesis en fase sólida basada en Fmoc estándar produciría una secuencia peptídica.

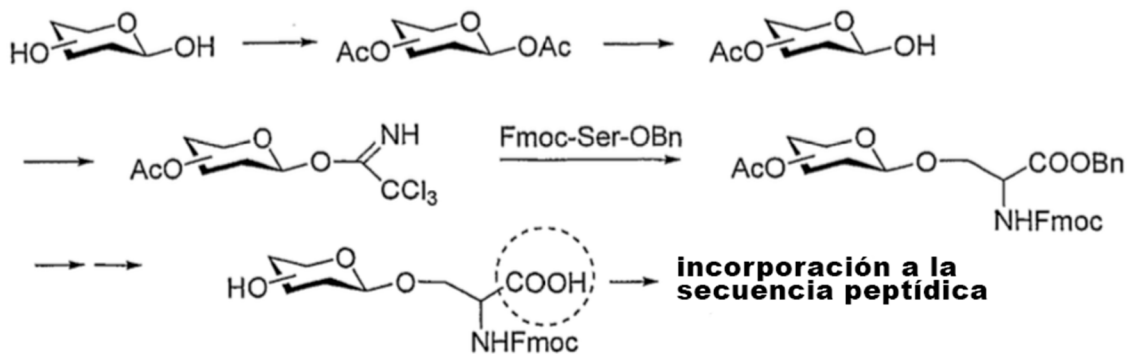
Una VDA derivatizada apropiadamente podría entonces conjugarse a través del extremo N. La escisión y purificación de la resina sería como se describió anteriormente



Incorporación de aminoácidos glicosilados.

Los aminoácidos con funcionalidad de cadena lateral apropiada (por ejemplo, serina, tirosina, treonina) se pueden glicosilar (con mono-, di- o trisacáridos) para producir péptidos con mayor solubilidad acuosa. Tal resto derivado de carbohidrato podría usarse en lugar de serina, por ejemplo (ver esquema a continuación).

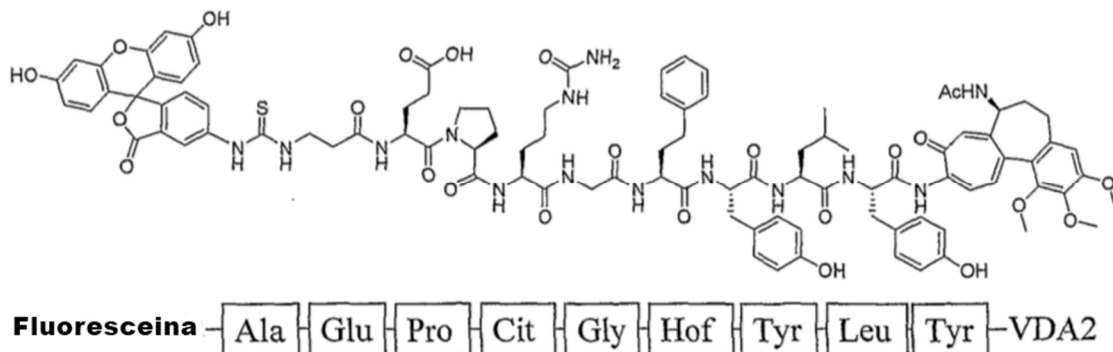
5



Resultados

1) Profármaco activado por MMP - Pan MMP dirigido

Estructura



(Hof = homofenilalanina; Cit = citrulina; VDA-2 = azademetilcolchicina)

a) Profármaco-1 se ha analizado utilizando plasma de ratón normal, homogenado de hígado de ratón normal y homogenado de modelo de tumor humano experimental (xenoinjerto HT1080; se sabe que expresa la mayoría de las MMP) ex vivo. La escisión y el metabolismo del profármaco se detectaron utilizando LC/MS/MS.

5 a. Profármaco -1 fue estable en plasma e hígado, lo que respalda la estabilidad sistémica de estos productos terapéuticos (Figura 1).

b. El profármaco-1 se metabolizó en el homogeneizado de tumores, apoyando la activación de estos productos terapéuticos en tumores que expresan MMP (Figura 1).

10 b) El profármaco-1 se escinde rápidamente en la glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) por MMP-2 recombinante, MMP-9, MMP-10 y MMP-14 al menos. Demostrado por LC/MS/MS y espectrometría de masas (datos no mostrados)

c) Profármaco-1 se administró in vivo a través de la vía intraperitoneal a ratones portadores del modelo de tumor subcutáneo HT1080 (expresión de la mayoría de las MMP). Se recogieron plasma, tejidos y tumores a intervalos regulares después de la administración. Los niveles de profármaco y VDA2 se evaluaron por LC/MS/MS.

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

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

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

d. VDA2 fue detectable a niveles bajos en tejidos normales después de la administración del profármaco-1 (Figura 3)

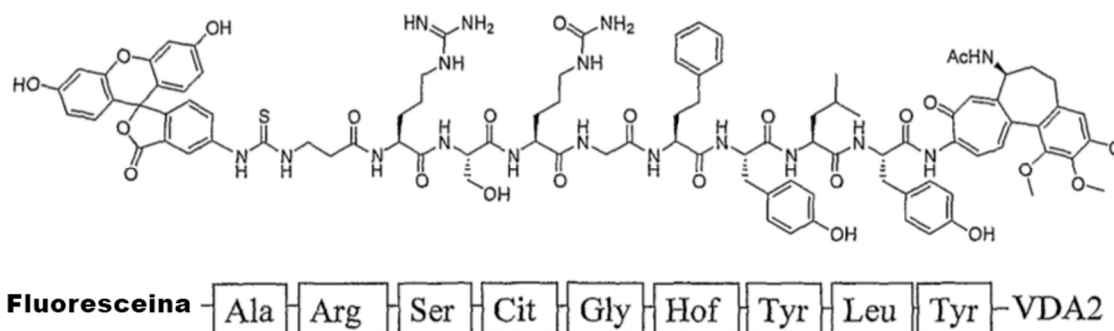
e. Los niveles de VDA2 se detectaron a niveles altos en el tejido tumoral después de la administración del profármaco-1 (Figura 3)

20 f. VDA2 aún era detectable a altos niveles en el tumor y no era detectable en tejidos normales después de 24 horas después de la administración de la dosis con profármaco-1 (Figura 3)

2) profármaco activado por MMP (ICT-2588)

- orientado a la estructura de las MMP de tipo membrana (MT-MMP):

Estructura



25 d) El Compuesto 1 se modificó para cambiar la orientación de MMP del compuesto de ser pan-MMP a MTMMP selectivo (Profármaco-2)

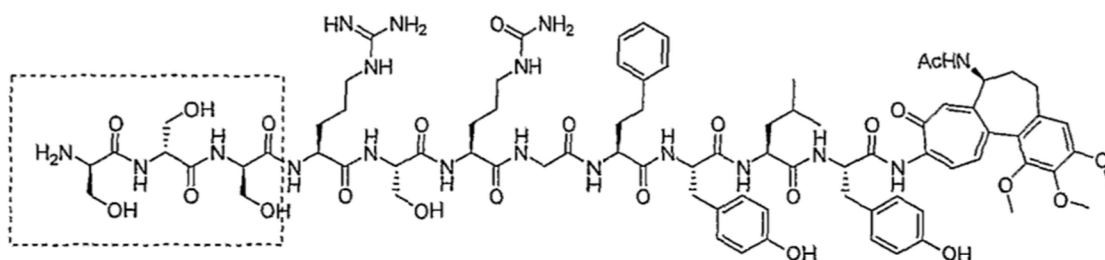
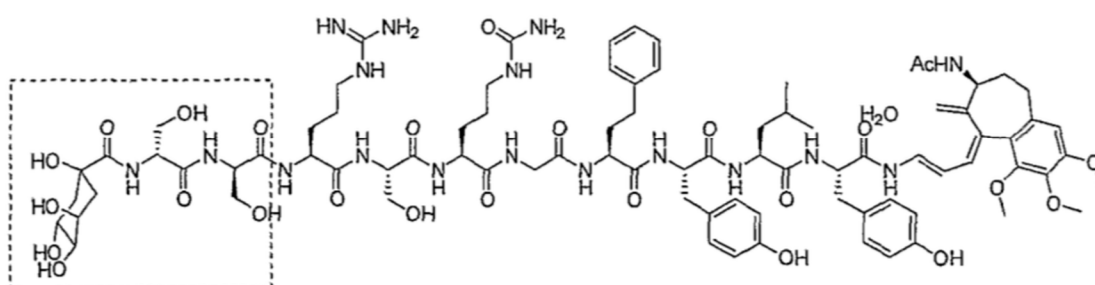
a. La arginina se incorporó en lugar del ácido glutámico en la posición P4

b. Se eliminó la prolina y se reemplazó con Serina en la posición P3.

30 e) Profármaco-2 ha sido evaluado utilizando plasma de ratón normal, homogenado de hígado de ratón normal y homogenados de modelos de tumores humanos experimentales que demuestran alta expresión y actividad de MT1-

MMP (MMP-14) (HT1080) y baja expresión y actividad de MT1-MMP (MCF-7) ex vivo. La disgregación y el metabolismo del profármaco-2 se detectaron utilizando LC/MS/MS.

- a. Profármaco-2 se mantuvo intacto en plasma, lo que respalda la estabilidad sistémica de este agente terapéutico.
- b. Profármaco-2 se mantuvo estable en homogenados de hígado murino
- 5 c. El profármaco-2 se metabolizó rápidamente en el homogeneizado de tumores que expresaba niveles altos de MT-MMP (HT1080) en relación con el homogeneizado de tumores que expresaba niveles bajos de MT-MMP (MCF7) (Figura 4).
- d. Estos datos apoyan la estabilidad sistémica de este profármaco y la selectividad de activación por MT-MMP.
- f) El profármaco-2 se escinde de manera diferencial por las MMP como se muestra por LC/MS/MS y espectrometría de masas (datos no mostrados):
- 10 a. Se escindió rápidamente en la glicina-homofenilalanina (Gly-Hof) por MMP-14 recombinante.
- b. Se escinden lentamente en la homofenilalanina-tirosina (Hof-Tyr) por MMP-2 recombinante. Demostrando diferente escisión a la observada con profármaco-1.
- c. El profármaco-2 no se escinde por la MMP-9 recombinante, en contraste con el profármaco-1
- 15 d. Estos datos apoyan la división selectiva de MMP de profármaco-2
- g) Profármaco-2 se administró in vivo por vía intraperitoneal a ratones portadores de un modelo de tumor subcutáneo HT1080 (MT1-MMP positivo). Se recogieron plasma, tejidos y tumores a intervalos regulares después de la dosificación. Los niveles de profármaco-2 y VDA2 se evaluaron por LC/MS/MS.
- a. Profármaco-2 se acumuló y se detectó en todos los tejidos analizados (Figura 5).
- 20 b. Los niveles más altos de profármaco-2 se observaron en el tumor (Figura 5).
- c. El hígado fue representativo de todos los tejidos normales analizados (Figura 5)
- d. VDA2 fue indetectable en plasma luego de la administración del profármaco-2 (Figura 6)
- e. Se detectaron altas concentraciones de VDA2 en el tumor después de la administración del profármaco-2 (Figura 6)
- 25 f. Los niveles de VDA2 en el tumor fueron 10 veces más altos que los detectados en tejidos normales después de la administración de profármaco-2 (Figura 6)
- g. Los niveles altos de profármaco-2 y VDA2 aún eran detectables en el tumor 48 horas después de la administración.
3. Conjugados sintetizados (basados en el profármaco MT-MMP) que han resultado infructuosos. Los profármacos, incluidos los siguientes extremos finales, no fueron suficientemente estables en plasma y/o hígado.
- 30 (1) 3 x D-serina
- (2) ácido quínico + 2 x D-serina

NH₂-D-Ser-D-Ser-D-Ser-Arg-Ser-Cit-Gly-HoPhe-Tyr-Leu-Tyr-**cabeza activa**Quinic-D-Ser-D-Ser-Arg-Ser-Cit-Gly-HoPhe-Tyr-Leu-Tyr-**cabeza activa**

Ejemplo 2

Estudio antitumoral de respuesta a la dosis

Materiales y métodos

5 Síntesis de ICT-2588 - ver Ejemplo 1

10 Síntesis de ICT-2552: Se añadió solución de amoníaco (35%, 15 ml) a colchicina (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto crudo se lavó con KHSO₄ (1 M, ac.), Se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (elución en gradiente: CH₂Cl₂/metanol 95:5 a 10:1) para dar ICT-2552 como un sólido amarillo (427 mg, 1.11 mmol, 59%).

15 δ H (600 MHz, CDCl₃), 7.99 (1 H, amplio s, NH), 7.56 (1 H, d, J 2.1, C8-H), 7.32 (1H, d, J 10.7, C11- H), 6.88 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 6.52 (1 H, s, C4-H), 6.03 (2 H, amplio s, NH₂), 4.68 (1 H, ddd, J 12.6, 6.5 y 6.5, C7- H), 3.93 (3 H, s, OCH₃), 3.88 (3 H, s, OCH₃), 3.60 (3 H, s, OCH₃), 2.47 (1 H, dd, J 13.4 y 6.2, C5-CH₂), 2.35 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 y 6.9, C5-CH₂), 2.29-2.23 (1 H, m, C6-CH₂), 1.98 (3 H, s, CH₃), 1.90-1.88 (1 H, m, C6-CH₂); ES m/z (%) 385 [M+H]⁺ (100).

Se administraron ICT-2552 e ICT-2588 ("profármaco") como una dosis única por vía intraperitoneal a ratones Balb/C que portan xenoinjertos de HT1080 subcutáneos. Cada uno de los nueve grupos de dosificación comprendía 8 ratones. Los efectos antitumorales de los compuestos se evaluaron mediante la determinación del volumen del tumor y se determinó la existencia de toxicidad fuera del objetivo mediante la monitorización del peso corporal del ratón.

20 Los grupos de dosificación evaluaron ICT-2588 (profármaco) en relación con la dosis molar equivalente de ICT-2552 (cabeza activa), y fueron:

- 10% DMSO/aceite (control de solvente)

- ICT-2588 a 37.5 mg/kg; 50.0 mg/kg; 62.5 mg/kg; 75.0 mg/kg

- ICT-2552 a 7.5 mg/kg; 10.0 mg/kg; 12.5 mg/kg; 15 mg/kg

Resultados

No se observó ninguna pérdida significativa en el peso corporal a lo largo del estudio (Fig. 7)

5 El peso de todos los ratones estaba dentro de la pérdida tolerada del 15% del peso corporal, por lo tanto, los compuestos no están clasificados como tóxicos para todo el sistema corporal.

Ejemplo 3

Estudio de respuesta tumoral

Resultados

10 Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 8 a 10 y en las siguientes Tablas. Se observaron respuestas tumorales en todos los niveles de dosis probados de ICT-2522 e ICT-2588.

Tabla 1: Eficacia antitumoral de los compuestos en relación con el grupo de control no tratado.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo medio a RTV2 (días)	Tiempo medio RTV2 (días)	Retraso en el crecimiento (días)	Significancia ^a	Pérdida de peso máxima % (día) ^b
Control	-	2.3	2.2	-	-	5 (6)
ICT-2588	37.5	4.4	4.2	2.0	p<0.01	3 (3)
ICT-2588	50.0	5.5	6.0	3.8	p<0.01	5 (3)
ICT-2588	62.5 ^c	7.7	7.8	5.6	p<0.01	4 (3)
ICT-2588	75.0	6.8	6.6	4.4	p<0.01	5 (3)
ICT-2552	7.5	4.0	3.8	1.6	p<0.01	3(4)
ICT-2552	10.0	4.4	4.2	2.0	p<0.01	6 (6)
ICT-2552	12.5	4.5	4.7	2.5	p<0.01	6 (1)
ICT-2552	15.0	4.1	4.1	1.9	p<0.01	5 (1)

^aEstadísticas trabajadas con base en el tiempo que le toma al tumor duplicarse en tamaño desde el día 0.

^bPérdida de peso máxima dentro de niveles aceptables del 15%.

^cUn animal mostró remisión completa del tumor (medición final día 21)

Se observó un retraso significativo en el crecimiento del tumor en todas las dosis evaluadas de ICT-2552 (ojiva) y ICT-2588 (profármaco).

15 Se observó una relación entre la dosis de compuesto y el grado de retraso del crecimiento del tumor con ambos compuestos. Los efectos son mayores con ICT-2588 (profármaco).

Un animal demostró una remisión completa del tumor con ICT-2588 en una dosis de 62.5 mg/kg.

Tabla 2: Comparación de la eficacia antitumoral entre dosis de ICT-2588 (profármaco) e ICT-2552 (cabeza activa) administrada a la dosis equivalente molar

Dosis de ICT-	Dosis de ICT-	Retraso en el crecimiento con profármaco (Días)	Retraso en el crecimiento con cabeza activa (Días)	Significancia del diferencial entre dosis con equimolar de ICT-2588 e ICT-2552 ^a
2588 (mg/kg)	2552 (mg/kg)			
37.5	7.5	2.0	1.6	p>0.05
50.0	10.0	3.8	2.0	p<0.05
62.5 ^c	12.5	5.6	2.5	p<0.05
75.0	15.0	4.4	1.9	p<0.01

^aEstadísticas trabajadas con base en el tiempo que le toma al tumor duplicarse en tamaño desde el día 0.

^cUn animal mostró remisión completa del tumor (medición final día 21)

ICT-2588 (profármaco) indujo una respuesta antitumoral significativamente mayor que el ICT-2522 (cabeza activa) cuando se administró a dosis equimolares

Ejemplo 4

Modificaciones a ICT-2588

- 5 i) Mejora de la solubilidad del profármaco mediante la introducción de cadenas laterales de aminoácidos fosforilados

Para aumentar la solubilidad del profármaco, se introducen cadenas laterales de aminoácido fosforiladas en la secuencia peptídica de ICT-2588 (hidrolizable por fosfatasa plasmáticas). Los aminoácidos derivados de fosfato están disponibles comercialmente, como restos protegidos con bencilo, y se incorporan en péptidos utilizando nuestra metodología sintética. Estamos sintetizando y evaluando la modificación de la fosforilación de dos sitios dentro de la secuencia peptídica; P2' (Tyr), P3 (Ser) y P2' y P3 (ver Fig. 11). Además, estamos abordando el efecto de la fosforilación de P2' (Tyr) sobre la activación del profármaco por MT-MMP (escindir en P1-P1') y MMP-2 (escindir en P1'-P2') para abordar el potencial de incrementar adicionalmente la selectividad de MMP.

- ii) Mejora de la solubilidad a través de la modificación del grupo de tope final de profármaco

15 Estamos explorando la sustitución del grupo de fluoresceína con un grupo más hidrófilo (ver figura 11) como profármacos alternativos con solubilidad mejorada. Nuestro objetivo es mejorar la solubilidad del profármaco al tiempo que conserva la selectividad de MT-MMP, la activación selectiva del tumor y la actividad antitumoral. Los profármacos que incorporan estos topos finales alternativos a ICT2588 se están evaluando en términos de solubilidad del compuesto en relación con el profármaco padre in vitro, la estabilidad y activación del profármaco en el modelo de tumor HT1080, el plasma de ratón y el homogeneizado de hígado ex vivo, y la retención y la potencial mejora de la selectividad de MT-MMP.

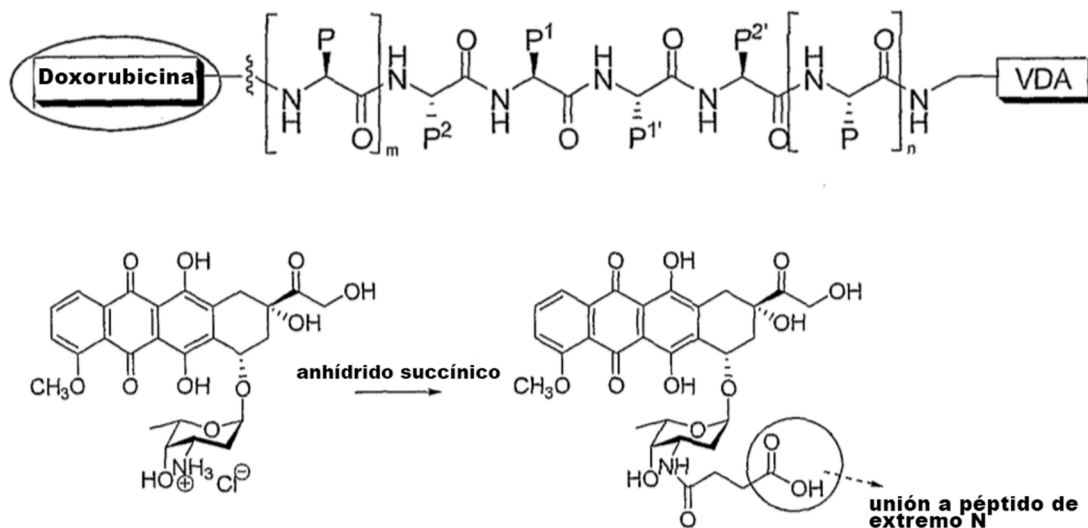
- iii) Modificación del sitio P2' dentro de profármaco

25 Se están evaluando los efectos de la modificación del sitio P2' (Tyr) del profármaco con referencia a la estabilidad del tejido, la escisión del tumor y la activación de MMP ex vivo. La atención se centra en el sitio P2' del profármaco, ya que hemos demostrado la escisión por otros MMP no-MT en los sitios P1'-P2' y P2'-P3'. Estamos utilizando variantes de profármacos que incorporan los principales tipos de cadena lateral de aminoácidos (Ala, Asp, Asn, Leu, Ser, Pro).

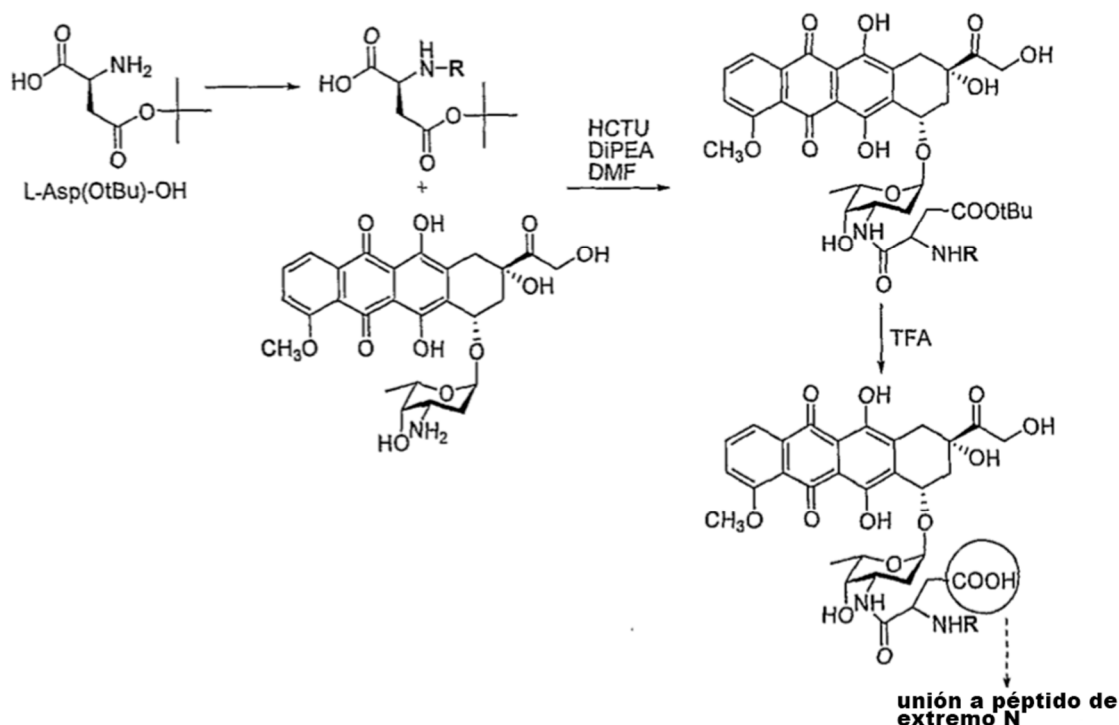
- iv) Desarrollo de profármaco de doble cabeza que incorpora doxorubicina.

30 Después del tratamiento con ICT2588, se observó un borde delgado y viable de células tumorales en la periferia del tumor. La comprensión actual de la vascularización tumoral indica que el borde viable se mantiene por la vasculatura de los tejidos normales que lo rodean inmediatamente. Una consecuencia de esto es que la administración de un profármaco liberador de VDA en combinación con quimioterapia estándar debería aumentar aún más el efecto antitumoral observado. Estamos desarrollando un profármaco de dos cabezas que contiene nuestra cabeza activa de

azademetilcolchicina (ICT2552) y una cabeza activa de doxorubicina (que reemplaza el tope de extremo) (ver más abajo). Estamos evaluando este profármaco de doble cabeza en términos de estabilidad y activación de profármacos en el modelo de tumor HT1080, plasma de ratón y homogeneizado de hígado ex vivo.



- 5 Se requiere la derivación en la amina ya que la unión al péptido se realizará a través del extremo N. La estrategia actual es acilar con anhídrido succínico, produciendo un derivado de succinato que lleva un ácido carboxílico libre que puede unirse al péptido a través de un enlace amida. Una estrategia alternativa a evaluar es usar la cadena lateral de ácido aspártico con un grupo bloqueador de alquilo/arilo R.



- 10 La Tabla 3 es un resumen de los datos de estabilidad para una serie de moléculas con cambios en la posición de P2'. Las vidas medias son el promedio tomado de cuatro experimentos independientes. El hígado representa homogeneizado de hígado murino y el tumor representa HT1080

ES 2 714 590 T3

	P2'AA	Hígado	Tumor
		t1/2 (min)	t1/2 (min)
ICT2588	Tyr	149	33
ICT3055	Asp	67	7
ICT3053	Ala	76	17
ICT3054	Ser	66	9
ICT3078	Asn	76	11
ICT3097	Pro	110	24
ICT3080	Leu	134	48

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, que comprende un agente perturbador vascular (VDA) asociado con un péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica de metaloproteínasa de matriz (MMP), en el que la VDA es un agente de unión anticancerígeno y tubulina, y el sitio de escisión proteolítica de MMP comprende una secuencia de aminoácidos -Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-P2'-Leu- en donde P2' es un aminoácido y no es tirosina.
 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula (I)
- $$X-Y \quad (I)$$
- donde
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que VDA interactúa con tubulina en el sitio de unión a la colchicina en la tubulina y se selecciona entre azademetilcolchicina, colchicina, azacolquicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina, N-acetilcolchicinol-O-fosfato, colchicinoides, combrestatinas, fenstatina, podofilotoxinas, esteganacinas, anfetinilo, estilbenos o flavonoides,
 - opcionalmente, en el que el VDA se selecciona entre azademetilcolchicina, colchicina, azacolchicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina y
 - preferiblemente, en el que el VDA es azademetilcolchicina.
 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde el VDA comparte un sitio de unión común en tubulina con los alcaloides de Catarantus (Vinca), opcionalmente en donde el VDA se selecciona de vincristina, vinblastina, vinflunina, maitansinoides, fomopsin A, rizoxin, auristatina, análogos de auristatina o dolastatina.
 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el VDA promueve la formación de microtúbulos estables de una manera similar a paclitaxel.
 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sitio de escisión proteolítica de MMP es una secuencia peptídica de entre siete y diez aminoácidos.
 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que P2' se selecciona de
- a) aminoácidos polares, sin cambios y/o aminoácidos básicos, o
 - b) el grupo que consiste en Asp, Ala, Asn, Pro, Leu y Arg.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que P2' es un aminoácido metilado.
 9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un agente anticancerígeno adicional está ligado al péptido que comprende un sitio de escisión proteolítica MT-MMP.
 10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el agente anticancerígeno se selecciona del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente citotóxico, un agente antiproliferativo, 5-fluorouracilo, antraciclina, doxorubicina, alcaloide de la vinca, taxano, un nucleótido citotóxico, una biotoxina, un agente radioterapéutico, un agente hormonal, colchicina, azademetilcolchicina, N-metil desacetilcolchicina o desacetilcolchicina.
 11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente anticancerígeno es doxorubicina.
 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un grupo tope en el péptido que comprende el sitio de escisión proteolítica de MMP que evita la degradación no específica del péptido.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que el compuesto es de fórmula (II)



en donde c es un grupo tope.

5 14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en el que c se selecciona del grupo que consiste en compuestos alifáticos, aromáticos, policíclicos, carbohidratos y aminoácidos, opcionalmente en el que c es un grupo hidrófilo.

15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13 o 14 en donde c está representado por la fórmula (c)_n en donde n es un número entero entre 1 y 5, opcionalmente en donde c es un aminoácido no natural y n es 3.

10 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que el compuesto es de fórmula (III)



en donde a es un enlazador asociado directa o indirectamente con X.

17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el enlazador es un solo aminoácido o secuencia de aminoácidos.

15 18. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el compuesto es de fórmula (IV)



en donde c es como se define en la reivindicación 13.

19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el compuesto es de fórmula (V)



20 en donde b es un grupo espaciador directa o indirectamente ligado a Y.

20. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el espaciador se selecciona del grupo que consiste en un solo aminoácido, una secuencia de aminoácidos y un grupo succinilo.

21. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el compuesto es de fórmula (VI)



25 en donde b es un grupo espaciador directa o indirectamente ligado a Y.

22. Un compuesto como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 21, en el que el compuesto es de fórmula (VII)



en donde Z es un agente anticancerígeno.

30 23. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 22, en el que Z se selecciona del grupo que consiste en un agente de perturbación vascular, un antimetabolito, un agente citotóxico, una biotoxina, un agente radioterapéutico y un agente hormonal, y preferiblemente en la que Z es el agente citotóxico doxorubicina.

24. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en el que X se selecciona de azademetilcolchicina, colchicina, azacolchicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina.

35 25. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 22, en el que X y Z se seleccionan de azademetilcolchicina, colchicina, azacolchicina, N-metil desacetilcolchicina, desacetilcolchicina.

26. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en medicina.
27. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 y al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adicional.
- 5 28. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 y otro agente terapéutico opcionalmente en el que el otro agente terapéutico se selecciona de entre cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, metotrexato, 5-fluorouracilo, citarabina, mercaptopurina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, vinblastina, vincristina, dactinomicina C, taxol, L-asparaginasa, G-CSF, etopósido, colchicina, mesilato de deferoxamina o camptotecina.
- 10 29. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, para uso en el tratamiento del cáncer.
30. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio.
- 15 31. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, para uso en el tratamiento de insuficiencia cardíaca.
32. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25 o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, para uso en el tratamiento de una herida.

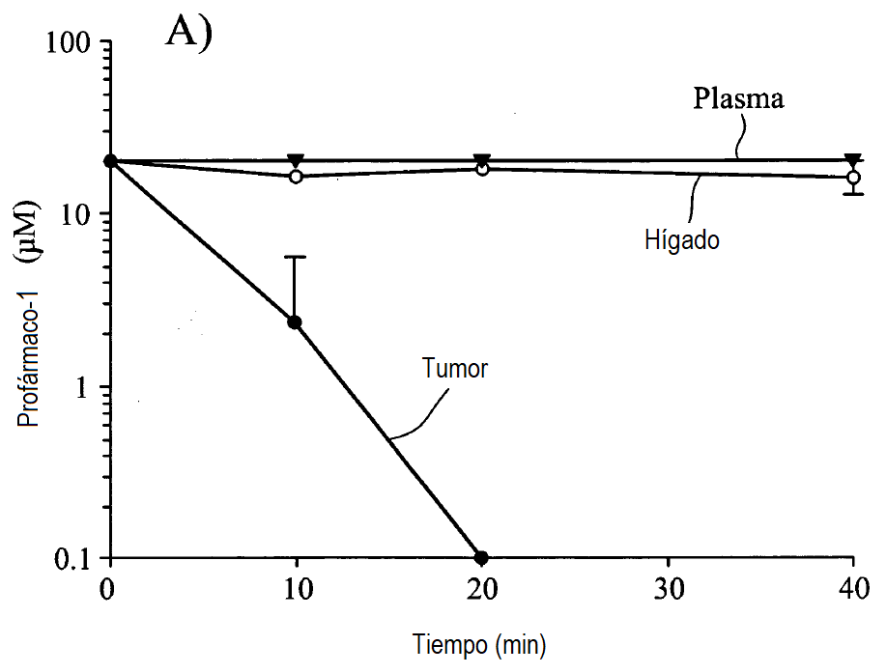


FIG. 1

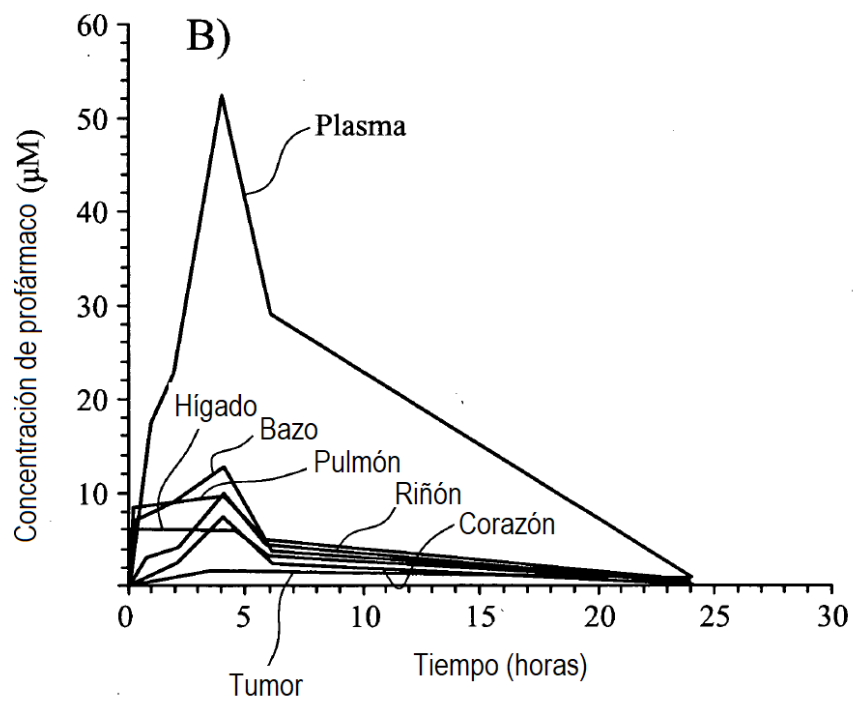


FIG. 2

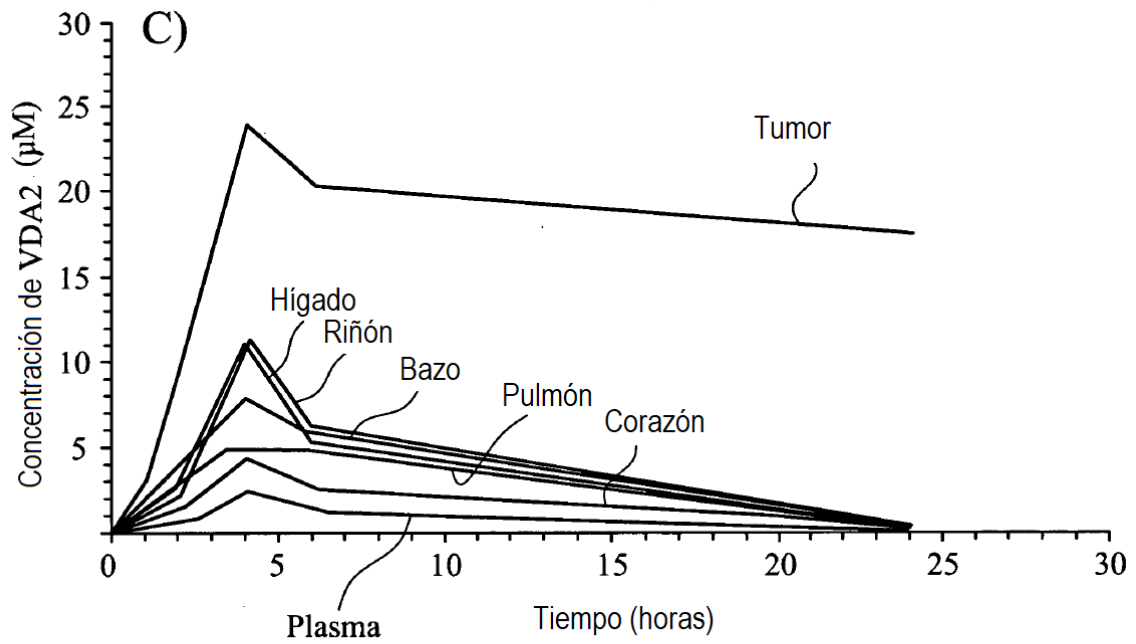


FIG. 3

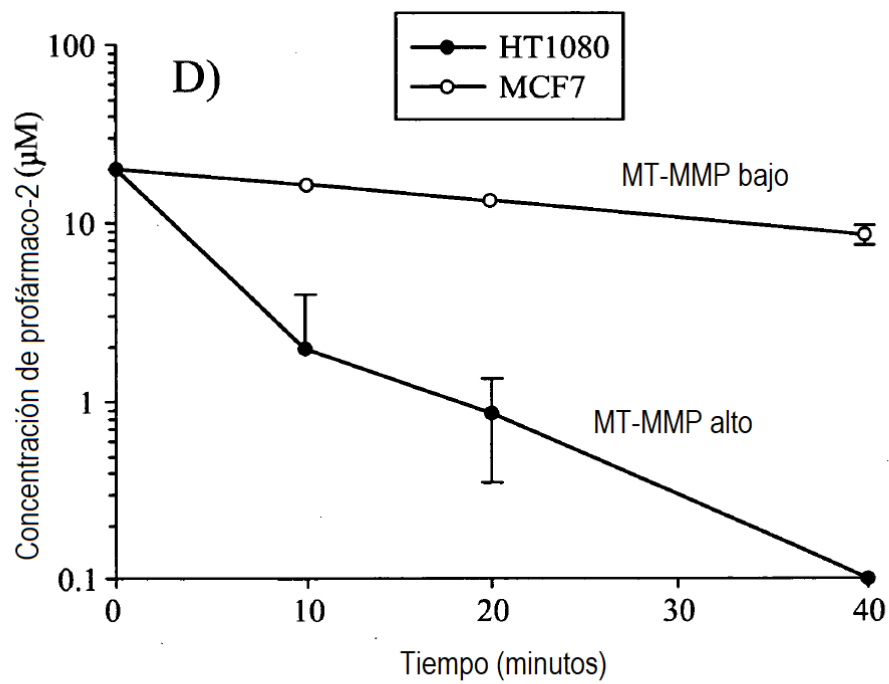


FIG. 4

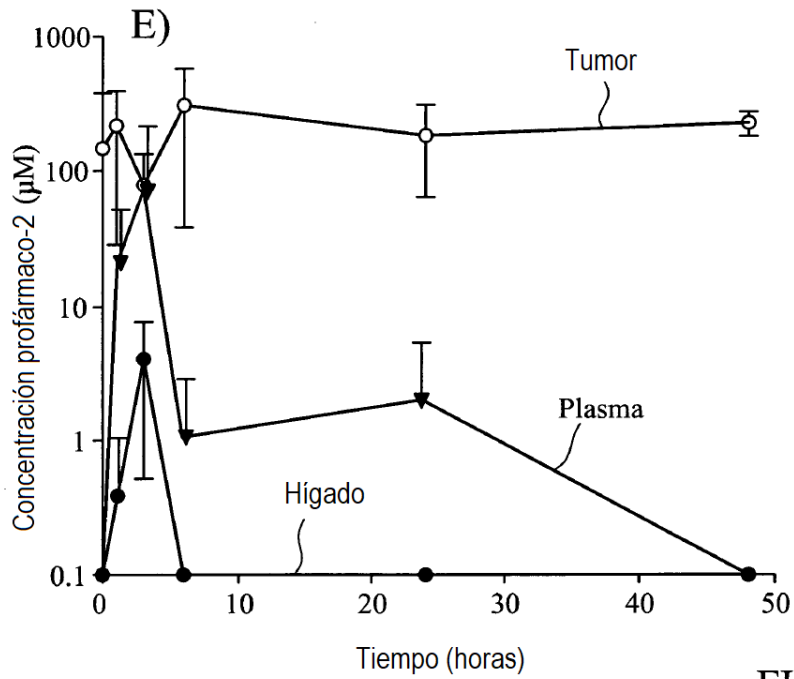


FIG. 5

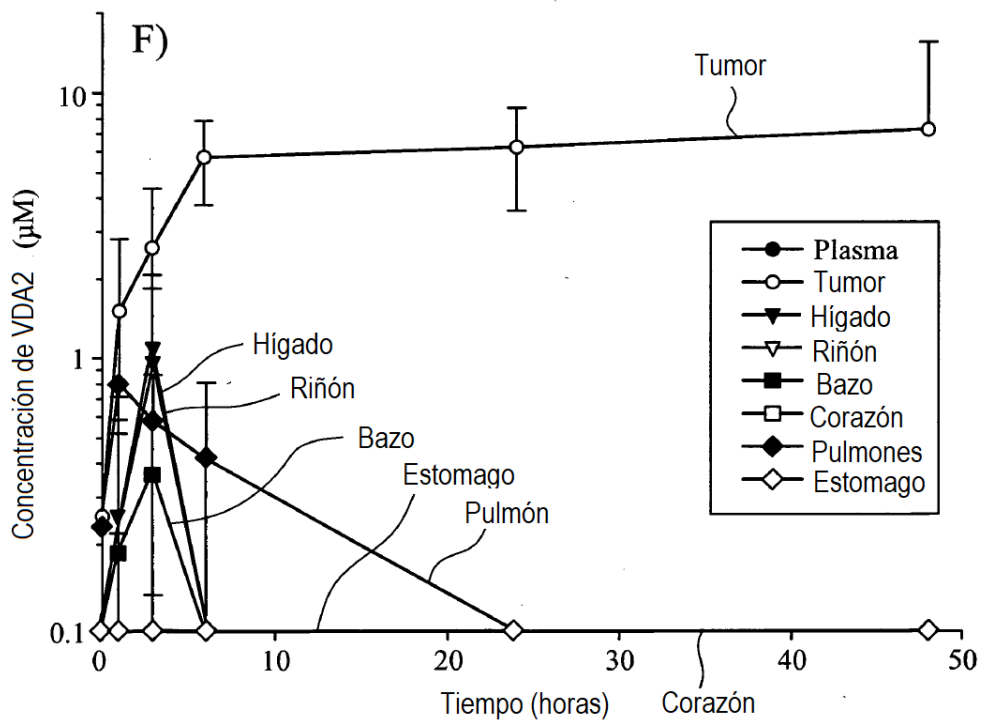


FIG. 6

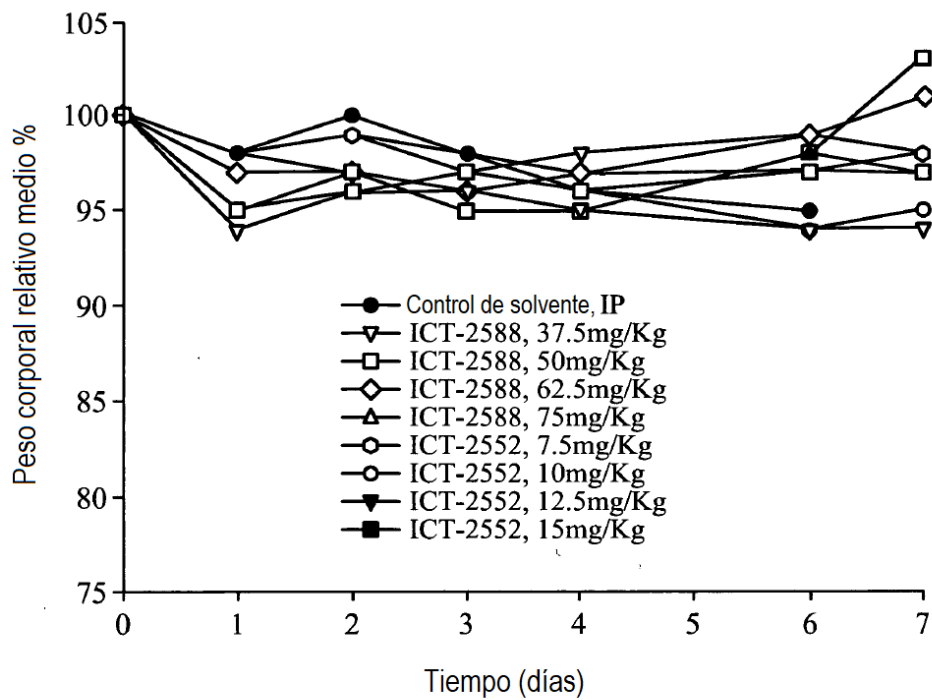


FIG. 7

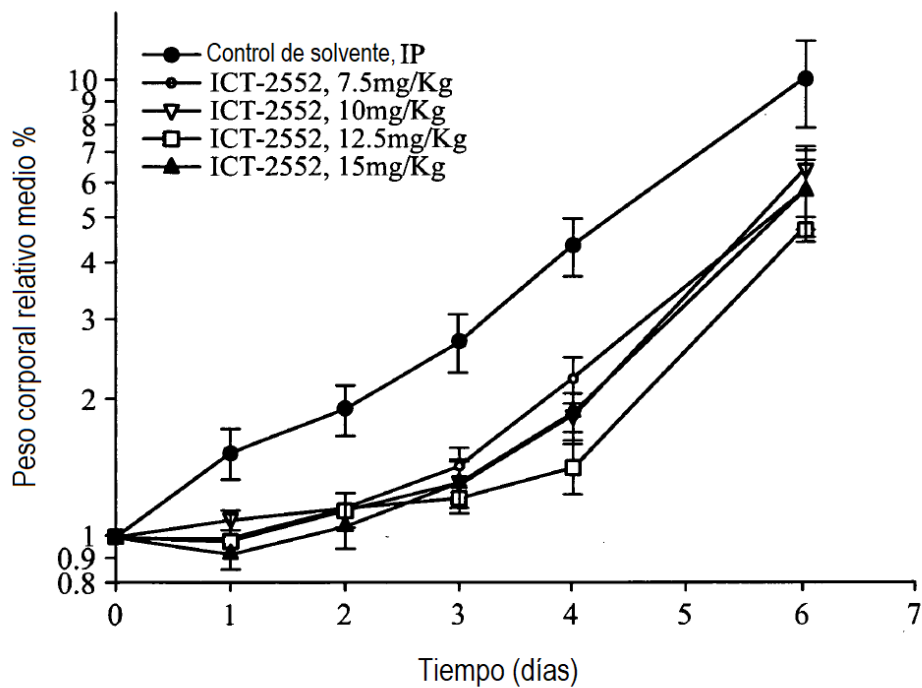


FIG. 8

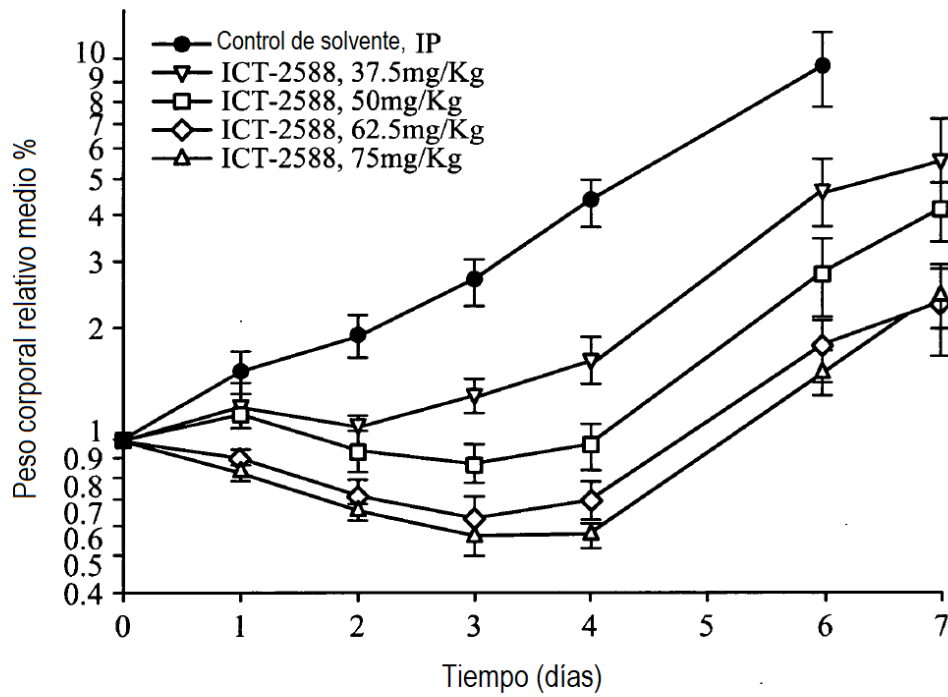


FIG. 9

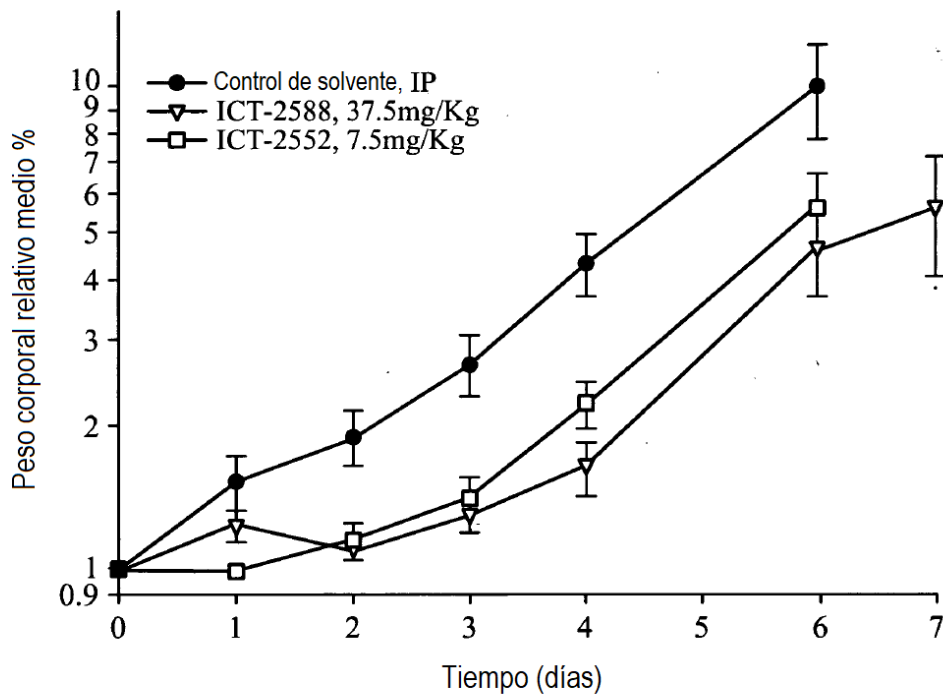


FIG. 10(a)

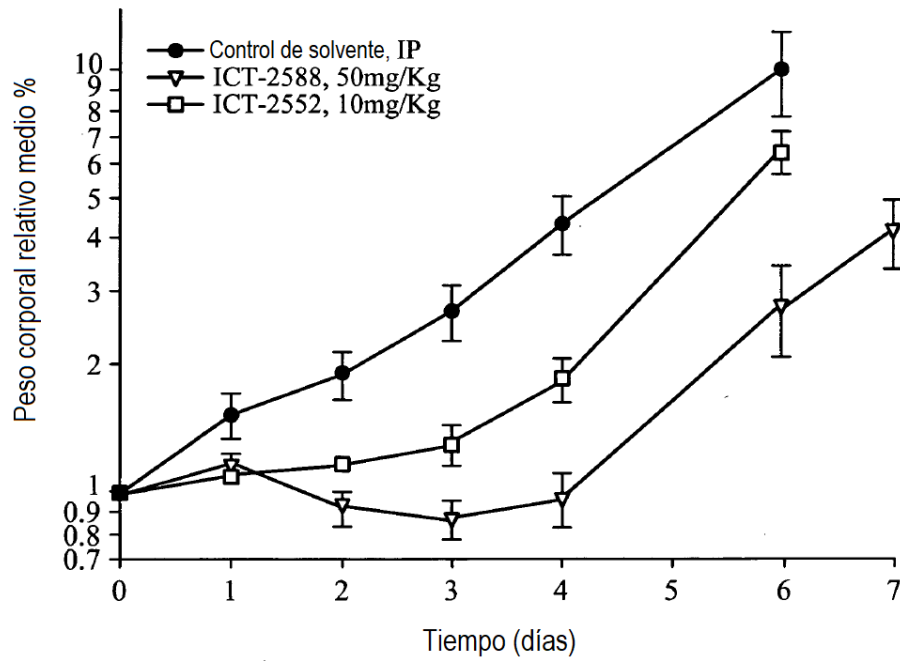


FIG. 10(b)

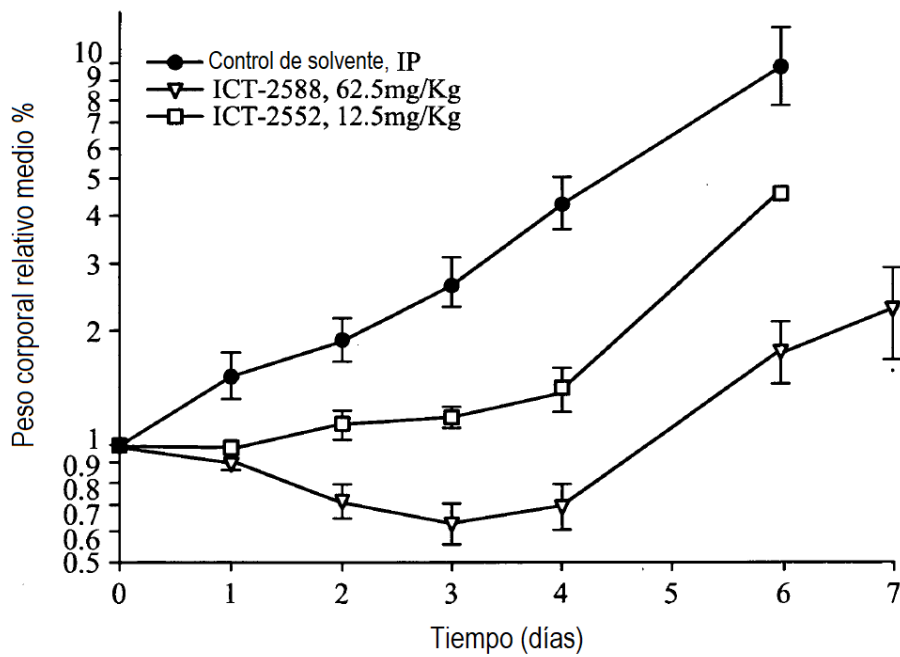


FIG. 10(c)

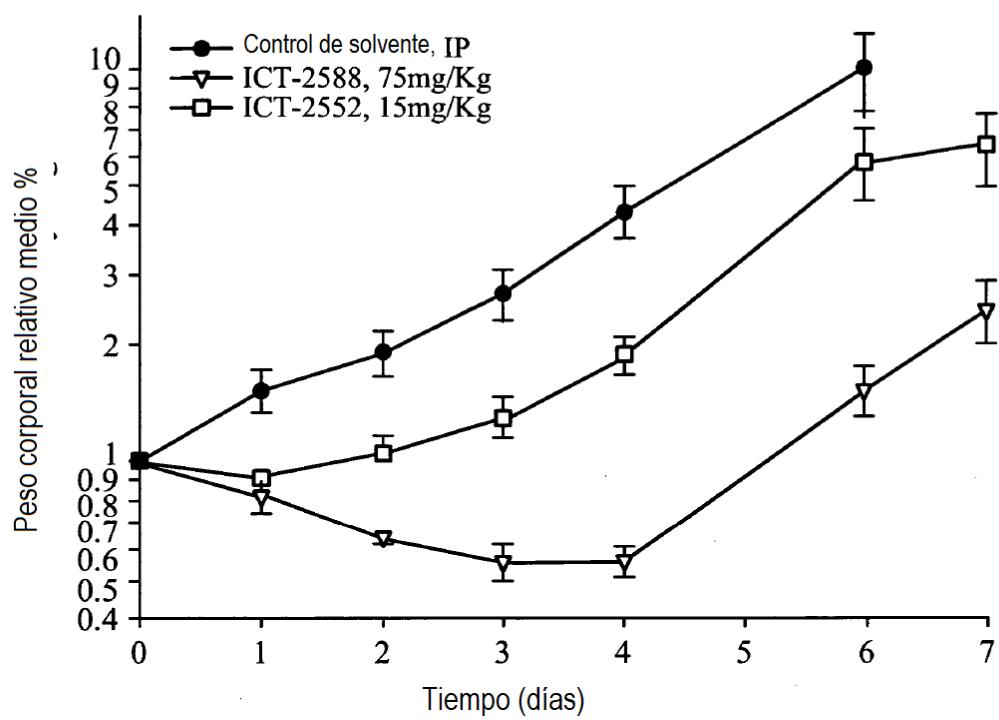


FIG. 10(d)

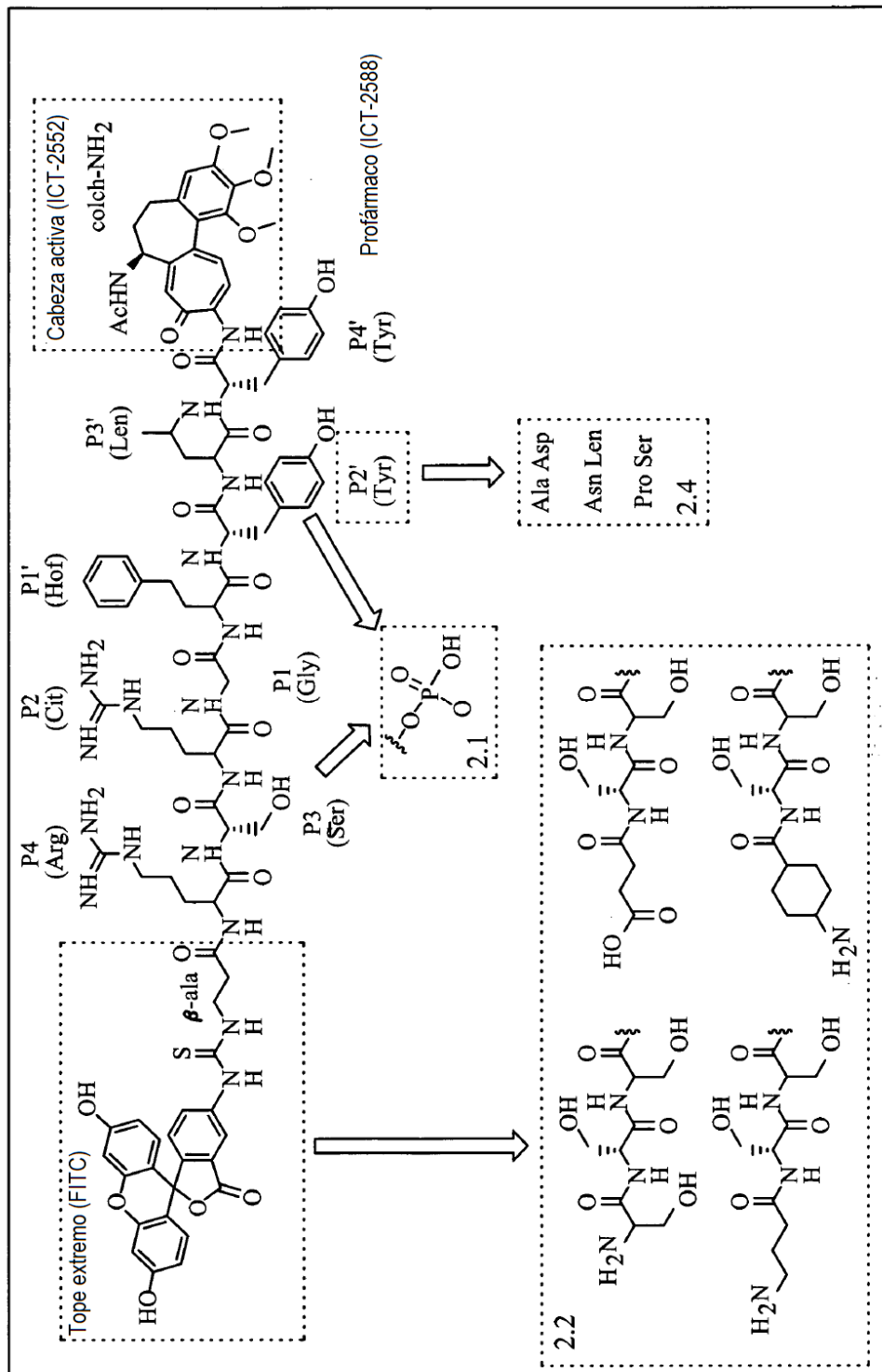


FIG. 11

ICT3053 Ala

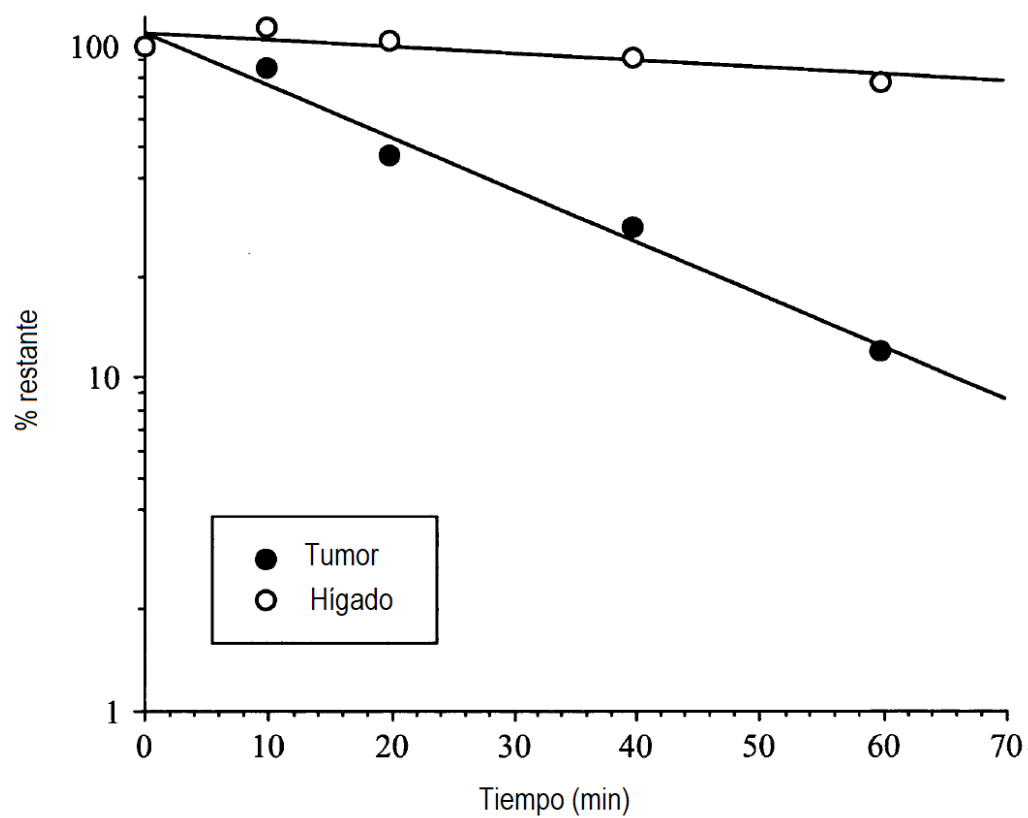


FIG. 12

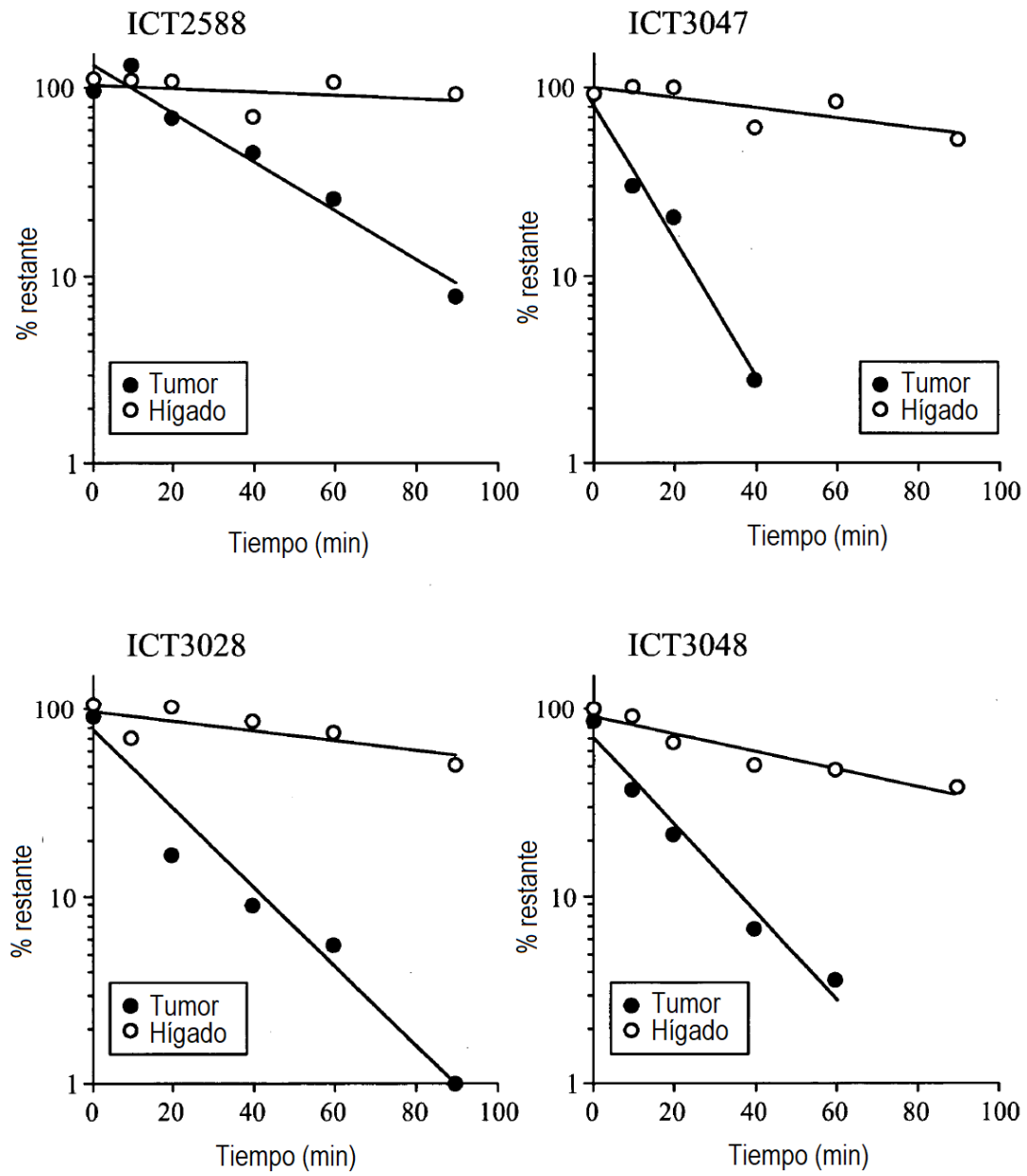


FIG. 13