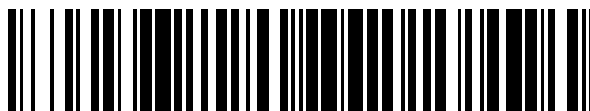


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 999**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)		
A61K 31/395	(2006.01)		
A61K 31/4745	(2006.01)		
A61K 31/475	(2006.01)		
A61K 31/519	(2006.01)		
A61K 31/537	(2006.01)		
A61K 31/704	(2006.01)		
A61K 47/65	(2007.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/EP2013/078034**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102312**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13820778 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2938360**

54 Título: **Profármacos mínimamente tóxicos**

30 Prioridad:

28.12.2012 US 201261746621 P

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**COBIORES NV (100.0%)
Herestraat 49, box 913
3000 Leuven, BE**

72 Inventor/es:

TROUET, ANDRÉ

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 999 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 mínimamente tóxicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los profármacos de oligopéptidos destinados al tratamiento del cáncer. La selectividad de estos profármacos requiere la presencia de un resto (oligo)peptídico y/o un grupo de bloqueo protector para asegurar la estabilidad del profármaco en la sangre. Además, en particular, se refiere al resto oligopeptídico ALGP ejemplar y a los profármacos que lo comprenden. En particular, también se refiere al grupo de bloqueo fosfonoacetilo y a los profármacos que comprenden este grupo de bloqueo.

Antecedentes de la invención

10 La terapia del cáncer sigue siendo uno de los principales desafíos de la medicina en la actualidad. Solo una estrategia terapéutica combinada permitirá dominar este problema. Esto implicará cirugía, quimioterapia quimiotóxica clásica, fármacos moleculares dirigidos e inmunoterapia.

15 El principal problema en el uso de fármacos quimiotóxicos es su baja selectividad para las células cancerosas, lo que resulta en efectos secundarios tóxicos potencialmente mortales y que limitan la dosis. La toxicidad aguda más común es la mielotoxicidad que da como resultado una leucopenia y trombocitopenia graves. Algunos de los fármacos de uso común también tienen una toxicidad más específica. La doxorubicina (Dox), un fármaco antraciclina, es un 17 de dicho fármaco quimiotóxico que induce, además de la mielotoxicidad grave, una cardiotoxicidad grave. Estas toxicidades restringen su uso por encima de una dosis acumulativa de 500 mg/m².

20 Las estrategias utilizadas para aumentar la especificidad tumoral de un fármaco son la conjugación con (i) una molécula que reconoce el tumor (p. ej., ligando receptor; véase, p. ej., Safavy y col. 1999 - J Med Chem 42,4919-4924) o con (ii) un péptido que se escinde preferentemente en la vecindad inmediata de las células tumorales por proteasas secretadas o producidas preferentemente por las células tumorales.

25 Se han desarrollado profármacos oligopeptídicos específicos de tumor, como los profármacos de doxorubicina. A diferencia de estudios anteriores, estos profármacos peptídicos fueron diseñados para ser impermeables a las membranas celulares, para permanecer estables en la sangre mientras se escinden en el fármaco activo por las peptidasas liberadas en el espacio extracelular de los tumores sólidos. Estas peptidasas activadoras no son necesariamente específicas del tumor, pero pueden aumentar la selectividad del fármaco en la medida en que estos péptidos se sobrecrecen en el espacio extracelular de los tumores sólidos y juegan un papel importante en la invasión y metástasis de las células cancerosas. La originalidad de esta estrategia es que no se dirigió a una sola enzima bien conocida, sino a toda la actividad enzimática que se encontró excretada por las células tumorales humanas mantenidas en cultivo. La N-succinil-beta-alanil-L-leucil-L-alanil-L-leucil-doxorrubicina (Suc-βALAL-dox) se seleccionó como un profármaco candidato de este tipo (Fernández y col. 2001, J Med Chem 44:3750-3). En comparación con la doxorubicina no conjugada, este profármaco es, en ratones, aproximadamente 5 veces, y en perros, 3 veces menos tóxico. El tratamiento crónico con Suc-βALAL-dox demostró ser significativamente menos cardiotoxico que con Dox a dosis hasta 8 veces mayores en ratas. La actividad mejorada de Suc-βALAL-dox sobre Dox se observó en varios modelos de xenoinjerto tumoral (Dubois y col. 2002, Cancer Res 62:2327-31; Ravel y col. 2008, Clin Cancer Res 14:1258-65). Dos enzimas, CD10 (neprilisina o antígeno de cala) y thimet oligopeptidasa (TOP) se han identificado más tarde en medio acondicionado de células tumorales y en células tumorales como activadores de Suc-βALAL-dox (Pan y col. 2003, Cancer Res 63: 5526-31; Dubois y col. 2006, Eur J Cancer 42: 3049-56) pero otras proteasas no identificadas también pueden estar involucradas en el procedimiento de activación.

40 La empresa biofarmacéutica DIATOS SA inició un estudio clínico de fase I con Suc-βALAL-dox. Se produjo una mielotoxicidad a dosis tres veces mayores en comparación con Dox. No se informaron eventos adversos cardíacos graves relacionados con el fármaco, incluso a dosis acumulativas muy altas (2750 mg/m²). Se observó un beneficio clínico para el 59 % de los pacientes evaluables (Delord y col., no publicado).

45 La principal limitación de Suc-βALAL-dox es que la leucopenia sigue siendo una toxicidad importante y que una actividad antitumoral experimentalmente más alta solo se pudo observar a costa de una mielotoxicidad aún importante. Se espera que dicha mielotoxicidad se produzca como resultado de la sensibilidad del resto peptídico de Suc-βALAL-dox a la hidrólisis por enzimas presentes en tejidos normales.

50 El documento WO 02/100353 describe específicamente profármacos quimioterapéuticos diseñados con un oligopéptido de 3 a 6 aminoácidos escindible por CD10. El documento WO 02/00263 describe profármacos con un oligopéptido de 3 aminoácidos escindible por TOP y al menos 1 profármaco con un oligopéptido de aminoácido (Leu-Ala-Gly) no escindible por CD10. El documento WO 00/33888 y el documento WO 01/95945 describen profármacos con un oligopéptido de 4 a 20 aminoácidos que comprende un aminoácido no codificado genéticamente en una posición fija, con dicho oligopéptido escindible por TOP. En el documento WO 01/95945, se informó que al menos 1 profármaco, con un oligopéptido βAla-Leu-Tyr-Leu, era resistente a la acción proteolítica CD10. El documento WO 01/95943 describe profármacos con un oligopéptido de 3 a 4 aminoácidos que comprende una isoleucina fija, siendo dicho oligopéptido preferentemente resistente a TOP; no se proporciona información sobre susceptibilidad o

resistencia a CD10. Un concepto más general de un profármaco que consiste en un fármaco unido a un oligopéptido (de al menos 2 aminoácidos) unido en sí a un grupo terminal se describe en el documento WO 96/05863 y luego se extendió en el documento WO 01/91798.

5 Otros conjugados de fármacos poliméricos de los cuales el resto no farmacológico comprende al menos un polímero soluble en agua y un péptido (que comprende de 4 a 5 aminoácidos naturales o no naturales) selectivamente escindibles por acción de metaloproteinasas de matriz (MMP) se describen en el documento WO 02/07770. El documento WO 03/094972 se centra en profármacos antitumorales que son activables por la proteína de activación de fibroblastos humanos (FAP α); el profármaco comprende un oligopéptido de 4 a 9 aminoácidos con un aminoácido cíclico en una posición fija. El documento WO 99/28345 describe profármacos que son escindibles proteolíticamente por antígeno prostático específico en el oligopéptido de menos de 10 aminoácidos presentes en el profármaco.

10 El documento WO 97/34927 puso de manifiesto los profármacos escindibles con FAP α Ala-Pro-7-amino-4-trifluorometilcumarina y Lys-Pro-7-amino-4-trifluorometilcumarina. El documento WO 00/71571 se centra en los profármacos escindibles con FAP α , con algunas investigaciones experimentales adicionales sobre la sensibilidad proteolítica a CD26 (dipeptidilpeptidasa IV), considerándose esta última como indeseable debido a la abundancia relativa de CD26 también en células no malignas.

15 Otros profármacos activables por FAP α incluyen la toxina de promelitina (LeBeau y col. 2009, Mol Cancer Ther 8, 1378-1386), doxorubicina (Huang y col. 2011, J Drug Target 19, 487-496), taspigargina (Brennen y col. 2012, J Natl Cancer Inst 104, 1320-1334) y un profármaco que comprende un oligopéptido de 4 a 9 aminoácidos con un aminoácido cíclico en una posición fija (documento WO 03/094972).

20 El documento WO 01/68145 describe profármacos de doxorubicina resistentes a neprilisina (CD10) escindibles con MMP (véase el ejemplo 1001 en el mismo) que comprenden un oligopéptido de 3 a 8 aminoácidos. Se han desarrollado profármacos de doxorubicina sensibles a metaloproteinasa y plasmina, así como conjugados de péptido CNGRC con doxorubicina (Hu y col. 2010, Bioorg Med Chem Lett 20, 853-856; Chakravarty y col. 1983, J Med Chem 26, 638-644; Devy y col. 2004, FASEB J 18, 565-567; Vanhensbergen y col. 2002, Biochem Pharmacol 63, 897-908).

25 Los documentos WO97/12624, WO97/14416, WO98/10651, WO98/18493 y WO99/02175 describen profármacos que comprenden péptidos donde el péptido es escindible por el antígeno prostático específico (PSA).

30 Es común a todos los profármacos anteriores la presencia de un resto protectora o de bloqueo, generalmente unido covalentemente al lado N-terminal del oligopéptido, lo que aumenta la estabilidad del profármaco y/o aumenta la prevención de la internalización del profármaco en una célula, tal como una célula diana. Dichos restos protectores o de bloqueo incluyen aminoácidos no naturales, grupos β -alanilo o succinilo (p. ej. los documentos WO 96/05863, US 5.962.216). Los restos protectores o de bloqueo estabilizadores adicionales incluyen ácido diglicólico, ácido maleico, ácido piroglutámico, ácido glutárico, (p. ej., el documento WO 00/33888), un ácido carboxílico, ácido adípico, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido naftaleno dicarboxílico, ácido 1,8-naftildicarboxílico, ácido aconítico, ácido carboxicinámico, ácido triazol dicarboxílico, ácido butano disulfónico, polietilenglicol (PEG) o un análogo del mismo (p.ej., el documento WO 01/95945), ácido acético, ácido 1- o 2-naftilcarboxílico, ácido glucónico, ácido 4-carboxifenilborónico, ácido polietilenglicólico, ácido nipecótico y ácido isonipecótico (p. ej., los documentos WO 02/00263, WO 02/100353), polietilenglicol succinilado (p. ej., el documento WO 01/91798). Se introdujo un nuevo tipo de resto protector o de bloqueo en el documento WO 2008/120098, que es un ácido 1, 2, 3, 4 ciclobutanotetracarboxílico. El resto protector o de bloqueo en el documento WO 02/07770 puede ser ácido poliglutámico, dextranos carboxilados, polietilenglicol carboxilado o un polímero basado en hidroxipropilmetacrilamida o N-(2-hidroxipropil)metacrilolamida.

Breve descripción de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

45 Los profármacos de la invención tienen la estructura general:



donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un resto oligopeptídico;

D es un fármaco;

50 x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y

donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, con uno de los restos OP unidos directamente, mediante un enlazador o un grupo espaciador a D. Como alternativa, los múltiples restos OP pueden unirse individualmente a D directamente, mediante un enlazador o mediante un grupo espaciador. Se incluye una constelación intermedia donde algunos de los restos OP múltiples están unidos individualmente a D directamente, mediante un enlazador, o mediante un grupo espaciador, y donde algunos de los restos OP múltiples están unidos individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, con uno de los restos OP unidos directamente, mediante un enlazador o mediante un grupo espaciador a D;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En particular, el resto oligopéptido en la estructura anterior es un resto tetrapéptido con la secuencia Ala-Leu-Gly-Pro (código de 3 letras), también denominado ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1); o Ala-Leu-Ala-Leu (código de 3 letras), también denominado ALAL (código de 1 letra; SEQ ID NO:2), y/o el grupo de bloqueo C en la estructura anterior es un grupo fosfonoacetilo, y/o el fármaco en la estructura anterior es doxorubicina (también denominado en lo sucesivo DOX o Dox). Como alternativa, la estructura del tetrapéptido es ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10). Por consiguiente, en una realización, la estructura del tetrapéptido en la estructura general anterior se selecciona del grupo que consiste en ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) y KLKP (SEQ ID NO: 10). En particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior se selecciona de ALGP (SEQ ID NO:1) o KLGP (SEQ ID NO:6); aún más en particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior es ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1). Cuando está presente, dicho enlazador o grupo espaciador en los profármacos anteriores o sales de los mismos puede ser un enlazador o grupo espaciador auto eliminable.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los profármacos anteriores también son parte de las invenciones.

La invención se refiere además a composiciones que comprenden uno de los profármacos o sales del mismo anteriores, o una combinación de cualquiera de los mismos, y al menos uno de un disolvente, diluyente o vehículo.

La invención abarca el profármaco anterior o sal del mismo, o la composición anterior que lo comprende para su uso en el tratamiento de un cáncer. Los procedimientos para tratar un cáncer también son parte de la invención, comprendiendo dichos procedimientos administrar a un sujeto que tiene cáncer dicho profármaco o sal del mismo o dicha composición, dando como resultado dicha administración el tratamiento de dicho cáncer. En particular, las cantidades efectivas de dicho profármaco o sal del mismo, o de dicha composición no están causando leucopenia grave o toxicidad cardíaca.

Los procedimientos para producir los profármacos anteriores son parte adicional de la invención, comprendiendo dichos procedimientos las etapas de:

(i) obtener el fármaco;

(ii) unir el fármaco a un resto oligopeptídico bloqueado, dando como resultado el profármaco; o como alternativa,

(ii') unir el fármaco a un resto oligopeptídico seguido de unir el grupo de bloqueo al resto oligopeptídico, dando como resultado el profármaco; y

(iii) purificar el profármaco obtenido en la etapa (ii) o (ii').

La invención incluye además procedimientos de producción y detección de profármacos candidatos, teniendo dichos profármacos candidatos la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); en particular OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO: 1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador; y

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con un dipéptido GP, AP o KP para obtener un GP-D, AP-D o KP-D como profármaco intermedio de fármaco dipéptido;

(iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D independientemente con células cultivadas *in vitro*;

(iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y

(vi) seleccionar $[C_x-OP]_y-D$ correspondiente al profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

Como alternativa, en dichos procedimientos de detección son procedimientos de detección de profármacos candidatos, los

candidatos a probar tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende una prolina carboxi terminal, donde dicha prolina está unida directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador al fármaco D; en particular OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); más en particular un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6) KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador; y

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y profármaco $[C_x-OP]_y-D$ independientemente con células cultivadas *in vitro*;

(iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

- (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y
 (vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En otra alternativa, dicha detección son procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

5 $[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

10 OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende una prolina carboxi terminal, donde dicha prolina está unida directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador al fármaco D; en particular OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); más en particular un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6) KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

20 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

25 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) poner en contacto el profármaco $[C_x-OP]_y-D$ durante 5 h a 37 °C con células cultivadas *in vitro*;

30 (iv) determinar la conversión del profármaco $[C_x-OP]_y-D$ en el fármaco libre D;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ que se convierte al menos en un 50 % en D; y

(vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En otra alternativa más, en dichos procedimientos de detección son procedimientos de detección de profármacos candidatos,

35 los candidatos a probar tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

40 OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); más en particular, un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO: 1);

45

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

5 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador; y

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

10 (ii) conjugar el fármaco D con un dipéptido GP, AP o KP para obtener un profármaco GP-D, AP-D o KP-D;

(iii) poner en contacto el profármaco GP-D, AP-D o KP-D durante 3 h a 37 °C con peptidasas FAP y/o DPIV aisladas;

(iv) determinar la conversión del profármaco GP-D, AP-D o KP-D en el fármaco libre D;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco GP-D, AP-D o KP-D que se convierte al menos en un 50 % en D; y

15 (vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ correspondiente al profármaco GP-D, AP-D o KP-D identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

Además, dicha detección prevista incluye procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

20 OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende una prolina carboxi terminal, donde dicha prolina está unida directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador al fármaco D; en particular OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); más en particular un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6) KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

35 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

40 (i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) poner en contacto el profármaco $[C_x-OP]_y-D$ durante 3 h a 24 h a 37 °C con peptidasas CD 10 y/o TOP aisladas y con peptidasas FAP y/o DPIV aisladas;

(iv) determinar la conversión del profármaco $[C_x-OP]_y-D$ en el fármaco libre D;

45 (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ que se convierte al menos en un 50 % en D; y

(vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En cualquiera de los procedimientos de detección alternativos anteriores, dicho grupo de bloqueo C puede ser un grupo fosfonoacetilo.

En cualquiera de los procedimientos de detección alternativos anteriores, dicho fármaco D puede seleccionarse del grupo que consiste en maitansina, geldanamicina, paclitaxel, docetaxel, camptotecina, vinblastina, vincristina, vindesina, metotrexato, aminopterina, amrubicina o un derivado de cualquiera de los mismos.

En los procedimientos anteriores, y cuando está presente, dicho enlazador o grupo espaciador puede ser un enlazador o grupo espaciador auto eliminable.

La invención se refiere además a kits que comprenden un recipiente que comprende un profármaco o sal del mismo descrito anteriormente o que comprende una composición que comprende dicho profármaco o sal del mismo.

10 Leyenda de las figuras

Figura 1. Efecto de los conjugados PhAc-péptido-Dox sobre el peso corporal de ratones normales OF-1 (n = 4). Los fármacos o controles se administraron por vía iv el día 0. Los ratones que recibieron un volumen constante (10 µl/g) de solución salina (-●-) o de las diferentes soluciones de dosificación: PhAc-ALAL-Dox 80 µmol/kg (-▲-) y 160 µmol/kg (-x-); PhAc-ALGP-Dox a 240 µmol/kg (-*-) y 320 µmol/kg (-○-). Los resultados representan la evolución del peso corporal medio.

Figura 2. Estudio de eficacia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina libre en ratones desnudos NMRI con xenoinjertos humanos de carcinoma de colon LS174T. Los fármacos o controles se administraron por vía iv el día 0 y el día 7. Los ratones que recibieron un volumen constante (10 µl/g) de solución salina (-●-, -○-) o de las diferentes soluciones de dosificación: PhAc-ALGP-Dox 140 µmol/kg (-▲-) y 160 µmol/kg (-x-); Dox 15 µmol/kg (-◆-). Los resultados representan el peso corporal medio y la evolución del volumen tumoral ± SEM (n = 4).

Figura 3. Estudio de eficacia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina libre en ratones desnudos NMRI con xenoinjertos humanos de carcinoma mamario MX-1. Los fármacos o controles se administraron por vía iv los días 0, 3, 6 y 9. Los ratones que recibieron un volumen constante (10 µl/g) de solución salina (-●-) o de las diferentes soluciones de dosificación: PhAc-ALGP-Dox 100 µmol/kg (-*-) y Dox 8 µmol/kg (-■-). Los resultados representan el peso corporal medio y la evolución del volumen tumoral ± SEM (n = 4).

Figura 4. Evolución temporal de la concentración plasmática (A, B) y de la concentración de tejido cardíaco (C, D) de doxorubicina o PhAc-ALGP-Dox y sus metabolitos después de la inyección iv en embolada en ratones OF-1 hembra de tipo salvaje a la dosis de 86,2 µmol/kg. Los resultados representan la concentración media ± DE (n = 3).

Figura 5. Toxicidad celular *in vitro* de PhAc-ALGP-Dox y doxorubicina en células Cor.At® (cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias de ratón). Como control no específico, la prueba también se realizó en fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (MEF). Las células se cultivaron durante 48 h en presencia de fármacos y se realizó una prueba de captación de rojo neutro para determinar la viabilidad celular. Los resultados representan las curvas de citotoxicidad. Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de las curvas de citotoxicidad utilizando el software Prism GraphPad 5.0.

Figura 6. PhAc-ALGP-Dox se administró en concentraciones crecientes (15, 35, 50, 100, 200, 300, 460, 620 µmol/kg) mediante inyección intravenosa a ratones desnudos NMRI con xenoinjertos de carcinoma de colon LoVo (3 ratones por grupo). Después de 24 horas, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tumores. La concentración tumoral de doxorubicina se determinó después de la extracción mediante análisis por HPLC. Los resultados representan la concentración tumoral media de doxorubicina (pmol/mg de proteína) ± DE.

Figura 7. Estudio de toxicidad de PhAc-ALGP-Dox después de inyecciones intraperitoneales (ip) únicas y múltiples en ratones OF-1. Los animales fueron tratados con PhAc-ALGP-Dox con diferentes programas de tratamiento a 56 µmol/kg 5x (Q1D5 -*-); a 28 µmol/kg 10x (2Q1D5 -■-); a 560 µmol/kg 1x (-□-); a 112 µmol/kg 5x (Q1D5 -A-); a 56 µmol/kg 10x (2Q1D5 -x-).

Figura 8. Evolución temporal de la concentración sanguínea de PhAc-ALGP-Dox y sus metabolitos (A) o de doxorubicina (B) después de la inyección intraperitoneal a ratones OF-1 hembra de tipo salvaje a la dosis equimolar de 92 µmol/kg. Los resultados representan la concentración media ± DE (n = 3).

Figura 9. Estudio de eficacia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina libre en ratones desnudos NMRI con xenoinjertos humanos de carcinoma de colon LoVo. Los fármacos o controles se administraron por vía ip dos veces al día durante cinco días consecutivos (flechas). Los ratones que recibieron un volumen constante (10 µl/g) de solución salina (-●-) o de las diferentes soluciones de dosificación: PhAc-ALGP-Dox 25 µmol/kg (*), 35 µmol/kg (o) and 50 µmol/kg (+); Dox 0,5 µmol/kg (■), 1 µmol/kg (A) y 2 µmol/kg (x). Los resultados representan el peso corporal medio y la evolución del volumen tumoral ± SEM (n = 4). ** Estadísticamente diferente con p < 0,05 de Dox 2 µmol/kg (prueba de Mann Whitney t del software Graph Pad Prism 5.0).

Figura 10. Estudio de eficacia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina libre en ratones desnudos NMRI con xenoinjertos humanos de carcinoma mamario MX-1. Los fármacos o controles se administraron por vía ip dos veces al día durante cinco días consecutivos (flechas). El tratamiento se repitió con un intervalo de 72 horas entre dos ciclos. Los ratones que recibieron un volumen constante (10 μ l/g) de solución salina (-●-) o de las diferentes soluciones de dosificación: PhAc-ALGP-Dox 50 μ mol/kg (○), Dox 1 μ moFkg (■), y 1,5 μ mol/kg (▲). Los resultados representan el peso corporal medio y la evolución del volumen tumoral \pm SEM (n = 6). † = ratón muerto.

Figura 11. Evaluación de la eficacia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina en el modelo de melanoma metastásico de pulmón B16-F10. El gráfico del lado izquierdo representa la cuantificación de melanina de metástasis pulmonares en el día 14 después de la inyección de células tumorales B16F10. El gráfico del lado derecho muestra las curvas de supervivencia.

Figura 12. Evaluación del efecto leucopenico de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina. Los ratones CD1 recibieron inyecciones intraperitoneales dos veces al día de PhAc-ALGP-Dox 35 μ mol/kg (●) o de doxorubicina 3,5 μ mol/kg durante cinco días consecutivos. Se registró la evolución del peso corporal de los ratones (A). Se recogió sangre de la vena de la cola en tubos de microvetas heparinizados (Starsted) los días 4, 11 y 15 después del inicio del tratamiento. Los glóbulos blancos periféricos (WBC) se contaron utilizando el analizador hematológico SCILvet abc (B). El aumento o disminución de WBC se expresa como un porcentaje de WBC en el día 0 (100 %) para cada ratón. Las curvas muestran la evolución de los porcentajes medios.

Figura 13. Evaluación de la cardiotoxicidad crónica de PhAc-ALGP-Dox en ratones CD-1. Los animales recibieron 10 inyecciones intravenosas (flechas) de solución salina (●); doxorubicina 6,9 μ mol/kg (■) o de PhAc-ALGP-Dox a 13,8 (▲), 27,6 (×), 55,2 (*) y 82,8 μ mol/kg (o). Los resultados representan la evolución del peso corporal relativo promedio (%). † = ratón muerto.

Figura 14. Evaluación del efecto antitumoral de PhAc-ALGP-dox en ratones SCID con tumores ortotópicos de colon humano HCT116. Los ratones SCID fueron inyectados ortotópicamente (en el ciego) con células tumorales de colon HCT116 humanas. Un grupo fue tratado con solución salina mientras que los grupos 2 y 3 recibieron 10 inyecciones intraperitoneales (2T1D5) de 35 y 50 μ mol/kg de PhAc-ALGP-doxorubicina. Los pesos primarios de los tumores se registraron el día 34 después de la inoculación celular.

Figura 15. Evaluación del efecto antimetastásico (en el hígado) de PhAc-ALGP-dox en ratones SCID con tumores ortotópicos de colon humano HCT116. Los ratones SCID fueron inyectados ortotópicamente (en el ciego) con células tumorales de colon HCT116 humanas. Un grupo fue tratado con solución salina mientras que los grupos 2 y 3 recibieron 10 inyecciones intraperitoneales (2T1D5) de 35 y 50 μ mol/kg de PhAc-ALGP-doxorubicina. Las metástasis hepáticas se registraron el día 34 después de la inoculación celular.

Figura 16. Efecto de PhAc-ALGP en un modelo de xenoinjerto UZLX-ST3. UZLX-ST3 es un xenoinjerto de tejido derivado de un paciente diagnosticado con liposarcoma desdiferenciado (DDLPS). Durante los pases, los tumores ex-ratón revelaron las mismas características morfológicas y moleculares como la biopsia original recogida del paciente durante la cirugía (es decir amplificación del gen MDM2, inmunopositividad de MDM2). En xenoinjertos anteriores no administrados por perfusión, este modelo de tumor de sarcoma era completamente resistente a la doxorubicina libre administrada a su dosis máxima tolerada.

Un total de 24 ratones fueron trasplantados bilateralmente con UZLX-ST3 (xenoinjertos de tejido del pase 10). Los animales fueron cedidos aleatoriamente a tres grupos diferentes: un grupo de control (solución salina; -●-); un grupo PhAc-ALGP-doxorubicina (dosis acumulativa 1,20 mmol/kg -■-) y un grupo de doxorubicina (dosis acumulativa 0,03 mmol/kg; -▲-). Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal durante 7 días mediante liberación continua a través de una bomba osmótica Alzet®, con una tasa de suministro de 0,5 μ l/h durante 7 días. El experimento duró 21 días (7 días de tratamiento + 14 días de observación). El volumen tumoral y el peso corporal del ratón se evaluaron al inicio del estudio y posteriormente tres veces por semana hasta el final de cada experimento. Después de 21 días, los ratones fueron sacrificados. El volumen tumoral se registra 3 veces por semana mediante una medición de calibre tridimensional. Los datos se presentan con el promedio de los volúmenes tumorales relativos por grupo \pm desviación estándar.

La comparación entre los volúmenes tumorales en el día cero y los volúmenes en el último día de los experimentos se realizó mediante la prueba emparejada de Wilcoxon. Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (volúmenes tumorales relativos, evaluación histológica). P <0,05 se consideró estadísticamente significativamente diferente. Se utilizó el software STATISTICA (StatSoft, versión 12.0) para todos los cálculos.

Figura 17. Evolución del peso corporal relativo de los animales del experimento que se muestra en la figura 16. Los datos se presentan como el promedio del peso corporal relativo de los ratones en cada grupo \pm desviación estándar. Las líneas discontinuas marcan los valores de referencia para la cepa de ratón NMRI nu/nu. PhAc- ALGP-doxorubicina (-■-); Dox (-▲-); y solución salina (-●-).

Figura 18. Evolución del recuento total de glóbulos blancos ($10^3/\mu$ l) de los animales del experimento que se muestra en la figura 16. Los datos se presentan como el promedio del recuento de glóbulos blancos de los ratones en cada

grupo \pm desviación estándar. Las líneas discontinuas marcan los valores de referencia para la cepa de ratón NMRI nu/nu. PhAc- ALGP-doxorrubicina (-■-); Dox (-▲-); y solución salina (-●-). El recuento total de glóbulos blancos se determinó utilizando el analizador de hematología automatizado multiparamétrico CELL-DYN 3500 con optimización para los parámetros de sangre murina (Abott Diagnostics, Division, IL, EE. UU.)

5 Figura 19. Evolución del recuento total de neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$) de los animales del experimento que se muestra en la figura 16. Los datos se presentan como el promedio del recuento de neutrófilos de ratones en cada grupo \pm desviación estándar. Las líneas discontinuas marcan los valores de referencia para la cepa de ratón NMRI nu/nu. PhAc- ALGP-doxorrubicina (-■-); Dox (-▲-); y solución salina (-●-). El recuento de neutrófilos se determinó utilizando el analizador de hematología automatizado multiparamétrico CELL-DYN 3500 con optimización para los parámetros de sangre murina (Abott Diagnostics, Division, IL, EE. UU.)

Descripción detallada de la invención

En general, la presente invención describe nuevos compuestos profármacos de agentes terapéuticos, especialmente profármacos que comprenden un agente terapéutico antitumoral, que muestran propiedades terapéuticas mejoradas. Las propiedades terapéuticas mejoradas incluyen una disminución de la toxicidad y una mayor eficacia. En particular, los profármacos muestran una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida, una estabilidad mejorada en el suero y la sangre, y su agente terapéutico no se mueve hacia las células diana hasta que el profármaco finalmente se activa (la activación puede implicar múltiples etapas) por (a) enzima(s) asociada(s) a células diana tales como peptidasas extracelulares liberadas de las células diana o asociadas a la superficie extracelular de las células diana. Las células diana incluyen células cancerosas, así como células de estroma tumoral. Los compuestos profármacos de la invención son formas profármaco de un agente terapéutico, donde el agente terapéutico está unido directamente o indirectamente a un oligopéptido, que, a su vez, está unido a un grupo de bloqueo estabilizador.

En general, los profármacos de la invención tienen la siguiente estructura general:



25 donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un resto oligopeptídico;

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

30 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

35 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, con uno de los restos OP unidos directamente, mediante un enlazador o mediante un grupo espaciador a D. En otras palabras, los múltiples restos OP pueden unirse entre sí para formar una estructura lineal o ramificada que se une a D mediante uno de los restos OP en la estructura lineal o ramificada. Como alternativa, los múltiples restos OP están individualmente unidos a D directamente, mediante un enlazador, o mediante un grupo espaciador. Se incluye una constelación intermedia donde algunos de los restos OP múltiples están unidos individualmente a D directamente, mediante un enlazador, o mediante un grupo espaciador, y donde algunos de los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí como se ha descrito anteriormente para formar una estructura lineal o ramificada de la cual uno de los restos OP se une directamente, mediante un enlazador o mediante un grupo espaciador, a D.

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

45 Para aclarar, y sin ser exhaustivo, cuando $y = 2$ se incluyen los siguientes profármacos en la estructura general: C-OP-D-OP-C; C-OP-OP-D y C-OP-D-OP. Por tanto, el grupo de bloqueo C puede estar presente (mediante un enlace directo o indirecto como se describió anteriormente) en uno o más restos de oligopéptidos OP en el caso de un compuesto/molécula profármaco que comprende múltiples restos de oligopéptidos OP.

50 En una realización, el resto de oligopéptido es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende una prolina carboxi terminal, donde dicha prolina está unida directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador al fármaco D. Sin estar limitado a esto, los investigadores entienden que este resto oligopeptídico se escinde/elimina del fármaco D en un procedimiento de dos etapas donde la primera etapa convierte dicho profármaco en un intermedio fármaco dipéptido y donde la segunda etapa convierte el intermedio fármaco dipéptido en un fármaco libre D. En una realización particular, el dipéptido que permanece en

el intermedio fármaco dipéptido tiene la secuencia glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP), o lisina-prolina (KP). Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar los profármacos con la fórmula general mencionada anteriormente, donde OP representa un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP), donde la prolina de dicho dipéptido que comprende prolina está unida directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador al fármaco D.

En particular, el resto oligopéptido en la estructura anterior es un resto tetrapéptido con la secuencia Ala-Leu-Gly-Pro (código de 3 letras), también denominado ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1); o Ala-Leu-Ala-Leu (código de 3 letras), también denominado ALAL (código de 1 letra; SEQ ID NO:2), y/o el grupo de bloqueo C en la estructura anterior es un grupo fosfonoacetilo, y/o el fármaco en la estructura anterior es doxorubicina (también denominado en lo sucesivo DOX o Dox). Como alternativa, la estructura del tetrapéptido es ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10). Por consiguiente, en una realización, la estructura del tetrapéptido en la estructura general anterior se selecciona del grupo que consiste en ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) y KLKP (SEQ ID NO: 10). En particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior se selecciona de ALGP (SEQ ID NO:1) o KLGP (SEQ ID NO:6); aún más en particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior es ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1). En una realización preferida de la presente invención, el fármaco (D) en la estructura general anterior es doxorubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En particular, el profármaco puede tener la estructura del compuesto I (véase el ejemplo 3.1) o puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El grupo de bloqueo fosfonoacetilo proporciona las ventajas de evitar el uso de aminoácidos no naturales en el extremo terminal del oligopéptido. Cuando el fármaco D es doxorubicina, el fosfonoacetilo como grupo de bloqueo C tiene la ventaja adicional de proporcionar una carga negativa que es importante para evitar la agregación de derivados oligopéptidos de doxorubicina. En general, la estabilidad de un profármaco de la invención puede definirse de modo que se obtenga menos del 10 % de derivados de escisión tras la incubación del profármaco en sangre humana durante más de 2 horas.

A pesar de las definiciones anteriores del grupo de bloqueo C, el resto de oligopéptido OP y el fármaco, estos no limitan la invención actual y la invención prevé otras combinaciones. Estas combinaciones incluyen cualquier OP y/o D, siendo el grupo de bloqueo C un grupo fosfonoacetilo. Otras combinaciones incluyen cualquier C (cualquier grupo de bloqueo conocido en la técnica) y/o cualquier D con el resto de oligopéptido OP que es un resto tetrapéptido con la secuencia Ala-Leu-Gly-Pro (código de 3 letras) o Ala-Leu-Ala -Leu (código de 3 letras) o ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1) o ALAL (código de 1 letra; SEQ ID NO:2). Como alternativa, la estructura del tetrapéptido es ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10). En otra alternativa, la estructura del tetrapéptido es ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10). En particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior se selecciona de ALGP (SEQ ID NO:1) o KLGP (SEQ ID NO:6); aún más en particular, el tetrapéptido en la estructura general anterior es ALGP (código de 1 letra; SEQ ID NO:1).

Dependiendo de la estructura/fórmula química del fármaco, 1 o más de los restos oligopeptídicos de la invención, de los cuales al menos uno de ellos está bloqueado, se pueden unir al fármaco. Los restos oligopeptídicos pueden formar por sí mismos una estructura lineal o ramificada unida al fármaco o, como alternativa, múltiples restos oligopeptídicos están cada uno individualmente unidos al fármaco.

El grupo de bloqueo o el resto protector o de bloqueo está unido al resto oligopeptídico del profármaco y se añade a la solubilidad y/o estabilidad del profármaco (p. ej., en sangre del animal, mamífero, ser humano o sujeto al que se administra el profármaco) y/o se añade a la prevención de la internalización del profármaco en una célula, como una célula diana.

El enlace entre el grupo de bloqueo y el oligopéptido y/o entre el oligopéptido y el agente terapéutico o fármaco puede ser directo, p. ej., mediante el grupo amino N-terminal del oligopéptido o el grupo carboxilo C-terminal del oligopéptido, o mediante una cadena lateral de uno de los aminoácidos del oligopéptido.

Como alternativa, dicho enlace puede ser indirecto, p. ej., mediante la introducción de un enlazador o grupo espaciador entre el oligopéptido OP y el fármaco D. En el caso de compuestos citotóxicos como la doxorubicina que tiene un grupo amino libre (NH₂), un enlazador entre D y OP no se requiere en sí, ya que la escisión enzimática del enlace amida entre D y OP asegura la disponibilidad del grupo NH₂ libre en el fármaco citotóxico.

Sin embargo, la mayoría de los fármacos citotóxicos anticancerígenos D no tienen ningún grupo NH₂ libre y, como tal, no pueden unirse a OP mediante un enlace amida. Al introducir un grupo NH₂ a esas moléculas, puede disminuir o suprimir su actividad citotóxica. Para dichos fármacos, se puede usar un grupo espaciador o separador autoinmolutivo (o auto eliminable, autosacrificado, autolisante o que se va) como un enlazador entre el fármaco D y el oligopéptido OP. OP está unido al espaciador autoinmolutivo mediante un enlace amida sensible a las enzimas

extracelulares capaces de activar el profármaco. Después de la escisión del enlace amida entre OP y el espaciador, el espaciador autoeliminativo se escinde del fármaco dejándolo no derivatizado, es decir, dejándolo en su forma activa original. Los separadores autoeliminativos incluyen restos para-aminobenzoiloxicarbonilo que pueden conectar grupos -OH, -COOH, -NH o -SH de un fármaco, por un lado, al grupo carboxi-terminal de un péptido, por otro lado. Este tipo de enlazador es un espaciador electrónico en cascada. Se ha demostrado que dicho enlace es escindible por las peptidasas. Después de la escisión del enlace de la amida del espaciador y OP, la amina aromática del espaciador auto eliminable se convierte en donante de electrones, lo que conduce a la expulsión y liberación del fármaco libre y el CO₂ (Carl y col. 1981, J Med Chem 24, 479-480; Chakravarty y col. 1983, J Med Chem 26, 638-644; de Groot y col. 1999, J Med Chem 42, 5277-5283, King y col. 2002, J Med Chem 45,4336-4343). Se han descrito varias patentes y solicitudes de patente que describen otros espaciadores autoeliminativos/ auto eliminables, como los heterocíclicos, que liberan un fármaco de un ligando de dirección como un anticuerpo (p. ej., los documentos US 6.214.345; US 2003/0130189; US 2003/0096743; US 6.759.509; US 2004/0052793; US 6.218.519; US 6.835.807; US 6.268.488; US 2004/0018194; WO 98/13059; US 2004/0052793; US 6.677.435; US 5.621.002; US 2004/0121940; WO 2004/032828, US 2009/0041791).

Los ejemplos de otros grupos enlazadores o espaciadores, no necesariamente auto eliminables, incluyen ácido aminocaproico, un grupo hidrazida, un grupo éster, un grupo éter y un grupo sulfhidrilo. Un enlazador o grupo espaciador como se describió anteriormente entre el grupo de bloqueo y el oligopéptido y/o entre el oligopéptido y el agente terapéutico puede ser ventajoso por razones tales como las siguientes: (i) como un espaciador por consideraciones estéricas para facilitar la liberación enzimática del aminoácido unido al agente terapéutico u otras etapas de activación enzimática; (ii) para proporcionar una química de unión apropiada entre los diferentes restos del profármaco (y así proporcionar flexibilidad para acoplar cualquier posible fármaco y/o resto de bloqueo al oligopéptido de la invención); (iii) para mejorar el procedimiento sintético de fabricar el profármaco conjugado (p. ej., pre-derivatizando el agente terapéutico u oligopéptido con el grupo enlazador antes de la conjugación para mejorar el rendimiento o la especificidad); (iv) para mejorar las propiedades físicas del profármaco; o (v) para proporcionar un mecanismo adicional para la liberación intracelular del fármaco. Cualquiera que sea el tipo de enlace, directo o indirecto, el enlace debe: (1) no alterar o no significativamente la funcionalidad del resto oligopeptídico, es decir, no debe alterar significativamente ni la capacidad de escisión proteolítica por TOP ni la resistencia a la capacidad de escisión proteolítica por CD1 y (2) conservar la estabilidad sanguínea del compuesto. La determinación de la funcionalidad del resto oligopeptídico bloqueado en el profármaco puede probarse fácilmente y de forma directa, p. ej., como se describe en la sección de ejemplos a continuación. Dichas pruebas no representan una carga excesiva para un experto en la técnica.

La frase "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s)", como se emplea en esta memoria, significa aquellas sales de compuestos de la invención que son seguras y eficaces para el uso médico previsto que poseen la actividad biológica deseada. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de grupos ácidos o básicos presentes en los compuestos de la invención. Las sales básicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y dietanolamina. Para una revisión sobre sales farmacéuticamente aceptables, véase, p. ej., Berge y col. 1977 (J. Pharm. Sci. 66, 1-19) o Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (P. H. Stahl, C.G. Wermuth (Eds.), agosto de 2002), incorporado en la presente memoria por referencia.

El fármaco o agente terapéutico conjugado con el oligopéptido de la invención puede ser útil para el tratamiento del cáncer (p. ej., ejerciendo actividad citotóxica o antiangiogénica), enfermedad inflamatoria o alguna otra afección médica. El fármaco o agente terapéutico conjugado con el oligopéptido de la invención puede ser cualquier fármaco o agente terapéutico capaz de entrar en una célula diana. Por tanto, el agente terapéutico se puede seleccionar de una serie de clases de compuestos que incluyen antibióticos, agentes alquilantes, agentes antiproliferativos, agentes de unión a la tubulina, alcaloides de la vinca, enediinas, podofilotoxinas o derivados de podofilotoxinas, la familia de fármacos pteridina, taxanos, antraciclina, dolastatinas, inhibidores de topoisomerasa, agentes quimioterapéuticos complejos de coordinación de platino y maitansinoides. Más en particular, dicho profármaco o agente terapéutico puede ser uno de los siguientes compuestos, o un derivado o análogo de los mismos: doxorubicina, daunorubicina, amrubicina, vinblastina, vincristina, caliqueamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW 20 2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretastatina, fosfato de combretastatina A4, dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecán, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5 fluorouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, halicondrina B, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, bleomicina, melfalán, cloroquina, ciclosporina A, y maitansina. Por derivado se entiende un compuesto que resulta de hacer reaccionar el compuesto nombrado con otro resto químico (diferente del resto oligopéptido unido directa o indirectamente al compuesto), e incluye una sal, ácido, base o éster farmacéuticamente aceptable del compuesto nombrado. Otros agentes terapéuticos o fármacos incluyen: vindesina, vinorelbina, 10-desacetiltaxol, 7-epitaxol, bacatina III, 7-xilosiltaxol, isotaxel, ifosfamida, cloroaminofeno, procarbazona, clorambucil, tiofosforamida, busulfano, dacarbazina (DT1C), geldanamycin, nitroso ureas, estramustina, BCNU, CCNU, fotemustina, estreptonigrina, oxaliplatino, metotrexato, aminopterina, raltitrexed, gemcitabina, cladribina, clofarabina, pentostatina, hidroxiureas, irinotecán, topotecán, 9-dimetilaminometi-1-hidroxi-camptotecina clorhidrato, teniposida, amsacrina, mitoxantrona; 1-canavanina, THP-adriamicina, idarubicina, rubidazona, pirarrubicina, zorrubicina, aclarrubicina, epiadriamicina (4'epi-adriamicina o epirubicina), mitoxantrona, bleomicinas, actinomicinas que incluyen actinomicina D, estreptoizotocina,

caliqueamicina; L-asparaginasa; hormonas; inhibidores puros de aromataasa; andrógenos, inhibidores del proteasoma; inhibidores de farnesil1-transferasa (FTI); epotilonas; discodermolida; fostriecina; inhibidores de tirosina quinasa tales como STI 571 (mesilato de imatinib); inhibidores del receptor de tirosina quinasa tales como erlotinib, sorafenib, vandetanib, canertinib, PKI 166, gefitinib, sunitinib, lapatinib, EKB-569; inhibidores de la quinasa Bcr-Abl tales como dasatinib, nilotinib, imatinib; inhibidores de aurora quinasa tales como VX-680, CYC116, PHA-739358, SU-6668, JNJ-7706621, MLN8054, AZD-1152, PHA-680632; inhibidores de CDK tales como flavopirodol, seliciclib, E7070, BMS-387032; inhibidores de MEK tales como PD184352, U-0126; inhibidores de mTOR tales como CCI-779 o AP23573; inhibidores del huso de la quinesina tales como ispinesib o MK-0731; Inhibidores de RAF/MEK tales como Sorafenib, CHIR-265, PLX-4032, CI-1040, PD0325901 o ARRY-142886; briostatina; L-779450; LY333531; endostatinas; el agente de unión HSP 90 geldanamicina, poliéteres macrocíclicos tales como halicondrina B, eribulina. Para una serie de compuestos incluidos en la lista anterior, se proporciona más orientación experimental en el ejemplo 16 de esta invención. Entre los fármacos distintos de la doxorrubicina incluidos en esta invención está la amrubicina, que es un análogo de antraciclina con un grupo NH₂ libre (Hanada y col. 1998, Jpn J Cancer Res 89, 1229-1238) que se pueden unir a un oligopéptido bloqueado como PhAc-ALGP por el mismo procedimiento que el utilizado para la doxorrubicina. La adición de (a) grupo(s) de polietilenglicol al amino del resto oligopeptídico se puede realizar para aumentar la semivida del profármaco según la invención en circulación después de la administración a un mamífero. La adición de (a) grupo(s) de polietilenglicol también podría desempeñar el papel de agente de bloqueo.

Un profármaco o sal del mismo de la invención puede estar presente además en una composición que comprende además del profármaco o sal del mismo uno cualquiera de un disolvente adecuado (capaz de solubilizar el profármaco en la medida deseada), diluyente (capaz de diluir el profármaco concentrado al grado deseado) o vehículo (cualquier compuesto capaz de absorber, adherirse o incorporar el profármaco, y de posteriormente liberar en cualquier caso el profármaco en el compartimento extracelular del cuerpo del sujeto). Dicha composición puede comprender alternativamente múltiples (es decir, más de 1) profármacos o sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos (p. ej., profármaco 1 + su sal, profármaco 1 + profármaco 2, profármaco 1 + su sal + profármaco 2, etc.) En particular, dicho disolvente, diluyentes o vehículo es farmacéuticamente aceptable, es decir, es aceptable para administrarse a un sujeto a tratar con la composición de la invención. Ayudar a formular una composición farmacéuticamente aceptable es, p. ej., cualquier libro de Farmacopea. La composición puede formularse de manera que sea adecuada para cualquier forma de administración, incluida la administración intracraneal, intraespinal, enteral y parenteral. El régimen mediante el cual se administra el profármaco puede variar, p. ej., dependiendo de si un grupo de bloqueo está presente o no, dependiendo de la formulación, dependiendo de la condición física general de un sujeto a tratar y, p. ej., dependiendo del juicio del médico tratante.

El profármaco o sal del mismo de la invención, o una composición que lo comprende, es particularmente adecuado para tratar una enfermedad que es tratable por el fármaco liberado. De particular interés es el cáncer o los tumores, como los tumores sólidos. "Cáncer" incluye, por ejemplo, cánceres de mama, cánceres colorrectales, cánceres de hígado, cánceres de pulmón, como de células pequeñas, de células no pequeñas, cánceres bronquiales, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de cerebro y cánceres de páncreas, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de estómago, cánceres de vejiga, linfomas no Hodgkin, melanomas, leucemias, neuroblastomas y glioblastomas. El sujeto a tratar con el profármaco de la invención puede ser cualquier mamífero que necesite dicho tratamiento, pero en particular es un ser humano. El tratamiento puede dar como resultado la regresión de la enfermedad (p. ej. en términos de disminución del volumen tumoral o de la masa tumoral y de las metástasis), la disminución de la progresión de la enfermedad en comparación con la progresión esperada de la enfermedad, o la estabilización de la enfermedad, es decir, ni la regresión ni la progresión de la enfermedad. Todos estos son resultados favorables del tratamiento. En particular, las cantidades efectivas de dicho profármaco o sal del mismo, o de dicha composición no están causando leucopenia grave o toxicidad/cardiotoxicidad cardíaca. Una posible definición de leucopenia humana grave es la leucopenia de grado 3 - definido por la OMS- (1000-1900 leucocitos/ml) o la leucopenia de grado 4 (menos de 1000 leucocitos/ml).

También se prevé la inclusión de un profármaco anticancerígeno (o una sal del mismo) según la presente invención en terapias de combinación. Esto puede ser en una modalidad combinada de quimioterapia, es decir, el uso del profármaco anticancerígeno (o una sal del mismo) con otros tratamientos contra el cáncer, como la radioterapia (ya sea por irradiación directa o mediante la administración de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado con isótopos) o cirugía. Esto también puede ser en una quimioterapia de combinación, es decir, tratar a un paciente con varios fármacos diferentes donde los fármacos preferentemente difieren en su mecanismo de acción y en sus efectos secundarios. Por lo general, en dicha quimioterapia de combinación, los fármacos se administran simultáneamente. Una ventaja de la quimioterapia de combinación es la minimización de la posibilidad de desarrollar resistencia a cualquier agente. Otra ventaja puede ser que los fármacos individuales pueden usarse cada uno a una dosis más baja, reduciendo así la toxicidad global.

Un profármaco o una sal del mismo según la invención, o una composición que comprende dicho profármaco o sal, se puede usar por tanto para el tratamiento de una enfermedad (p. ej., cáncer), como monoterapia, o como parte de un tratamiento de quimioterapia de combinación o un tratamiento de modalidad combinada de quimioterapia.

Más en general, en relación con la quimioterapia de combinación, un profármaco anticancerígeno (o una sal del mismo) según la invención se puede combinar con uno o más agentes antineoplásicos alquilantes y/o uno o más

antimetabolitos y/o uno o más agentes antimicrotúbulos y/o uno o más inhibidores de la topoisomerasa y/o uno o más antibióticos citotóxicos y/o uno o más agentes biológicos contra el cáncer (como los anticuerpos), donde uno o más de estos, cuando sea aplicable, también pueden ser profármacos (o una sal del mismo) según la presente invención.

5 El fármaco doxorubicina (también conocido con el nombre comercial Adriamycin o Rubex) se usa comúnmente para tratar múltiples tipos de cánceres, como algunas leucemias y linfoma de Hodgkin, así como cánceres de vejiga, mama, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, sarcoma de tejido blando, mieloma múltiple y otros. La doxorubicina se usa además en diferentes terapias de combinación. Las terapias que contienen doxorubicina incluyen AC o CA (adriamicina, ciclofosfamida), TAC (Taxotere, AC), ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina), BEACOPP (bleomicina, etopósido, adriamicina (doxorubicina), ciclofosfamida, vincovina, oncovin (vincristina), procarbazona, prednisona), CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisolona), FAC o CAF (5-fluorouracilo, adriamicina, ciclofosfamida), MVAC (metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino), CAV (ciclofosfamida doxorubicina, vincristina) y CAVE (CAV, etopósido), CVAD (ciclofosfamida, vincristina, adriamicina, dexameasona), DT-PACE (dexametasona, talidomida, cisplatino o platino, adriamicina, ciclofosfamida, etopósido), m-BACOD (metotrexato, bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona), MACOP-B (metotrexato, leucovorina, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina), Pro-MACE-MOPP (metotrexato, adriamicina, ciclofosfamida, etopósido, mecloretamina, vincristina, procarbazona, prednisona), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato, leucovorina), Stanford V (doxorubicina, mecloretamina, bleomicina, vinblastina, vincristina, etopósido, prednisona), DD-4A (vincristina, actinomicina, doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, dexametasona), Régimen I (vincristina, doxorubicina, etopósido, ciclofosfamida) y VAPEC-B (vincristina, doxorubicina, prednisona, etopósido, ciclofosfamida, bleomicina). Además de las quimioterapias de combinación que comprenden doxorubicina, hay una gran cantidad de otras quimioterapias de combinación como BEP (bleomicina, etopósido, agente de platino (cisplatino (Platinol))), CAPOX o XELOX (capecitabina, oxaliplatino), CBV (ciclofosfamida, carmustina, etopósido), FOLFIRI (fluorouracilo, leucovorina, irinotecán), FOLFIRINOX (fluorouracilo, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino), FOLFOX (fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino), EC (epirubicina, ciclofosfamida), ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido (VP-16) e IFL (irinotecán, leucovorina, fluorouracilo). La combinación de doxorubicina con sirolimus (rapamicina) ha sido descrita por Wendel y col. 2004 (Nature 428, 332-337) en el tratamiento de linfomas Akt-positivos en ratones. En cualquiera de estas terapias de combinación, cualquiera de los fármacos podría sustituirse por un profármaco (o una sal del mismo) según la presente invención.

También se pueden prever terapias de combinación que incluyen un profármaco contra el cáncer (o una sal del mismo) según la invención (ya sea solo o ya sea parte de una quimioterapia de combinación o de una terapia de modalidad combinada) y compuestos distintos de los citostáticos. Dichos otros compuestos incluyen cualquier compuesto aprobado para tratar el cáncer o que se está desarrollando para tratar el cáncer. En particular, dichos otros compuestos incluyen anticuerpos monoclonales como alemtuzumab (leucemia linfocítica crónica), bevacizumab (cáncer colorrectal), cetuximab (cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello), denosumab (metástasis óseas del tumor sólido), gemtuzumab (leucemia mielógena aguda), ipilimumab (melanoma), ofatumumab (leucemia linfocítica crónica), panitumumab (cáncer colorrectal), rituximab (linfoma no Hodgkin), tositumomab (linfoma no Hodgkin) y trastuzumab (cáncer de mama). Otros anticuerpos incluyen, por ejemplo, abagovomab (cáncer de ovario), adecatumumab (cáncer de próstata y de mama), afutuzumab (linfoma), amatuximab, apolizumab (cánceres hematológicos), blinatumomab, cixutumumab (tumores sólidos), dacetuzumab (cánceres hematológicos), elotuzumab (mioteloma múltiple), farletuzumab (cáncer de ovario), intetumumab (tumores sólidos), matuzumab (cáncer colorrectal, de pulmón y de estómago), onartuzumab, parsatuzumab, primumab (cáncer de cerebro), tremelimumab, ublituximab, veltuzumab (linfoma no Hodgkin), votumumab (tumores colorrectales), zatuximab y anticuerpos anti-factor de crecimiento placentario como se describe en el documento WO 2006/099698. Los ejemplos de dichas terapias de combinación incluyen, por ejemplo, CHOP-R (CHOP (véase arriba) + rituximab), ICE-R (ICE (véase arriba) + rituximab), R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida, mitoxantrona) y TCH (paclitaxel (taxol), carboplatino, trastuzumab).

Los ejemplos de agentes antineoplásicos alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida y busulfano), nitrosoureas (por ejemplo, N-nitroso-N-metilurea (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (MeCCNU), fotemustina y estreptozotocina), tetrazinas (por ejemplo, dacarbazina, mitozolomida y temozolomida), aziridinas (por ejemplo, tiotepa, mitomicina y diaziquona (AZQ)), cisplatinos y derivados (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) y agentes alquilantes no clásicos (por ejemplo, procarbazona y hexametilmelamina)

Los subtipos de las antimetabolitos incluyen los antifolatos (por ejemplo, metotrexato y pemetrexed), fluoropirimidinas (por ejemplo, fluorouracilo, capecitabina y tegafur/uracilo), análogos de desoxinucleósidos (por ejemplo, citarabina, gemcitabina, decitabina, vidaza, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina y pentostatina) y tiopurinas (por ejemplo, tioguanina y mercaptopurina).

Los agentes antimicrotúbulos incluyen los subtipos de alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina y vinflunina) y los subtipos de taxano (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel). Otros agentes antimicrotúbulos incluyen podofilotoxina.

Los inhibidores de la topoisomerasa incluyen los inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecán, topotecán y camptotecina) y los inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona, tenipósido, novobiocina, merbarona y aclarrubicina).

5 Los antibióticos citotóxicos incluyen antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, pirarrubicina, aclarrubicina y mitoxantrona) y otros fármacos que incluyen actinomicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina.

10 Cualquier profármaco contra el cáncer (o una sal del mismo) según la invención puede (ya sea solo o ya sea parte de una quimioterapia de combinación o de una terapia de modalidad combinada) incluirse además en una terapia de profármaco enzimático dirigido a anticuerpos (ADEPT), que incluye la aplicación de anticuerpos monoclonales asociados con el cáncer, que están unidos, a una enzima activadora de fármacos. La administración sistémica posterior de un agente no tóxico da como resultado su conversión a un fármaco tóxico y da como resultado un efecto citotóxico que puede dirigirse a células malignas (Bagshawe y col. (1995) Tumor Targeting 1, 17-29)

15 Además, cualquier profármaco contra el cáncer (o una sal del mismo) según la invención puede (ya sea solo o ya sea parte de una quimioterapia de combinación o de una terapia de modalidad combinada) combinarse con uno o más agentes capaces de revertir la resistencia a (multi)fármacos (reversores de (M)DR o agentes reversores de (M)DR) que pueden producirse durante la quimioterapia. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, loperamida (Zhou y col. 2011, Cancer Invest 30, 119-125). Otra combinación de este tipo incluye cargar el profármaco en nanopartículas tales como nanopartículas de óxido de hierro (Kievit y col. 2011, J Control Release 152, 76-83) o liposomas. Los ejemplos de fármacos cargados en liposomas incluyen doxorubicina (liposomas de doxorubicina HCL, también conocidos con los nombres comerciales Doxil, Caelyx o Myocet), daunorrubicina (conocida con el nombre comercial DaunoXome) y paclitaxel (Garcion y col. 2006, Mol Cancer Ther 5, 1710-1722).

20 Un profármaco o una sal del mismo según la invención, o una composición que comprende dicho profármaco o sal, se puede usar por tanto para el tratamiento de una enfermedad (p. ej., cáncer), como monoterapia, o como parte de un tratamiento de quimioterapia de combinación o un tratamiento de modalidad combinada de quimioterapia. Cualquiera de dichos tratamientos puede combinarse además con un tratamiento que incluye un agente reversor de resistencia a fármacos.

La invención se refiere además a procedimientos para producir los profármacos de la invención, comprendiendo dichos procedimientos las etapas de:

(i) obtener el fármaco;

30 (ii) unir el fármaco a un resto oligopeptídico bloqueado con fosfonoacetilo, dando como resultado el profármaco; o como alternativa,

(ii') unir el fármaco a un resto oligopeptídico seguido de unir el grupo de bloqueo con fosfonoacetilo al resto oligopeptídico, dando como resultado el profármaco; y

(iii) purificar el profármaco obtenido en la etapa (ii) o (ii').

35 Como se describió anteriormente, dicha unión del resto oligopeptídico con el fármaco y/o el grupo de bloqueo puede ser directa o indirecta mediante un enlazador o grupo espaciador, tal como un espaciador autoinmoleculativo o auto eliminable. La estrategia de purificación del profármaco obviamente dependerá de la naturaleza del fármaco y/o del grupo de bloqueo. Un experto en la técnica podrá diseñar una estrategia de purificación adecuada para cualquier posible profármaco según la invención, eligiendo entre una gran cantidad de técnicas de purificación que están disponibles.

40 Sin limitarse a ninguna teoría o explicación, la imagen que aparece de los ejemplos como se describe en la presente memoria es una que, para el profármaco ejemplar de la invención que comprende el péptido ALGP (SEQ ID NO:1) como resto OP y doxorubicina como el fármaco D, la activación del profármaco se produce en múltiples etapas. Mientras que dicho profármaco es estable en sangre y plasma, se convierte en una mezcla de doxorubicina (Dox), GP-Dox y LGP-Dox cuando se incuba en presencia de células tumorales LS-174T. El último procedimiento puede imitarse *in vitro* en una primera etapa por proteasas como CD10 (que produce LGP-Dox que se puede convertir en GP-Dox por las aminopeptidasas de leucina comunes) y TOP (que produce GP-Dox). La primera fase de la activación de la ALGP-doxorrubicina es impulsada por la actividad preferencial de CD 10 y TOP en la vecindad de los tumores en comparación con su menor abundancia en compartimentos y tejidos extracelulares no patológicos. La segunda etapa, la conversión de GP-Dox a Dox, puede ser impulsada por dipeptidil prolil peptidasas. Dos miembros de esta clase son de interés en el área del cáncer: DPIV, también conocida como CD26 y FAP o proteína de activación de fibroblastos. Se sabe que todas estas proteasas están asociadas con células tumorales o células del estroma tumorales como se describe a continuación. Dicha activación de múltiples etapas de un profármaco de la invención aumenta la especificidad y disminuye los efectos secundarios no deseados (tales como leucopenia y toxicidad cardíaca) en comparación con profármacos similares que se pueden activar en una sola etapa. Un ejemplo de este último es el succinil-βALAL-doxorrubicina que se convierte fácilmente, por ejemplo, por CD10 en L-Dox que puede entrar en la célula por sí misma (Pan y col. 2003, Cancer Res 63, 5526-5531). La estrategia de múltiples

etapas de activación produjo un profármaco PhAc-ALGP-doxorrubicina que es aproximadamente 20 a 40 veces menos tóxico que la doxorrubicina que varía con el modo de administración (IV o IP), y entre 6 y 14 veces menos tóxico que el succinil- β -ALAL-doxorrubicina. El PhAc-ALGP-doxorrubicina carece de cardiotoxicidad acumulativa crónica y no induce leucopenia y linfopenia. Es más activo que la doxorrubicina en xenoinjertos de tumor humano (incluido un sarcoma) y en un carcinoma de colon ortotópico. Por lo tanto, los profármacos de la invención se caracterizan además por ser activables, *in vitro* o *in vivo*, en al menos dos etapas, es decir, en un procedimiento que implica al menos dos escisiones proteolíticas esenciales por al menos dos proteasas diferentes. Una "escisión proteolítica esencial" se entiende en esta invención por ser una escisión que está asociada con un tumor o una célula asociada a tumor como su estroma, es decir, se produce específicamente en la vecindad directa de un tumor o células asociadas a tumor.

Endopeptidasas CD 10 y TOP

CD10 es una endopeptidasa neutra/una metalopeptidasa de la superficie celular dependiente de cinc que escinde pequeños péptidos en el lado amino de los aminoácidos hidrofóbicos. Además de estar presente en células normales como las células B y las células epiteliales del pulmón, colon y riñón, está presente en muchos tipos de tumores (Ravel y col. 2008, Clin Cancer Res 14, 1258-1265), como el cáncer de páncreas (Notohara y col. 2000, Am J Surg Pathol 24, 1361-1371), carcinoma hepatocelular (Karabork y col. 2010, Pathol Res Pract 206, 572-577), melanoma (Velazquez y col. 2007, J Transl Med 5, 2), cáncer de próstata (Song y col. 2004, Prostate 58, 394-405), carcinomas de células pequeñas de pulmón (Shipp y col. 1991, Proc Natl Acad Sci USA 88, 10662-10666), carcinoma renal, sarcoma endometrial y rhabdomyosarcoma (Chu y col. 2000, Am J Clin Pathol 113, 374-382). CD10 se expresa en casi la mitad de los sarcomas de tejidos blandos (histiocitomas, fibrosarcomas, rhabdomyosarcomas, leiomyosarcomas, liposarcomas, tumores malignos de la vaina del nervio periférico; Deniz y col. 2012, Pathol Res Pract 208, 281-285). Aún más interesante y similar a la distribución estromal de FAP, CD10 se encuentra en las células estromales de carcinomas colorrectales (Hirano y col. 2012, Pathol Int 62,600-611), cáncer de mama (Desmedt y col. 2012, Clin Cancer Res 18, 1004-1014; Marketsov y col. 20, 84-89), tumores endocrinos pancreáticos (Deschamps y col. 2006, Hum Path 37, 802-808), carcinoma gástrico (Huang y col. 2005, Jpn J Clin Oncol 35, 245-250) y carcinoma de células basales (Yada y col. 2004, Am J Dermatopathol 26, 463-473).

TOP (thimet oligopeptidasa) es una metaloendoproteasa citoplasmática principal dependiente de tiol distribuida en muchos tejidos y tipos de células. Puede alcanzar una ubicación extracelular tanto mediante la secreción de la enzima soluble como mediante la unión a la membrana plasmática. Se distribuye en muchos tejidos y tipos de células. TOP está involucrada en la señalización neuroendocrina y en el metabolismo extracelular de neuropéptidos (Corie y col. 2002, Endocrine Rev 23, 647-664). Está involucrada en el metabolismo de las proteasomas (Saric y col. 2004, J Biol Chem 279, 46723-46732). TOP está involucrada en el procesamiento de neuropéptidos en próstata y cáncer de próstata (Swanson y col. 2004, Protein Pept Lett 5, 471-478) y se encuentra en medios acondicionados de células tumorales. Se puede liberar de células dañadas o necróticas. Su actividad se reduce en medios oxigenados y se mejora en entornos anóxicos que muy a menudo son característicos de tumores sólidos. TOP se expresa en la superficie de las células endoteliales y desempeña un papel en el metabolismo de péptidos vasoactivos (Norman y col. 2003, Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, H1978-1984; Shivakumar y col. 2005, Cell Biochem Funct 23, 195-204). TOP se detecta mediante inmunotinción en 113 de 147 carcinomas de mama en células tumorales y estromales. Se expresa tanto en carcinoma como en células del estroma en 88 biopsias de carcinoma de próstata de 98 (Ravel y col. 2008, Clin Cancer Res 14, 1258-1265). TOP es responsable de la activación extracelular del succinil- β -ALAL-doxorrubicina y PhAc-ALGP-doxorrubicina (Dubois y col. 2006, Eur J Cancer 42, 3049-3056).

Dipeptidil proil peptidasas DPIV (CD26) y FAP

DPIV es una dipeptidil proil peptidasa con un amplio espectro de actividad e incluye una gran cantidad de sustratos fisiológicos. Se expresa en células epiteliales de una gran cantidad de órganos. Se expresa en timo bazo y ganglios linfáticos, así como en linfocitos. DPIV se une al colágeno y la fibronectina en condiciones experimentales (Loster y col. 1995, Biochem Biophys Res Commun 217, 341). Está autoregulado en las neoplasias tumorales de células T (Dang y col. 2002, Histo Histopathol 17, 1213-1226) y en diferentes adenocarcinomas, como en el carcinoma hepatocelular (Stecca y col. 1997, J Hepatol 27, 997-945), carcinoma de tiroides (Tanaka y col. 1995, Int J Cancer 64, 326-331), en meningiomas (Yu y col. 2010, FEBS Journal 277, 1126-1144; Stremenoova y col. 2010, Int J Oncology 36, 351-358), en adenocarcinomas esofágicos (Goscinski y col. 2008, APMIS 116, 823-831), en adenocarcinomas de pulmón (Asada y col. 1993, Histopatología 23, 265-270) y en hueso y tumores de tejidos blandos (Dohi y col. 2009, Histopathology 4, 432-440). DPIV se expresa en células madre cancerosas de cáncer colorrectal humano y de mesoteliomas humanos (Pang y col. 2010, Cell Stem Cell 6, 603-615; Yamazaki y col. 2012, Biochem Biophys Res Commun 419, 529-536).

FAP es una dipeptidil exopeptidasa con especificidad muy limitada restringida a dipéptidos de glicina-prolina, alanina-prolina y lisina-prolina y también es una colagenasa de tipo I. Sin embargo, también puede actuar como endopeptidasa (Siew lai y col. 2007, Bioconj Chem 18, 1245-1250). FAP está ausente en tejidos adultos normales como el epitelial, mesenquimatoso; células neurales y linfoides como los linfocitos. Está ausente en los tumores no malignos. Más importante aún, está autoregulado, no en las células tumorales en sí, sino en las células reactivas de fibroblastos, estromas y angiogénicas presentes en los tumores epiteliales y de sarcoma con la excepción del sarcoma de Ewing (Yu y col. 2010, FEBS Journal 277, 1126-1144; Brennen y col. 2012, Mol Cancer Ther 11, 257-

269). Desempeña un papel importante en el cáncer de colon (Leonard y col. 2007, Clin Cancer Res 13, 1736-1741), melanoma (Fazakas y col. 2011, PLoS one 6, e20758; Artym y col. 2002, Carcinogenesis 23, 1593-1601), cáncer de páncreas (Hyung-Ok y col. 2011, BMC Cancer 11, 245; Min y col. 2012, World J Gastroenterol 28, 840-846), cáncer gástrico (Zhi y col. 2010, J Exp Clin Cancer Res 29, 66; Mori y col. 2004, Oncology 67, 411-419), cáncer de pulmón no pequeño (Bremnes y col. 2011, J Thorac Oncol 1, 209-217), glioma (Menlein 2011, Biol Chem 392, 199-207), cánceres de piel (Huber y col. 2006, J Cut Pathol 2, 145-155), carcinoma cervical (Jin y col. 2003, Anticancer Res 4, 195-0198), carcinoma de tiroides (Nocolini y col. 2011, Biochem Pharmacol 7, 778-780), carcinoma rectal (Saaigusa y col. 2011, Int J Oncol 3, 655-663), carcinoma esofágico (Goscinski y col. 2008, Ultrastruct Pathol 3, 89-96), en cáncer de mama (Huang y col. 2011, Clin Exp Metastasis 6, 567-579), y en hueso y tumores de tejidos blandos (Dohi y col. 2009, Histopathology 4, 432-440). Las células reactivas del estroma de las células tumorales son esenciales para el crecimiento de las células tumorales, así como para sus capacidades invasivas y angiogénicas (Santos y col. 2009, J Clin Invest 119, 3613-3625; Cheng y col. 2002, Cancer Res 62, 4767-4772; Huang y col. 2004, Cancer Res 64, 2712-2716).

Sobre la base de los ejemplos (véase, p. ej., el ejemplo 16), se pueden prever varios procedimientos de detección de profármacos candidatos según la invención. Dichos procedimientos incluyen procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos), que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con un dipéptido GP, AP o KP para obtener un GP-D, AP-D o KP-D como profármaco intermedio de fármaco dipéptido;

(iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y dicho profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D independientemente con células cultivadas *in vitro*;

(iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y

(vi) seleccionar $[C_x-OP]_y-D$ correspondiente al profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En el procedimiento anterior, el término "correspondiente a" debe entenderse de tal manera que el profármaco candidato seleccionado $[C_x-OP]_y-D$ comprenda el mismo fármaco D que está presente en el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP -D o KP-D identificado por tener una actividad citotóxica comparable con el fármaco D. Opcionalmente, el fármaco D está conectado al resto de oligopéptido OP en el mismo estado en que está conectado al dipéptido GP, AP o KP en el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D. En otras palabras, el éxito del profármaco intermedio de fármaco dipéptido identificado en la etapa (v) GP-D, AP-D o KP-D es indicativo o predictivo para el éxito del profármaco candidato $[C_x-OP]_y-D$ donde OP representa un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi-terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP). Dicha extrapolación es plausible en vista de los resultados extensos descritos en esta invención, obtenidos con doxorubicina como fármaco D. Cuando un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D

o KP-D tiene una actividad citotóxica comparable a la actividad citotóxica del fármaco D, esta es una buena indicación de la activación exitosa de dicho profármaco al fármaco libre D por las células cultivadas. Las células cultivadas utilizadas en este tipo de detección pueden ser, por ejemplo, una línea celular tumoral cultivada.

5 En una realización particular, el péptido OP en la estructura general mencionada anteriormente es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10). Por tanto, en dicha realización, la presente invención proporciona procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

10 donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

15 D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

20 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador; y

donde dicho procedimiento de detección comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

25 (ii) conjugar el fármaco D con un dipéptido GP, AP o KP para obtener un GP-D, AP-D o KP-D como profármaco intermedio de fármaco dipéptido;

(iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y dicho profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D independientemente con células cultivadas *in vitro*;

(iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D;

30 (v) identificar a partir de (iv) un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y

(vi) seleccionar $[C_x-OP]_y-D$ correspondiente al profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

35 Como alternativa, dichos procedimientos son procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

40 OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

45 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se

unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (i) obtener el fármaco D;
- 5 (ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;
- (iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y profármaco $[C_x-OP]_y-D$ independientemente con células cultivadas *in vitro*;
- (iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco $[C_x-OP]_y-D$;
- (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y
- 10 (vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En los procedimientos de detección mencionados anteriormente, la expresión "actividad citotóxica comparable" debe entenderse de manera que un profármaco, después del contacto con las células cultivadas *in vitro* (como las células tumorales cultivadas), ejerza al menos un 50 % o al menos entre 50 y 99 % (p. ej., al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos el 99 %) de la actividad citotóxica ejercida por el fármaco libre en contacto con las mismas células cultivadas *in vitro* en las mismas condiciones.

En otra alternativa, dichos procedimientos son procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

20 donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGp (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO:10); en particular, OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

25 D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

30 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (i) obtener el fármaco D;
- 35 (ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;
- (iii) poner en contacto el profármaco $[C_x-OP]_y-D$ durante 5 h a 37 °C con células cultivadas *in vitro*;
- (iv) determinar la conversión del profármaco $[C_x-OP]_y-D$ en el fármaco libre D;
- (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ que se convierte al menos en un 50 % en D; y
- (vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

40 En otra alternativa más, dichos procedimientos son procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la

estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con un dipéptido GP, AP o KP para obtener un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D;

(iii) poner en contacto el profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D durante 3 h a 37 °C con peptidasas FAP y/o DPIV aisladas;

(iv) determinar la conversión del profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D en el fármaco libre D;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D que se convierte al menos en un 50 % en D; y

(vi) seleccionar $[C_x-OP]_y-D$ correspondiente al profármaco intermedio de fármaco dipéptido GP-D, AP-D o KP-D identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En el procedimiento anterior, el término "correspondiente a" debe entenderse de tal manera que el profármaco candidato seleccionado $[C_x-OP]_y-D$ comprenda el mismo fármaco D que está presente en el profármaco GP-D identificado para tener una conversión de al menos 50 % en D en las condiciones definidas. Opcionalmente, el fármaco D está conectado al resto de oligopéptido OP en el mismo estado en que está conectado el dipéptido GP en el profármaco GP-D. En otras palabras, el éxito del profármaco identificado en la etapa (v) GP-D es indicativo o predictivo para el éxito del profármaco candidato $[C_x-OP]_y-D$ donde OP es el péptido ALGP. Dicha extrapolación es plausible en vista de los resultados extensos descritos en esta invención, obtenidos con doxorubicina como fármaco D.

Otros procedimientos previstos incluyen procedimientos de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;

y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador tal como un grupo espaciador autoinmolativo o auto eliminable, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- (i) obtener el fármaco D;
- (ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;
- (iii) poner en contacto el profármaco $[C_x-OP]_y-D$ durante 3 h a 24 h a 37 °C con peptidasas CD 10 y/o TOP aisladas y con peptidasas FAP y/o DPIV aisladas;
- (iv) determinar la conversión del profármaco $[C_x-OP]_y-D$ en el fármaco libre D;
- (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ que se convierte al menos en un 50 % en D; y
- (vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

En cualquiera de los procedimientos de detección anteriores que se refieren a la conversión de un profármaco GP-D o de un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ a fármaco D, el porcentaje de conversión utilizado para seleccionar el profármaco candidato en general se encuentra dentro de al menos 50 a 100 % (p. ej., al menos 50 %, p. ej., al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %).

En cualquiera de los procedimientos de detección alternativos anteriores, dicho grupo de bloqueo C puede ser un grupo fosfonoacetilo. En una realización particular, el OP en uno cualquiera de los procedimientos de detección anteriores es un péptido con una longitud mínima de 4 aminoácidos consecutivos (tetrapéptido) y una longitud máxima de 8 aminoácidos (es decir, un péptido con una longitud de 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos) que comprende carboxi terminalmente un dipéptido que comprende prolina seleccionado del grupo que consiste en glicina-prolina (GP), alanina-prolina (AP) y lisina-prolina (KP); más en particular, un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), ALAP (SEQ ID NO:3), TSGP (SEQ ID NO:4), TSAP (SEQ ID NO:5), KLGP (SEQ ID NO:6), KLAP (SEQ ID NO:7), ALKP (SEQ ID NO:8), TSKP (SEQ ID NO:9) o KLKP (SEQ ID NO: 10); aún más en particular OP es el tetrapéptido ALGP (SEQ ID NO:1).

En cualquiera de los procedimientos de detección alternativos anteriores, dicho fármaco D puede seleccionarse del grupo que consiste en doxorubicina, maitansina, geldanamicina, paclitaxel, docetaxel, camptotecina, vinblastina, vincristina, vindesina, metotrexato, aminopterina, amrubicina o un derivado de cualquiera de los mismos.

La invención se refiere además a kits que comprenden un recipiente que comprende un profármaco o sal del mismo según la invención o que comprende una composición que comprende dicho profármaco o sal del mismo. Dicho kit puede comprender, además, en el mismo recipiente (que contiene un profármaco o una sal del mismo según la invención) o en uno o más recipientes separados, uno o más fármacos contra el cáncer adicionales, tales como un anticuerpo o fragmento del mismo (p. ej., como se describió anteriormente). Como alternativa, o además, dicho kit puede comprender además, en el mismo recipiente (que contiene un profármaco o una sal del mismo según la invención) o en uno o más recipientes separados, uno o más agentes reversores de resistencia a fármacos. Otros componentes opcionales de dicho kit incluyen uno o más agentes de diagnóstico capaces de determinar el éxito de una terapia que comprende un profármaco o una sal del mismo según la invención; instrucciones de uso; uno o más recipientes con vehículos, excipientes o diluyentes estériles farmacéuticamente aceptables; uno o más recipientes con agentes para la terapia ADEPT; etc.

Todas las referencias anteriores y citadas a continuación se incorporan en su totalidad por su referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de compuestos profármaco de péptidos con bloqueo en N

1. Síntesis de Fmoc-péptido-OH

1,1. Síntesis de Fmoc-ALAL-OH

La resina Fmoc-Leu-Wang (5 g, 1 eq) se hinchó en dimetilformamida (20 ml) durante 30 minutos. El grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) se eliminó mediante tratamiento con piperidina (4 ml) en dimetilformamida (16 ml) durante 3 minutos, a continuación, se filtró la resina, seguido del mismo tratamiento durante 3 y 7 minutos. La resina se lavó con dimetilformamida (20 ml) tres veces. Fmoc-Ala-OH (2 eq) y 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (2 eq) se solubilizaron en dimetilformamida (20 ml) y se añadió N, N-diisopropiletilamina (4 eq). La mezcla se preactivó durante 6 minutos y se añadió a la resina. A continuación, se agitó la resina durante 60 minutos y se lavó tres veces con dimetilformamida (20 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina (4 ml) en dimetilformamida (16 ml) durante 3 minutos, a continuación, se filtró la resina. El mismo tratamiento se repitió dos veces durante 3 y 7 minutos. La resina se lavó tres veces con dimetilformamida (20 ml). Se repitió el mismo protocolo con Fmoc-leucina-OH (2 eq) y con Fmoc-alanina-OH (2eq).

Después del último acoplamiento, la resina se lavó alternativamente con dimetilformamida (20 ml) y diclorometano

(20 ml) tres veces y se secó. El péptido Fmoc se escindió de la resina con una solución de ácido trifluoroacético/triisopropilsilano/agua (95:2,5:2,5 v/v/v) (20 ml) durante 2 horas. El disolvente se evaporó. El producto se precipitó en agua y se filtró. El péptido Fmoc se secó por liofilización.

MS (ES): 609,3 [MH]⁺; pureza: 90 % (determinado por HPLC a 214 nm).

5 1.2 Síntesis de Fmoc-ALG-OH

Preparado como se describió en el párrafo 1.1. comenzando con una resina Fmoc-Gly-Wang en lugar de una resina Fmoc-Leu-Wang y añadiendo Lmoc-Leu y Lmoc-Ala.

MS (ES⁺): 482,2 [MH]⁺; pureza: 92 % (determinado por HPLC a 214 nm).

1,3. Síntesis de Fmoc-ALPF-OH

10 Preparado como se describió en el párrafo 1.1. comenzando con una resina Fmoc-Phe-Wang en lugar de resina Fmoc-Leu-Wang y añadiendo Fmoc-Pro; Fmoc-Leu y Fmoc-Ala.

MS (ES⁺): 669 [MH]⁺; pureza: 98 % (determinado por HPLC a 214 nm).

1.4 Síntesis de Fmoc-ALAF-OH

15 Preparado como se describió en el párrafo 1.3. comenzando con una resina Fmoc-Phe-Wang y añadiendo Fmoc-Ala; Fmoc-Leu y F-moc-Ala.

MS (ES⁺): 643 [MH]⁺; pureza: 90 % (determinado por HPLC a 214 nm).

1,5. Síntesis de Fmoc-AIG-OH

Preparado como se describió en el párrafo 1.1. comenzando con una resina Fmoc-Gly-Wang en lugar de una resina Fmoc-Leu-Wang y añadiendo Fmoc-Ile y Lmoc-Ala.

20 MS (ES): 482,5 [MH]⁺; pureza: 60 % (determinado por HPLC a 214 nm).

1,6. Síntesis de Fmoc-KLG-OH

Preparado como se describió en el párrafo 1.1. comenzando con una resina Fmoc-Gly-Wang en lugar de una resina Fmoc-Leu-Wang y añadiendo Fmoc-Leu y Lmoc-Lys (IvDde).

MS (ES⁺): 744 [MH]⁺

25 1,7. Síntesis de Fmoc-GPG-OH

Preparado como se describió en el párrafo 1.1. comenzando con una resina Fmoc-Gly-Wang en lugar de una resina Fmoc-Leu-Wang y añadiendo Fmoc-Pro y F-moc-Gly.

MS (ES⁺): 452 [MH]⁺

2. Síntesis de conjugados péptido-doxorrubicina

30 2.1 Síntesis de NH₂-ALAL-doxorrubicina

35 La doxorrubicina (1 eq) se solubilizó en dimetilformamida (10 ml). Se añadió una solución de Fmoc-ALAL-OH (1,2 eq) en dimetilformamida (2 ml) a la doxorrubicina y el pH se ajustó a pH 8 con N, N-diisopropiletilamina. La solución se agitó a TA y se añadió el hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (1,2 eq) en dimetilformamida (2 ml). El pH de la solución se verificó y reajustó a pH 8-8,5. La solución se agitó a temperatura ambiente y se verificó por HPLC. Si la reacción se completaba, el grupo Fmoc se eliminaba mediante tratamiento con piperidina (10 % de volumen final) durante 5 minutos a TA y se añadía el tampón de lactato 10 % pH 3 a 0 °C. La mezcla se cargó en YMC. El producto se recuperó con MeOH y el disolvente se evaporó. El ALAL-doxorrubicina se purificó por HPLC semipreparativa (columna Luna C18).

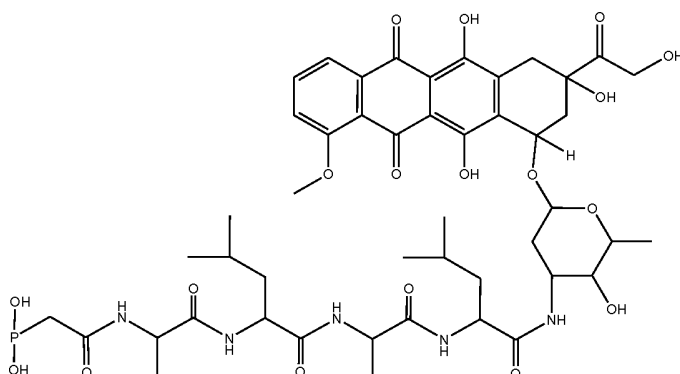
MS (ES): 912 [MH]⁺; pureza: 95 % (determinado por HPLC a 214 nm).

40 2.2 Síntesis de NH₂-Pro-doxorrubicina y NH₂-Gly-Pro-doxorrubicina

45 La doxorrubicina (1 eq) se solubilizó en dimetilformamida (10 ml). Se añadió una solución de Fmoc-prolina-OH (1,2 eq) en dimetilformamida (2 ml) a la doxorrubicina y el pH se ajustó a pH 8-8,5 con N,N-diisopropiletilamina. La solución se agitó a TA y se añadió el hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (1,2 eq) en dimetilformamida (2 ml). El pH de la solución se verificó y reajustó a pH 8-8,5. La solución se agitó a temperatura ambiente y se verificó por HPLC. Si la reacción se completaba, el grupo Fmoc se eliminaba mediante tratamiento con piperidina (10 % de volumen final) durante 5 minutos a TA y se añadía el tampón de lactato 10 % pH

MS (ES+): 1004,4 [MH]⁺; pureza: 99 % (determinado por HPLC a 214 nm).

3.2 Síntesis de PhAc-ALAL-doxorrubicina

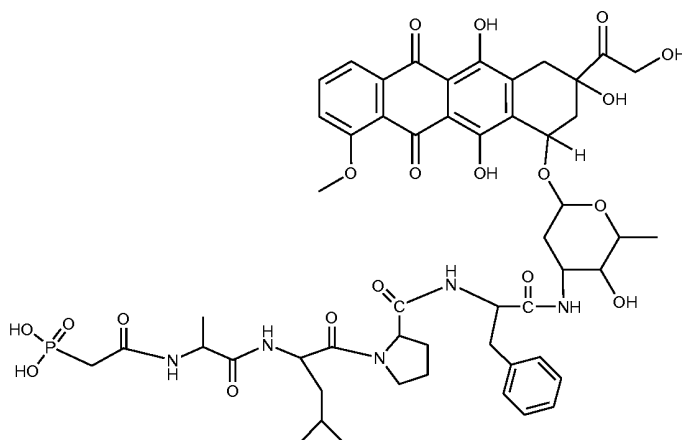


Compuesto II

5 NH₂-ALAL-Dox (1 eq) se solubilizó en dimetilformamida (10 ml). Se añadió una solución de ácido fosfonoacético (2,5 eq) en dimetilformamida (2 ml) al péptido-doxorrubicina y el pH se ajustó a pH 8 con N,N-diisopropiletilamina. La solución se agitó a TA y se añadió el hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (2 eq) en dimetilformamida (2 ml). El pH de la solución se verificó y reajustó a pH 8-8,5. La solución se agitó a temperatura ambiente y se verificó por HPLC. Si la reacción se completaba, la mezcla se precipitaba con éter dietílico y se filtraba. El producto se recuperó con MeOH y el disolvente se evaporó. El PhAc-ALAL-doxorrubicina se purificó por HPLC semipreparativa (columna Luna, C18).

MS (ES+): 1034 [MH]⁺; pureza: 99 % (determinado por HPLC a 214 nm).

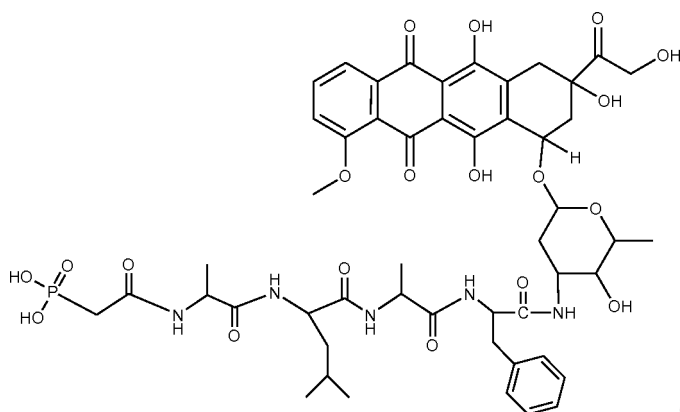
3.3. Síntesis de PhAc-ALPF-doxorrubicina



Compuesto III

15 Preparado como se describió en 3.2 con NH₂-ALPF-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox. MS (ES+): 1094 [MH]⁺; pureza: 92 % (determinado por HPLC a 214 nm).

3.4. Síntesis de PhAc-ALAF-doxorrubicina



Compuesto IV

Preparado como se describió en 3.2 con NH₂-ALAF-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox.

MS (ES+): 1068 [MH]⁺; pureza: 97 % (determinado por HPLC a 214 nm).

3.5. Síntesis de PhAc-DLGP-doxorrubicina

5 PhAc-D (Dmab)LGP-doxorrubicina se preparó como se describió en 3.2 con NH₂-D (Dmab)LGP-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox. El grupo protector Dmab, también conocido como 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}bencilo, se eliminó con hidrato de hidrazina al 2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tampón de lactato 10 % pH 3 se añadió a 0 °C y la mezcla se cargó en YMC. El producto se recuperó con MeOH y el disolvente se evaporó. El PhAc-DLGP-doxorrubicina se purificó por HPLC semipreparativa (columna Luna, C18).

MS (ES+): 1048,3 [MH]⁺; pureza: 99 % (determinado por HPLC a 214 nm).

10 3.6. Síntesis de PhAc-TSGP-doxorrubicina

15 PhAc-T (Dmab)SGP-doxorrubicina se preparó como se describió en 3.2 con NH₂-T (Dmab)SGP-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox. El grupo protector Dmab se eliminó con hidrato de hidrazina al 2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tampón de lactato 10 % pH 3 se añadió a 0 °C y la mezcla se cargó en YMC. El producto se recuperó con MeOH y el disolvente se evaporó. El PhAc-TSGP-doxorrubicina se purificó por HPLC semipreparativa (columna Luna, C18).

MS (ES): 1008,3 [MH]⁺; pureza: 99 % (determinado por HPLC a 214 nm).

3.7. Síntesis de PhAc-ALGP-doxorrubicina

Preparado como se describió en 3.2 con NH₂-ALGP-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox.

MS (ES+): 1004,3 [MH]⁺; pureza: 99 % (determinado por HPLC a 214 nm).

20 3.8. Síntesis de PhAc-KLGP-doxorrubicina

PhAc-K(IvDde)LGP-doxorrubicina se preparó como se describió en 3.2 con NH₂- K(IvDde)LGP-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox. El grupo protector IvDde se eliminó con hidrato de hidrazina al 2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tampón de lactato 10 % pH 3 se añadió a 0 °C y la

mezcla se cargó en YMC. El producto se recuperó con MeOH y el disolvente se evaporó. El PhAc-KLGP-doxorrubicina se purificó por HPLC semipreparativa (columna Luna, C18).

MS (ES+): 1061 [MH]⁺; pureza: 91,5 % (determinado por HPLC a 214 nm).

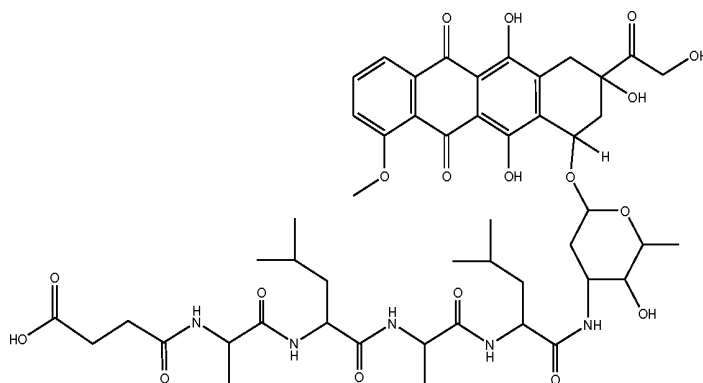
3.9. Síntesis de PhAc-GPGP-doxorrubicina

Preparado como se describió en 3.2 con NH₂-GPGP-Dox en lugar de NH₂-ALAL-Dox.

MS (ES+): 974,9 [MH]⁺; pureza: 98 % (determinado por HPLC a 214 nm).

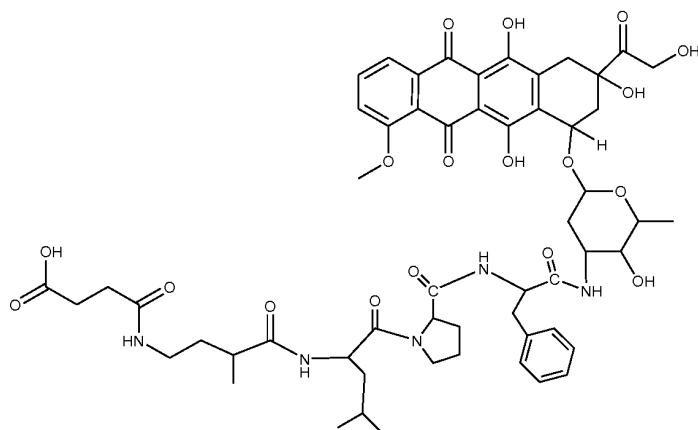
30 Se usaron procedimientos de síntesis similares como se describió anteriormente para la síntesis de PhAc-TSGP-doxorrubicina y PhAc-KLGP-doxorrubicina

4. Síntesis de succinil-βALAL-doxorrubicina y de succinil-βALPF-doxorrubicina



Compuesto V

Succinil-βALAL-doxorrubicina



Compuesto VI

Succinil- β ALPF-doxorrubicina

El succinil- β ALAL-doxorrubicina y el succinil- β ALPF-doxorrubicina se generaron como se describió anteriormente por Fernández AM y col., J. Med. Chem., 44: 3750-3753 (2001).

5 Ejemplo 2. Evaluación *in vitro* de la estabilidad de profármacos de péptidos con bloqueo en N en sangre y plasma

Procedimiento

10 Se usó sangre y plasma humanos citrados de donantes sanos (pH 7, Innovative Research) para evaluar la estabilidad de los conjugados de fármacos bloqueados con fosfonoacetilo (PhAc-ALAL-Dox, PhAc-ALPF-Dox, PhAc-ALAF-Dox, PhAc-ALGP- Dox, PhAc-DLGP-Dox y PhAc-KLGP-Dox) en comparación con el conocido conjugado profármaco succinil- β ALAL-Dox.

15 Los conjugados del fármaco (50 μ M) se mezclaron con plasma humano y se incubaron durante 5 horas a 37 °C en un baño de agua. Se recogieron cincuenta μ l de muestras después de 0, 1, 3 o 5 horas y se realizó una extracción inmediatamente: se añadieron 150 μ l de acetonitrilo a las muestras de 50 μ l. Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante. Las muestras

Resultados

20 De manera similar a Suc- β ALAL-Dox, se demostró que todos los conjugados bloqueados probados eran estables en plasma humano y sangre humana. Después de 5 horas de incubación a 37 °C en presencia de sangre o plasma, se detectaron 10 % o menos de derivados metabólicos de los conjugados de doxorubicina en las

muestras analizadas (excepción: PhAc-ALAL-Dox que proporciona 15 % de metabolitos en sangre; los datos se resumen en la tabla 1 y 2).

Tabla 1.

Compuestos	% de metabolitos liberados después de 5 horas de incubación a 37 °C en sangre humana citrada						% de metabolitos totales
	Dox	L-Dox	AL-Dox	GP-dox	F-Dox	P-Dox	
Suc- β ALAL-Dox	2	6	1	-	-	-	9
PhAc-ALAL-Dox	9	6	0	-	-	-	15
PhAc-ALPF-Dox	4	-	-	-	1	-	5
PhAc-ALAF-Dox	5	-	-	-	5	-	10
PhAc-ALGP-Dox	6	-	-	3	-	0	9
PhAc-DLGP-Dox	2	-	-	0	-	2	4
PhAc-KLGP-Dox	2	-	-	1	-	0	8

LGP-Dox	71			8			
GP-Dox	71						

Tabla 2.

Compuestos	% de metabolitos liberados después de 5 horas de incubación a 37 °C en plasma humano citratado						% de metabolitos totales
	Dox	F-dox	AF-Dox	GP-dox	F-Dox	P-Dox	
Suc-βALAL-Dox	<1	2	0	-	-	-	2
PhAc-ALAL-Dox	<1	2	0	-	-	-	2
PhAc-ALPF-Dox	0	-	-	-	0	-	0
PhAc-ALAL-Dox	0	-	-	-	2	-	2
PhAc-ALGP-Dox	2	-	-	0	-	0	2
PhAc-DLGP-Dox	2	-	-	0	-	1	3
PhAc-GPGP-Dox	6	-	-	0	-	0	6
PhAc-TSGP-Dox	4	-	-	4	-	0	8
LGP-Dox	63			2			
GP-Dox	50						

Ejemplo 3. Evaluación *in vitro* de la activación enzimática de profármacos de péptidos con bloqueo en N

5 1. Procedimiento

1,1. Ensayo de reactivación en presencia de peptidasas secretadas por células tumorales

Cultivos subconfluentes de células tumorales LS-174T se lavaron dos veces con una solución salina de tampón fosfato, y se añade medio de cultivo fresco (DMEM-F12 sin rojo fenol) que contenía 0,02 % de albúmina de suero bobino (100 µl/cm²). Después de 24 horas de incubación, el medio acondicionado se recoge, se centrifuga durante 10 minutos a 300 g, se tampona con Tris-HCl 1 M, pH 7,4 (1 volumen de tampón + 19 volúmenes de medio) y se concentra 20 veces por ultracentrifugación (umbral de corte de 10 kDa).

Los compuestos farmacológicos (50 µM) se incubaron durante 0, 1, 3 o 5 horas a 37 °C en presencia de medio acondicionado de células tumorales LS174T recién preparado. Se recogieron cincuenta µl de muestra en cada punto de tiempo y se procesaron como se describió anteriormente para plasma humano.

15 1.2 Ensayo de reactivación en presencia de enzimas purificadas (TOP, CD 10, CD26, FAP)

CD10 (neprilisina humana recombinante, sistemas de I+D, Ref. 1182-ZN) se diluyó a 20 nM en MES 0,1 M pH 6,5 suplementado con 0,2 mg/ml de BSA. TOP (thimet oligopeptidasa humana recombinante, sistemas de I+D, Ref. 3439-ZN) se diluyó a 10 nM en una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,4/NaCl 0,5 M/DTT 0,1 M. CD26 y FAP se diluyeron a 1 µg/ml en un tampón Tris-HCl pH 7,5. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 50 µM de cada compuesto a soluciones enzimáticas (solución enzimática 1 V + solución farmacológica 1 V 100 µM). Las muestras se incubaron durante 0, 1 o 3 horas a 37 °C en un baño de agua en presencia de enzimas purificadas. Se recogieron cincuenta µl de muestra en cada punto de tiempo y se procesaron como se describió anteriormente para plasma humano. La activación de Suc-βALAL-dox se ensayó en paralelo como referencia.

1,3. Resultados

25 Los resultados de los ensayos de reactivación *in vitro* de conjugados de péptido-doxorrubicina bloqueados en N se presentan en la tabla 3.

Suc-βALAL-Dox es escindido por CD10 para liberar el 73 % de L-Dox. Por el contrario, PhAc-ALAL-Dox no es

5 escindido eficientemente por CD10. Menos del 5 % de L-Dox se libera después de 3 horas de incubación en presencia de la enzima. En este ejemplo, el reemplazo del succinil-A- por el grupo de bloqueo con fosfonoacetilo inhibe la interacción péptido-enzima. PhAc-ALAF-Dox es moderadamente escindido por CD10 en F-Dox. Cambiar el resto del péptido ALAF a ALPF, inhibe la escisión por CD10, sea cual sea el grupo de bloqueo utilizado. PhAc-ALGP-Dox es escindido por la enzima en LGP-Dox (25 % de metabolito liberado después de 3 horas de incubación a 37 °C). PhAc-AIGP-Dox se escinde por CD10 en IGP-Dox (hidrólisis al 18 % después de 3 horas de incubación). PhAc-DLGP-Dox y PhAc-GPGP-Dox, PhAc-KLGP-Dox y PhAc-TSGP-Dox no están activados o muy levemente por CD10.

10 TOP hidroliza Suc-βALAL-Dox y PhAc-ALAL-Dox para liberar 64 % y 44 % de AL-Dox respectivamente. TOP no escinde ninguno de los derivados de ALAF-Dox y ALPF-Dox.

TOP activa PhAc-ALGP-Dox, PhAc-KLGP-Dox y PhAc-TSGP-Dox en GP-Dox (72, 31 y 38 % del metabolito detectado después de 3 horas de incubación en presencia de la enzima). TOP no escinde PhAc-DLGP-Dox, PhAc-GPGP-Dox PhAc-AIGP-Dox

15 La sensibilidad de los profármacos tetrapeptídicos Dox bloqueados a TOP y CD10 no es contradictoria con su estabilidad sanguínea. La mayoría de las peptidasas sanguíneas son exoproteasas para las cuales los profármacos Dox tetrapeptídicos bloqueados son inaccesibles como sustratos. TOP y CD10 son, sin embargo, endoproteasas no afectadas por la presencia del grupo de bloqueo.

20 Suc-βALAL-Dox y PhAc-ALAL-Dox son activados por enzimas secretadas por células tumorales para liberar L-Dox y, en menor medida, AL-Dox y Dox. PhAc-ALAF-Dox, PhAc-ALPF-Dox y Suc-βALPF-Dox se activan en F-Dox por las enzimas secretadas por las células tumorales. PhAc-ALGP-Dox se hidroliza en presencia de medio acondicionado de células tumorales en GP-Dox y Dox (56 % y 24 % de todos los metabolitos detectados después de 5 horas, respectivamente), mientras que principalmente GP-Dox se detecta después de la activación de PhAc-KLGP- Dox y PhAc-TSGP-Dox. PhAc-DLGP-Dox, PhAc-AIGP-Dox y PhAc-GPGP-Dox no se activan en presencia de peptidasas secretadas por células tumorales LS174T.

25 No se muestran diferencias significativas entre los grupos protectores PhAc- y Suc-βA para los derivados ALAL-Dox y ALPF-Dox.

En estos experimentos, los compuestos PhAc-ALAL-Dox y PhAc-ALGP-Dox se escinden mejor mediante enzimas secretadas por células tumorales y se han seleccionado para su posterior análisis *in vivo*.

30 Ni CD26 ni FAP hidrolizaron PhAc-ALGP-Dox, Suc-βALAL-Dox o LGP-Dox, en línea con estas enzimas que son exoproteasas/dipeptidilprolina-proteinasa. GP-Dox, sin embargo, es un buen sustrato para CD26 (97 % de conversión a Dox después de 3 h de incubación a 37 °C) y FAP (62 % de conversión a Dox después de 3 h de incubación a 37 °C).

35 Las células tumorales cultivadas pueden convertir PhAc-ALGP-Dox a GP-Dox, LGP-Dox a Dox y GP-Dox a Dox, lo que indica la presencia de CD10 y/o TOP (PhAc-ALGP-Dox a LGP-Dox o GP-Dox) por un lado y de CD26 y/o FAP (GP-Dox a Dox) por otro lado. Esto también confirma un procedimiento de activación de dos etapas del profármaco que se produce completamente extracelularmente, es decir, no se requiere el procesamiento intracelular (lisosómico) del profármaco. Esto está en contraste con L-Dox

(liberado de Suc-βALAL-Dox) que se internaliza y se hidroliza más intracelularmente en Dox.

Tabla 3.

Compuestos	CD10 10 nM	% de metabolitos liberados después de 3 h	TOP 5 nM	% de metabolitos liberados después de 3 h	LS174T CM20xccc	% de metabolitos liberados después de 5 h
Suc-βALAL-Dox	+	73± 17 L-Dox	+	64± 10 AL-Dox	+	65± 17 Dox +AL-Dox +L-Dox
Suc-βALPF-Dox	-*	<5 F-Dox	-	0	+	17 ±2 F-Dox
PhAc-AL AL- Dox	-*	<5 L-Dox	+	44 ±6 AL-Dox	+	65± 19 Dox +AL- Dox+L- Dox

PhAc-ALPF-Dox	-	0	.*	<5 F-Dox	+	11 ±6 F-Dox
PhAc-AL AF-Dox	+	24±5 F-Dox+L AF- Dox	.*	<5 F-Dox	+	32± 15 F-Dox
PhAc-ALGP-Dox	+	25 ±4 LGP-Dox	+	72± 14 GP-Dox	+	81 ±31 Dox+GP- Dox+LGP- Dox
PhAc-DLGP-Dox	-	0	-	0	-	0
PhAc-AIGP-Dox	+	18±3 IGP-Dox	.*	<5 GP-Dox	.*	3±3 Dox+GP- Dox+IGP-Dox
PhAc-KLGP-Dox	.*	<5 LGP-Dox	+	31 ±5 GP-Dox	+	39± 13 Dox+GP-Dox
PhAc-GPGP-Dox	-	0	-	0	-	0
PhAc-TSGP-Dox	-	0	+	38 ±2 GP-Dox	+	35± 18 Dox+GP-Dox
LGP-Dox	-		-		+	Dox (23 %) + GP- Dox (77 %)
GP-Dox						Dox (28 %)

* menos del 5 % de los metabolitos detectados

5 Posteriormente, la sensibilidad de GP-Dox (liberado de PhAc-ALGP-Dox por TOP) como sustrato a la actividad de proil peptidasas se probó con más detalle, dos enzimas, CD26 (sinónimo DPPIV) y FAP, están surgiendo como factores potencialmente importantes en quimioterapia contra el cáncer. CD26 (1 µg/ml) o FAP no hidrolizaron PhAc-ALGP-Dox, LGP-Dox (liberado eficientemente de PhAc-ALGP-Dox por TOP) o Suc-βALAL-Dox. Sin embargo, se demostró que GP-Dox era un buen sustrato para CD26 y FAP y se escindió en Dox (97 % de conversión por CD26; 62 % de conversión por FAP). Es importante observar que, de esta manera, se incrementa la especificidad de PhAc-ALGP-Dox para las células cancerosas. TOP está involucrada en el procedimiento de activación de profármacos de Suc-βALAL-Dox o PhAc-ALAL-Dox (liberando AL-Dox) y de PhAc-ALGP-Dox (liberando GP-Dox). Mientras que AL-Dox es más sensible en general a la conversión en L-Dox y Dox por las peptidasas secretadas por las células 1 (y con L-Dox hidrolizado automáticamente en Dox por vía intracelular), GP-Dox parece sensible a las peptidasas liberadas predominantemente por las células tumorales, como CD26 y FAP. Es probable que esta diferencia en la sensibilidad y la diferencia en las enzimas involucradas en la activación de GP-Dox en Dox (en comparación con la activación de AL-Dox en Dox) provoque diferencias en las toxicidades y actividades entre, p. ej., PhAc-ALGP-Dox por un lado y Suc-βALAL-Dox o PhAc-ALAL-Dox por otro lado. Sobre la base de esto, y como se describe en el siguiente ejemplo, se evaluó la toxicidad *in vivo* de PhAc-ALGP-Dox en comparación con PhAc-ALAL-Dox.

Ejemplo 4. Evaluación de la toxicidad *in vivo* de los conjugados PhAc-ALGP-Dox y PhAc-ALAL-Dox después de inyecciones intravenosas únicas o múltiples en ratones

Procedimiento

20 PhAc-ALAL-Dox y PhAc-ALGP-Dox se disolvieron en solución salina. Los compuestos se administraron mediante inyección intravenosa en embolada en la vena lateral de la cola de ratones OF-1 (10 µl/g). La toxicidad *in vivo* se evaluó controlando el peso corporal.

Resultados

25 Los resultados en la figura 1 muestran la alta toxicidad de PhAc-ALAL-Dox a 160 µmol/kg. No se observa pérdida de peso corporal significativa en el grupo tratado con PhAc-ALAL-Dox a 80 µmol/kg. La inyección de PhAc-ALGP-Dox a

dosis de 240 y 320 $\mu\text{mol/kg}$ es bien tolerada. Se registra una pérdida moderada de peso corporal con un máximo del 15 % en el día 28 en el grupo tratado con PhAc-ALGP-Dox 240 $\mu\text{mol/kg}$ que muestra su menor toxicidad en comparación con PhAc-ALAL-Dox. La inyección de PhAc-ALGP-Dox a 320 $\mu\text{mol/kg}$ indujo una pérdida de peso corporal significativa y se encontró un ratón muerto en el día 12. Estos datos indican que la dosis máxima tolerada (MTD) de PhAc-

ALGP-Dox después de una sola inyección iv en embolada es entre 240 y 320 $\mu\text{mol/kg}$. La toxicidad de Dox varía entre 30 y 40 $\mu\text{mol/kg}$, lo que indica que después de una inyección intravenosa, PhAc-ALGP-Dox es al menos 6 veces menos tóxico.

Ejemplo 5. Estudios de eficacia de PhAc-ALGP-Dox después de repetidas inyecciones iv en embolada en modelos de tumor de xenoinjerto humano en ratones desnudos

Procedimiento

La actividad antitumoral de doxorubicina y PhAc-ALGP-Dox se probó en modelos de ratones atímicos (NMRI desnudos/desnudos) con xenoinjertos ectópicos de carcinoma de colon LS-174T humano o carcinoma mamario MX-1.

Los tumores LS 174T y MX-1 se establecieron mediante una implantación subcutánea de células (3×10^6 y 10^7 células inyectadas respectivamente) en el flanco derecho de ratones desnudos NMRI hembra de 6 semanas (Harlan). Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de 150-200 mm^3 (calculado usando la siguiente fórmula: $[\text{longitud} \times \text{anchura}^2]/2$). El día de la primera inyección, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de 4 animales. La doxorubicina y PhAc-ALGP-Dox se disolvieron en solución salina. Los compuestos se suministraron mediante inyección intravenosa (iv) en embolada en la vena lateral de la cola a 10 $\mu\text{l/g}$. Durante el transcurso del experimento, los signos clínicos, el peso corporal y el volumen del tumor se controlaron dos veces por semana. Los resultados se presentan como la evolución del volumen tumoral medio en función del tiempo. Se utilizaron valores óptimos de T/C (relación del volumen tumoral medio de los ratones tratados frente a los de control) como medida de la eficacia del tratamiento. El porcentaje óptimo de T/C refleja la inhibición máxima del crecimiento tumoral lograda ($\text{TGI} = 100 - (\text{T}/\text{C} \times 100)$).

Resultados

Como se muestra en la figura 2, PhAc-ALGP-Dox se inyectó dos veces (una vez por semana) iv a 140 $\mu\text{moles/kg}$ y 160 $\mu\text{moles/kg}$ en ratones desnudos con tumores LS174T implantados por vía subcutánea (carcinoma de colon). Su peso corporal y el tamaño del tumor se siguieron durante 28 días y se compararon con los grupos de animales tratados con Dox (15 $\mu\text{mol/kg}$) y NaCl. Se observó actividad antitumoral significativa y similar en todos los grupos tratados. (Tabla 4).

Estos datos también confirman la menor toxicidad de PhAc-ALGP-Dox ya que a las dosis de 140 $\mu\text{mol/kg}$ y 160 $\mu\text{mol/kg}$ la pérdida de peso corporal (máximo 10 %) fue comparable a la inducida por Dox administrado en una dosis 9 veces menor.

Tabla 4. Inhibición del crecimiento tumoral. La media de RTV y la desviación estándar se calcularon para cada grupo al final del estudio. La eficacia del fármaco se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado utilizando la ecuación $100 - (\text{T}/\text{C} \times 100)$, donde T es la RTV media del tumor tratado y C es la RTV media en el grupo de control.

compuesto	PhAc-ALGP-Dox	PhAc-ALGP-Dox	Doxorrubicina
Dosis	140 $\mu\text{mol/kg}$	160 $\mu\text{mol/kg}$	15 $\mu\text{mol/kg}$
TGI [% (día)]	79 (28)	81 (28)	55 (28)

En otro experimento, se inyectó PhAc-ALGP-Dox cuatro veces iv. (en los días 0, 3, 6 y 9) a la dosis de 100 $\mu\text{mol/kg}$ en ratones desnudos con tumores MX-1 implantados por vía subcutánea (carcinoma mamario). Se siguió su peso corporal y el tamaño del tumor durante 29 días y se compararon con los grupos de animales tratados con Dox (8 $\mu\text{mol/kg}$) y NaCl. No se observaron pérdidas significativas de peso corporal y actividad antitumoral significativa similar (inhibición del crecimiento tumoral > 60 %) para los 2 fármacos probados (figura 3 y la tabla 5).

Tabla 5. Inhibición del crecimiento tumoral. La media de RT se calculó para cada grupo al final del estudio. La eficacia del fármaco se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado utilizando la ecuación $100 - (\text{T}/\text{C} \times 100)$, donde T es la RTV media del tumor tratado y C es la RTV media en el grupo de control.

compuesto	PhAc-ALGP-Dox	Doxorrubicina
Dosis	100 $\mu\text{mol/kg}$	8 $\mu\text{mol/kg}$
TGI [% (día)]	60 (29)	65 (29)

Ejemplo 6. Cuantificación farmacocinética y tisular de PhAc-ALGP-Dox y sus metabolitos después de una inyección iv única en embolada en ratones en comparación con doxorubicina a dosis equimolar

5 Procedimiento

Los estudios de distribución de tejido farmacocinético se realizaron con ratones OF-1. La doxorubicina y el PhAc-ALGP-Dox se disolvieron en solución salina a la dosis de 8,62 mM y se administraron a los ratones por

vía iv en la vena lateral de la cola (10 $\mu\text{l/g}$). En diferentes momentos después de la administración del fármaco (5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 7 h, 16 h y 24 h) se sacrificaron 3 ratones por grupo por dislocación cervical y se recogieron sangre y tejido cardíaco. Se cortaron los corazones y se enjuagaron cuidadosamente en solución salina tamponada con fosfato (para eliminar la sangre en las cavidades cardíacas), se secaron sobre papel y se congelaron en nitrógeno líquido. Se almacenaron hasta el análisis. Las muestras de sangre se centrifugaron (10 min, 2000 g, 4 °C) para separar la fracción de plasma, que se almacenó para el análisis. Los corazones se homogeneizaron con un homogeneizador Ultraturrax en 1,5 ml de agua. La concentración de proteína se midió usando el ensayo de proteína microBCA (Pierce). La cuantificación del tejido del fármaco se realizó por HPLC después de la extracción: se añadieron 150 μl de acetonitrilo a las muestras de 50 μl . Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante. Las muestras se tamponaron mediante la adición de tampón de formiato 200 mM pH 4,5 (sobrenadante de muestra de 1 V + tampón de 3 V) antes del análisis por HPLC (detección fluo ex = 235 nm em = 560 nm).

20 Resultados

Se inyectaron doxorubicina y PhAc-ALGP-dox iv en embolada a la dosis equimolar de 86,2 $\mu\text{mol/kg}$ a ratones OF-1 hembra de tipo salvaje. La evolución de la concentración de fármacos y metabolitos en plasma y tejido cardíaco se determinó mediante análisis por HPLC. Aproximadamente el 90 % de la concentración plasmática del fármaco se eliminó en los primeros cinco minutos después de la inyección de Dox o PhAc-ALGP-Dox (figura 4A y B). Menos del 1 % de PhAc-ALGP-Dox se hidrolizó rápidamente en LGP-Dox, GP-Dox y Dox. Estos metabolitos ya no se detectaron después de 1 hora. El valor del área plasmática bajo la curva (AUC) para doxorubicina después de la inyección de doxorubicina es 63 veces mayor que después de la inyección de PhAc-ALGP-Dox (tabla 6).

Dado que el corazón es la diana de una importante toxicidad de doxorubicina, se determinó la concentración de tejido cardíaco del fármaco libre. También se determinaron los AUC cardíacos para doxorubicina después de la inyección de doxorubicina, y los AUC cardíacos para Dox, GP-Dox y PhAc-ALGP-Dox después de la administración de PhAc-ALGP-Dox (tabla 6). El AUC cardíaco de Dox después de la administración de PhAc-ALGP-Dox es 25 veces menor que después de la administración de Dox a dosis equimolar. Dado el efecto cardiotoxico clínico del AUC de Dox, estos resultados sugieren fuertemente que PhAc-ALGP-Dox sería significativamente menos cardiotoxico que la doxorubicina.

Tabla 6. Valores de AUC farmacocinéticos de PhAc-ALGP-Dox y de sus metabolitos frente a doxorubicina en tejido cardíaco después de una inyección iv en embolada en ratones OF-1 a la dosis de 86,2 $\mu\text{mol/kg}$

AUC (área bajo la curva)	Dox	PhAc-ALGP-Dox		
		Dox	GP-Dox	PhAc-ALGP-Dox
Plasma ($\mu\text{M.h}$)	63	1	1	97
Corazón (pmol.h/mg de proteína)	5863	235	11	23

Ejemplo 7. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de PhAc-ALGP-Dox en cardiomiocitos

La prueba de cardiotoxicidad *in vitro* se realizó en un modelo *in vitro* relevante y predictivo para la detección de seguridad cardíaca en la optimización temprana del plomo utilizando cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias de ratón (Cor.At®, Axiogenesis (Alemania)). Los cardiomiocitos Cor.At® proporcionan un sistema

celular estandarizado, homogéneo y reproducible para la clasificación *in vitro* del potencial cardio-citotóxico de un compuesto. Después de la incubación con los compuestos de ensayo, se usó la prueba de captación de rojo neutro para determinar los efectos que afectan directamente la viabilidad e integridad de las células cardíacas en comparación con un tipo de célula de referencia no específico, por ejemplo, fibroblastos de ratón (MEF).

5 Resultados

Los cardiomiocitos CorAt se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de PhAc-ALGP-Dox o de doxorubicina. La viabilidad celular se determinó después de 48 h usando la prueba de captación de rojo neutro. Se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) como células de control para distinguir la toxicidad específica cardíaca de la citotoxicidad general. La curva de respuesta a la dosis de PhAc-ALGP-Dox (figura 5) mostró un efecto tóxico moderado en CorAt. En los cardiomiocitos solo a la concentración más alta probada (20 µg/ml). A esta concentración, el efecto sobre MEF es menos pronunciado (81 % de viabilidad frente a 37 % de viabilidad). Para el MEF, no se alcanza IC₅₀ con este compuesto. En todas las concentraciones más bajas probadas, PhAc-ALGP-Dox no mostró ningún efecto tóxico. La curva de respuesta a la dosis de doxorubicina mostró un efecto tóxico intenso en los cardiomiocitos CorAt, así como en MEF a las dos concentraciones más altas probadas (20 µg/ml y 2 µg/ml). A 0,2 µg/ml, el compuesto mostró un efecto tóxico moderado sobre los cardiomiocitos CorAt, pero solo un efecto marginal sobre MEF (67 % de viabilidad de los cardiomiocitos CorAt frente a 89 % de viabilidad de MEF). Aunque el efecto sobre los cardiomiocitos CorAt es solo ligeramente superior al del MEF, se considera que el compuesto ejerce un efecto cardiotóxico, que puede enmascarse mediante un efecto citotóxico general.

Como se ilustra en la figura 5, este estudio muestra que PhAc-ALGP-Dox es de 40 a 50 veces menos citotóxico que Dox en los cardiomiocitos CorAt®.

EJEMPLO 8. Evaluación de la activación de PhAc-ALGP-Dox en el sitio del tumor después de una inyección iv única en embolada en ratones desnudos con xenoinjerto de carcinoma de colon LoVo

Procedimiento

La activación tumoral de PhAc-ALGP-Dox se evaluó utilizando ratones atímicos (NMRI desnudos/desnudos) con xenoinjerto ectópico de carcinoma de colon LoVo humano. Los tumores LoVo se establecieron mediante una implantación subcutánea de células (10⁷ células) en el flanco derecho de ratones desnudos NMRI hembra de 6 semanas (Harlan). Se administraron fármacos o controles cuatro semanas después de la implantación subcutánea del xenoinjerto. El día de la inyección, los animales fueron cedidos aleatoriamente a grupos de 4 animales. El conjugado PhAc-ALGP-Dox se disolvió en solución salina a dosis crecientes (1,5, 3,5, 5, 10, 20, 30, 46 y 62 mM). Los conjugados se suministraron mediante inyección intravenosa (iv) en embolada en la vena lateral de la cola a 10 µl/g. Veinticuatro horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores fueron recogidos, enjuagados en solución salina tamponada con fosfato y homogeneizados. Se realizó una extracción de fármacos de homogeneizados tumorales con acetonitrilo y se cuantificó la doxorubicina presente en los tumores mediante análisis por HPLC.

35 Resultados

Los resultados en la figura 6 muestran que la concentración tumoral de Dox aumenta con la dosis inyectada de PhAc-ALGP-Dox para alcanzar un nivel estable a 200 µmol/kg. Los resultados de este ejemplo indican que una tasa de activación y disponibilidad de profármaco limitada en el sitio del tumor podría depender del máximo de actividad enzimática disponible durante la duración del contacto con PhAc-ALGP-Dox.

Ejemplo 9. Evaluación de la toxicidad *in vivo* de PhAc-ALGP-Dox después de inyecciones intraperitoneales únicas y múltiples en ratones

Procedimiento

PhAc-ALGP-Dox se disolvió en solución salina y se administró mediante inyecciones intraperitoneales (ip) únicas o múltiples en la vena lateral de la cola de ratones OF-1 (10 µl/g). PhAc-ALGP-Dox se administró a dosis acumulativas similares de 280 y 560 µmol/kg siguiendo diferentes programas de inyecciones: inyección ip única; 5 inyecciones ip diarias consecutivas a 56 y 112 µmol/kg o dos veces al día durante cinco días consecutivos a las dosis de 28 y 56 µmol/kg. La toxicidad *in vivo* se evaluó controlando el peso corporal.

Resultados

Cualquiera sea el programa de inyección, no se registró pérdida de peso corporal en grupos de animales que recibieron la dosis acumulativa de 280 µmol/kg de PhAc-ALGP-Dox (figura 7). El estudio de toxicidad de PhAc-ALGP-Dox después de una inyección ip única a 280 µmol/kg se realizó por separado y los resultados no se muestran en la figura 7. La dosis de 560 µmol/kg administrada por inyección ip única fue muy tóxica. Los animales perdieron el 25 % del peso corporal en una semana y fueron sacrificados. Los resultados muestran claramente que el fraccionamiento de la dosis en inyecciones múltiples reduce la toxicidad. Cinco inyecciones ip diarias consecutivas de PhAc-ALGP-Dox a 112 µmol/kg también indujeron una pérdida de peso corporal significativa con un máximo de

22,5 % en el día 11 pero seguido de una fase de recuperación. No se observó pérdida de peso corporal en el grupo tratado con 10 inyecciones ip (dos veces al día durante cinco días consecutivos) de PhAc-ALGP-Dox a 56 $\mu\text{mol/kg}$. Teniendo en cuenta que la dosis máxima tolerada de doxorubicina inyectada según el mismo régimen es de 3 $\mu\text{mol/kg}$, la PhAc-ALGP-doxorrubicina es, en estas condiciones, aproximadamente 15 veces menos tóxica.

5 Ejemplo 10. Cuantificación farmacocinética y tisular de PhAc-ALGP-Dox y sus metabolitos después de una inyección intraperitoneal única en ratones en comparación con doxorubicina a dosis equimolar

Procedimiento

10 Los estudios de distribución de tejido farmacocinético se realizaron con ratones OF-1. La doxorubicina y PhAc-ALGP-Dox se disolvieron en solución salina a la dosis de 9,2 mM y se administraron a ratones por vía intraperitoneal (10 $\mu\text{l/g}$, 6 ratones por grupo). En diferentes momentos después de la administración del fármaco (5 min, 30 min, 1 h, 4 h y 24 h), se recogieron muestras de sangre de la vena lateral de la cola de tres ratones usando microtubos recubiertos con EDTA (Starsted). Después de 24 h, se sacrificaron 3 ratones por grupo por dislocación cervical y se recogieron los corazones. Se hicieron incisiones y se enjuagaron cuidadosamente en solución salina tamponada con fosfato (para eliminar la sangre en las cavidades cardíacas), se secaron sobre papel y se congelaron en nitrógeno líquido. Se almacenaron hasta el análisis. Los corazones se homogeneizaron con un homogeneizador Ultraturax en 1,5 ml de agua. La concentración de proteína se midió usando el ensayo de proteína microBCA (Pierce). La cuantificación del tejido del fármaco se realizó por HPLC después de la extracción: se añadieron 150 μl de acetonitrilo a las muestras de 50 μl . Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante. Las muestras se tamponaron mediante la adición de tampón de formiato 200 mM pH 4,5 (sobrenadante de muestra de 1 V + tampón de 3 V) antes del análisis por HPLC (detección fluo ex = 235 nm em = 560 nm).

Resultados

25 La farmacocinética de PhAc-ALGP-Dox en sangre se evaluó después de la inyección intraperitoneal (ip) en ratones OF-1. Un porcentaje bajo (aproximadamente 1 %) de la dosis inyectada alcanzó el compartimento sanguíneo en los primeros cinco minutos después de la inyección ip de PhAc-ALGP-Dox a 92 $\mu\text{mol/kg}$. La concentración en sangre del profármaco fue estable durante una hora y posteriormente disminuyó. El conjugado ya no se detectó después de 4 horas (figura 8A). Los valores de AUC fueron 44,2 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ y 3,6 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ para PhAc-ALGP-Dox y Dox respectivamente. Los resultados en la figura 8B muestran la farmacocinética en sangre de doxorubicina a dosis equimolar. Un porcentaje bajo (aproximadamente 2,5 %) de la dosis inyectada alcanzó el compartimento sanguíneo en los primeros cinco minutos después de la inyección. La concentración sanguínea de Dox disminuyó rápidamente en una hora a una concentración muy baja que permaneció estable hasta 24 horas después de la inyección. El valor de AUC para doxorubicina fue de 70,3 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$.

35 La concentración de tejido cardíaco de doxorubicina se midió 24 h después de la inyección ip de PhAc-ALGP-Dox o doxorubicina a dosis equimolar. Los resultados en la tabla 7 muestran que la doxorubicina se acumula 19 veces menos después de la inyección intraperitoneal de 92 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox que después de la inyección de doxorubicina a la dosis equimolar.

40 Tabla 7. Concentración cardíaca *in vivo* de Dox después de la inyección intraperitoneal de Dox y PhAc-ALGP-Dox a 92 $\mu\text{mol/kg}$. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la administración del fármaco y se recogieron los corazones. La concentración del fármaco se determinó mediante análisis por HPLC después de la extracción de homogeneizados de tejidos. Los resultados se expresan en pmol/mg de proteína \pm DE (las concentraciones de fármacos y proteínas se corrigieron teniendo en cuenta la sangre que queda en el tejido cardíaco).

tratamientos	Concentración de Dox en el corazón después de 24 h pmol/mg de proteína
Dox 92 $\mu\text{mol/kg}$	253 \pm 60
PhAc-ALGP-Dox 92 $\mu\text{mol/kg}$	13 \pm 3

Ejemplo 11. Evaluación de la eficacia *in vivo* de PhAc-ALGP-Dox después de inyecciones intraperitoneales repetidas en modelos de tumor de xenoinjerto humano en ratones desnudos

Procedimiento

45 La eficacia de PhAc-ALGP-Dox se evaluó utilizando ratones atímicos (NMRI desnudos/desnudos) con xenoinjerto ectópico de carcinoma de colon LoVo humano o de carcinoma mamario MX-1 en comparación con doxorubicina libre. Los tumores se establecieron mediante una implantación subcutánea de células (10^7 células) en el flanco derecho de ratones desnudos NMRI hembra de 6 semanas (Harlan). Los tratamientos se administraron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 150-200 mm^3 (medido usando un calibrador y se calcula con la siguiente fórmula:

[longitud x anchura²]/2). Los animales fueron cedidos aleatoriamente a grupos de 4 a 6 animales. La doxorubicina y PhAc-ALGP-Dox se disolvieron en solución salina. Los compuestos se suministraron mediante inyección intraperitoneal (ip) en embolada a 10 µl/g. Durante el transcurso del experimento, los signos clínicos, el peso corporal y el volumen del tumor se controlaron dos veces por semana. Los resultados se presentan como la evolución del volumen tumoral medio en función del tiempo. Se utilizaron valores óptimos de T/C (relación del volumen tumoral medio de los ratones tratados frente a los de control) y TGD (retraso del crecimiento tumoral para alcanzar 1000 mm³) como una medida de la eficacia del tratamiento. El % óptimo de T/C refleja la inhibición máxima del crecimiento tumoral (TGI) lograda (TGI = 100-(T/C*100)). Se realizó un análisis estadístico el día 22 utilizando la prueba t de Mann Whitney del software Graph Pad Prism 5.0.

Resultados

Los ratones con xenoinjertos de Lovo recibieron dos veces al día (a intervalos de 5-6 h) durante 5 días consecutivos (2T1D5; un total de 10 inyecciones) inyecciones intraperitoneales de solución salina o de doxorubicina a 0,5, 1 y 2 µmol/kg, o de PhAc-ALGP-Dox a 25, 35 y 50 µmol/kg. Su peso corporal y el tamaño del tumor fueron seguidos y comparados (figura 9). Las mediciones tumorales se detuvieron en los grupos tratados con NaCl y doxorubicina cuando se produjo la necrosis tumoral. No se registró una pérdida de peso corporal significativa en este experimento. PhAc-ALGP-Dox indujo una eficacia antitumoral dependiente de la dosis y un aumento en el retraso del crecimiento tumoral (tabla 8). Se observó una inhibición moderada del crecimiento tumoral en el grupo tratado con doxorubicina a 2 µmol/kg, mientras que no se observó actividad antitumoral a las dosis de 0,5 y 1 µmol/kg. En el día 22, la eficacia antitumoral fue estadísticamente mayor con 50 µmol/kg de PhAc-ALGP-Dox en comparación con 2 µmol/kg de Dox con valores de TGI del 65 % y 45 % respectivamente. El retraso de crecimiento absoluto inducido por cada tratamiento se calculó como el tiempo en días para que los tumores en ratones tratados crezcan de 190 a 1.000 mm³ menos el tiempo en días para que los tumores alcancen el mismo tamaño en ratones tratados con vehículo. El protocolo de tratamiento con PhAc-ALGP-Dox 50 µmol/kg produjo un retraso del crecimiento de 17 días, mientras que la dosis más alta de 2 µmol/kg de doxorubicina sola indujo un retraso del crecimiento de solo 6 días

Tabla 8. Inhibición del crecimiento tumoral y retraso del crecimiento tumoral. La eficacia del fármaco se expresa como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado utilizando la ecuación $100 - (T/C \cdot 100)$, donde T es el volumen tumoral relativo medio (RTV) del tumor tratado y C es el RTV medio en el grupo de control. El retraso de crecimiento absoluto inducido por cada tratamiento se calcula como el tiempo en días para que los tumores en ratones tratados crezcan de 190 a 1.000 mm³ menos el tiempo en días para que los tumores alcancen el mismo tamaño en ratones tratados con vehículo (TGD).

compuesto	PhAc-ALGP-Dox			Doxorrubicina		
Dosis (µmol/kg)	25	35	50	0,5	1	2
TGI [% (día)]	32 (22)	60 (22)	65 (22)	5(22)	no	45(22)
TGD [días]	5	13	17	1	0	6

En otro estudio similar (figura 10), los fármacos o controles se administraron durante 2 semanas consecutivas (2Q1D5 x 2W; un total de 20 inyecciones). En este caso, los resultados muestran claramente la mejor eficacia y menor toxicidad de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina. No se observó una pérdida de peso corporal significativa en los grupos tratados con PhAc-ALGP-Dox (máx. 13 % en el día 9 en el grupo de 50 µmol/kg de PhAc-ALGP-Dox). Sin embargo, se observó una toxicidad dependiente de la dosis en los grupos tratados con doxorubicina. La dosis de 1,5 y 2 µmol/kg fue muy tóxica e indujo pérdida de peso corporal grave y muerte animal. La dosis de 1 µmol/kg fue ligeramente menos tóxica pero superior a la MTD ya que se observó una pérdida continua de peso (máximo 15 % en el día 29) y se encontró un ratón muerto en el día 29. A esta dosis, la doxorubicina tenía una actividad muy baja con un valor de TGI del 44 % en el día 29. La mayor eficacia se obtuvo con 50 µmol/kg de PhAc-ALGP-Dox con un valor de TGI de 73 % en el día 29 y un TGD significativo de 22 días (tabla 9).

Tabla 9. Inhibición del crecimiento tumoral y retraso del crecimiento tumoral. La eficacia del fármaco se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado utilizando la ecuación $100 - (T/C \cdot 100)$, donde T es el RTV medio del tumor tratado y C es el RTV medio en el grupo de control. El retraso de crecimiento absoluto inducido por cada tratamiento se calculó como el tiempo en días para que los tumores en ratones tratados crezcan de 190 a 1.000 mm³ menos el tiempo en días para que los tumores alcancen el mismo tamaño en ratones tratados con vehículo (TGD).

compuesto	PhAc-ALGP-Dox			Doxorrubicina		
Dosis ($\mu\text{mol/kg}$)	25	35	50	1	1,5	2
TGI [% (día)]	54(29),n=5	53(29),n=5	73(29),n=5	44(29),n=4	65(29),n=1	-
TGD [días]	9	9	22	5	9	-

Los ratones xenoinjertados MX-1 recibieron a intervalos de 72 h 2 ciclos de 1 semana con 2 inyecciones ip diarias de PhAc-ALGP-Dox a 50 $\mu\text{mol/kg}$ o de doxorubicina a 1 $\mu\text{mol/kg}$ o 1,5 $\mu\text{mol/kg}$ (2Q1D5 x2W; un total de 20 inyecciones). La doxorubicina a 1,5 $\mu\text{mol/kg}$ fue muy tóxica e indujo una pérdida intensa de peso corporal y la muerte de los animales. No se registró una pérdida de peso corporal significativa para doxorubicina a 1 $\mu\text{mol/kg}$ (MTD) y para 50 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox. Los resultados en la figura 11 muestran que 50 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox inhibe significativamente el crecimiento tumoral y ha mejorado la eficacia en comparación con 1 $\mu\text{mol/kg}$ de doxorubicina (MTD). Al final del estudio (día 35), los porcentajes de inhibición del crecimiento tumoral fueron 76 % y 44 % para PhAc-ALGP-Dox o para doxorubicina, respectivamente (tabla 10). En este estudio, se observó necrosis tumoral en todos los grupos (los ratones con tumores necrosados se eliminaron del estudio).

Estos experimentos confirmaron la toxicidad reducida de 25 a 50 veces de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina.

Tabla 10. Inhibición del crecimiento tumoral y retraso del crecimiento tumoral. La eficacia del fármaco se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), calculado utilizando la ecuación $100 - (T/C \cdot 100)$, donde T es el RTV medio del tumor tratado y C es el RTV medio en el grupo de control.

compuesto	PhAc-ALGP-Dox	Doxorrubicina	
Dosis ($\mu\text{mol/kg}$)	50	1	1,5
TGI [% (día)]	76 (35), n=4	44 (35), n=3	No determinado

Ejemplo 12. Evaluación de la eficacia de PhAc-ALGP-Dox después de inyecciones intraperitoneales repetidas en el modelo de metástasis pulmonar de melanoma B16F10 en ratones

Procedimiento

La eficacia de PhAc-ALGP-Dox se probó en el modelo de melanoma metastásico pulmonar B16-F10 bien descrito. Para ello, se inyectaron 5×10^7 células de melanoma murino B16-F10 en la vena lateral de ratones C57BL6. Los tratamientos comenzaron tres días después de la inyección de células. El animal recibió dos veces al día (a intervalos de 5-6 h) durante 5 días consecutivos inyecciones intraperitoneales (un total de 10 inyecciones/ratón) de solución salina o de doxorubicina a 2 y 3,5 $\mu\text{mol/kg}$ o de PhAc-ALGP-Dox a 50 $\mu\text{mol/kg}$. Se sacrificaron cinco ratones por grupo el día 14 después de la inyección de células. Los pulmones se recogieron y procesaron para la cuantificación de melanina (Molecular Pharmacology, 74: 1576-1586, 2008). La supervivencia se determinó mediante la observación de los ratones restantes.

Resultados

PhAc-ALGP-Dox inhibe significativamente la formación de metástasis pulmonares y aumenta la supervivencia de los ratones en comparación con los grupos tratados con NaCl y doxorubicina (figura 12). En el día 14, la cantidad de melanina en el homogeneizado de pulmón fue de 501 mg/ml en el grupo control, 183 y 53 mg/ml en los grupos tratados con doxorubicina 2 y 3,5 $\mu\text{mol/kg}$ y 16 mg/ml en el grupo tratado con PhAc-ALGP-Dox 50 $\mu\text{mol/kg}$. La mediana de supervivencia fue de 20, 24, 28 y 36 días en los grupos que recibieron NaCl, 2 y 3,5 $\mu\text{mol/kg}$ de doxorubicina o 50 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox, respectivamente.

EJEMPLO 13. Evaluación de la eficacia *in vivo* de PhAc-ALGP-Dox después de inyecciones intraperitoneales repetidas en el modelo de tumor ortotópico de carcinoma de colon HCT116 en ratones

Procedimiento

Las células HCT116 se inyectaron por vía subcutánea en ratones SCID. Una vez que se establecieron los xenoinjertos, se extirparon y se implantaron ortotópicamente en el ciego de otros ratones SCID irradiados con y hembra utilizando técnicas microquirúrgicas. El día 12 después de la inyección de células cancerosas, los ratones se

aleatorizaron en cuatro grupos de 16. Recibieron durante 5 días consecutivos 2 inyecciones intraperitoneales diarias de solución salina, de doxorubicina a 2 $\mu\text{mol/kg}$ y de PhAc-ALGP-Dox a 35 y 50 $\mu\text{mol/kg}$ respectivamente. El día 34 después de la inyección en el ciego de las células de cáncer de colon se sacrificaron los animales, se contó macroscópicamente el número de metástasis y se pesaron los tumores primarios.

5 Resultados

Los resultados se representan en las figuras 15 y 16. La doxorubicina a 2 $\mu\text{mol/kg}$ demostró ser demasiado tóxica para los ratones SCID y todos los animales murieron en 10 días. PhAc-ALGP-Dox también fue más tóxico en estos ratones en comparación con los otros modelos de xenoinjerto tumoral de animales probados y 12 ratones sobrevivieron 34 días a la dosis de 35 $\mu\text{mol/kg}$ y 9 ratones sobrevivieron en el grupo tratado con 50 $\mu\text{mol/kg}$.

10 El grupo de control dio un peso medio del tumor primario de 0,88 g con una DE de 0,41. El segundo grupo a 30 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox tenía un peso tumoral primario de 0,69 g con una DE de 0,25 mientras que el grupo a 50 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox presentó una pérdida significativa de peso tumoral con 0,44 g con una DE de 0,10.

15 El número de metástasis hepáticas fue respectivamente de 20 (DE de 33) y de 24 (DE de 26) para los controles y el grupo tratado a 30 $\mu\text{mol/kg}$ PhAc-ALGP-Dox. El efecto de 50 $\mu\text{mol/kg}$ PhAc-ALGP-Dox fue muy significativo con un número medio de metástasis de 1,78 con una DE de 2,9.

Aunque PhAc-ALGP-Dox no carecía por completo de toxicidad, este profármaco al menos podría conservarse para tratar/evitar metástasis (p. ej., metástasis hepáticas de carcinoma de colon) si no fuera eficaz contra el tumor primario en sí (p. ej., carcinoma de colon) en niveles no tóxicos.

EJEMPLO 14 Evaluación de la leucopenia de PhAc-ALGP-Dox en comparación con doxorubicina.

20 Los efectos leucopénicos de PhAc-ALGP-Dox (35 $\mu\text{mol/kg}$ ip) y de doxorubicina (3,5 $\mu\text{mol/kg}$ ip) se compararon en dos experimentos independientes. Los ratones CD1 recibieron dos inyecciones intraperitoneales diarias de fármacos durante cinco días consecutivos (un total de 10 inyecciones/ratón; 2 x 5 animales por grupo). Se registró la evolución del peso corporal de los ratones. Se recogió sangre de la vena de la cola en tubos de microvetas recubiertos con EDTA (Starsted) los días 4, 11 y 15 después del inicio del tratamiento. Los glóbulos blancos (WBC) se contaron usando el analizador hematológico SCILvet abc. El aumento o disminución de WBC se expresó como un porcentaje de WBC en el día 0 (100 %) para cada ratón. La figura 13 muestra los resultados combinados de los dos estudios.

25 La figura 13A da la media y la DE de la variación del peso corporal de los dos grupos, y la 13 B las variaciones de los glóbulos blancos como un porcentaje de WBC en el día 0 para cada ratón. Estos resultados indican claramente la ausencia de toxicidad de 35 $\mu\text{mol/kg}$ de PhAc-ALGP-Dox ip en comparación con doxorubicina administrada a una dosis 10 veces menor. No se observaron efectos leucopénicos ni pérdida de peso corporal en el grupo tratado con PhAc-ALGP-Dox. Por otro lado, en el grupo tratado con doxorubicina, se encontró un ratón muerto el día 11 y 3 ratones el día 15. La doxorubicina indujo una leucopenia moderada a grave (en promedio - 43 % de WBC en el día 15) y pérdida de peso corporal (en promedio -15 % en el día 15).

30 Ejemplo 15. Evaluación de la cardiotoxicidad crónica de PhAc-ALGP-Dox

35 Procedimiento

La toxicidad cardíaca crónica de PhAc-ALGP-Dox en ratones se evaluó morfológicamente como se describió previamente por Bertazzoli y col. 1979 (Cancer Treat Rep 63, 1877-1883). Se trataron ratones blancos hembra CD1 mediante inyección intravenosa en embolada en la vena de la cola a 10 $\mu\text{l/g}$ (6 ratones por grupo). Los compuestos fueron inyectados dos veces por semana, diez veces. Los animales no fueron tratados durante 2 semanas entre las primeras cuatro inyecciones y las últimas seis inyecciones para permitir la recuperación de la depresión de la médula ósea. Los niveles de dosis de tratamiento de PhAc-ALGP-Dox fueron: 13,8; 27,6; 55,2; y 82,8 $\mu\text{mol/kg}$. Se usó doxorubicina 6,9 $\mu\text{mol/kg}$ como referencia. Tres semanas después de la última inyección, los animales se anestesiaron profundamente por inyección intraperitoneal de nembutal (50 mg/kg) y se desangraron. Los corazones se recogieron cuidadosamente, se enjuagaron en NaCl 9 % y se fijaron en una solución de formaldehído al 10 %. Las muestras fueron procesadas para el análisis histopatológico (CITox Lab, Francia). El corazón estaba recortado, incrustado en cera de parafina, seccionado con un espesor de 4 micrómetros y teñido con hematoxilina-eosina antes de la evaluación microscópica. Durante el transcurso del experimento, se controló el peso corporal antes de cada inyección o una vez a la semana.

Resultados

50 No se observó pérdida de peso corporal en los grupos tratados con PhAc-ALGP-Dox (figura 14). Al final del tratamiento, los animales tratados con doxorubicina mostraron signos de debilidad y disminución de la actividad locomotora. Se registró una disminución moderada en el peso corporal en el grupo tratado con doxorubicina con un máximo del 8 % en el momento del sacrificio.

Los resultados de la evaluación microscópica de la cardiotoxicidad se muestran en la tabla 11. Un ratón del grupo

5 tratado con doxorubicina no se sometió a examen microscópico debido a muerte prematura (en el día 17). En todos los ratones que recibieron 6,9 µmol/kg de doxorubicina, hubo cambios cardíacos microscópicos. Hubo una mínima o leve vacuolación del miocardio caracterizada por la presencia de pequeñas vacuolas citoplasmáticas transparentes en miofibras dispersas en los ventrículos, tabique y aurículas. Los núcleos de miofibras en los ventrículos y el tabique se agrandaron en 3 ratones de 5. Además, hubo atrofia y/o lesiones en el miocardio auricular, particularmente en el lado izquierdo. Se observaron atrofia de miofibras auriculares e infiltrado inflamatorio en 4 ratones de 5, junto con trombos de fibrina en 3 de 5 ratones. En uno de estos ratones, también hubo degeneración/necrosis de miofibras. La administración de PhAc-ALGP-Dox no indujo ningún hallazgo microscópico patológico en el corazón a ningún nivel de dosis (es decir, hasta una dosis 12 veces mayor en comparación con doxorubicina).

Tabla 11. Evaluación microscópica de la cardiotoxicidad crónica de PhAc-ALGP-Dox en ratones en comparación con doxorubicina

Tratamiento	NaCl	Doxorubicina	PhAc-ALGP-Dox			
Dosis (µmol/kg)	0	6,9	13,8	27,6	55,2	82,8
Número de ratones	6	5	6	6	6	6
Vacuolación; miofib.	0	5	0	0	0	0
Grado 1	0	4	0	0	0	0
Grado 2	0	1	0	0	0	0
Trombo; aurícula	0	3	0	0	0	0
Grado 1	0	3	0	0	0	0
Atrofia; miofibra	0	4	0	0	0	0
Grado 1	0	1	0	0	0	0
Grado 2	0	3	0	0	0	0
Degeneración/necrosis; miocardio	0	1	0	0	0	0
Grado 1	0	1	0	0	0	0
Infiltración; mezcla. Células	0	4	0	0	0	0
Grado 1	0	4	0	0	0	0
Agrand. Núcleos; miofib.	0	3	0	0	0	0
Grado 1	0	3	0	0	0	0

15 Conclusión general: la dosis máxima tolerada de PhAc-ALGP-Dox es, dependiendo de los diferentes programas y el modo de administración, entre 6 y 16 veces menos tóxica que Dox y significativamente más activa en tres modelos experimentales de tumores (xenoinjertos LS174T y MX-1 y el modelo de metástasis pulmonar de melanoma B16). PhAc-ALGP-Dox no induce leucopenia a dosis activas y no presenta cardiotoxicidad acumulativa en un modelo de ratón a una dosis equivalente a 12 veces la de doxorubicina en su nivel de MTD.

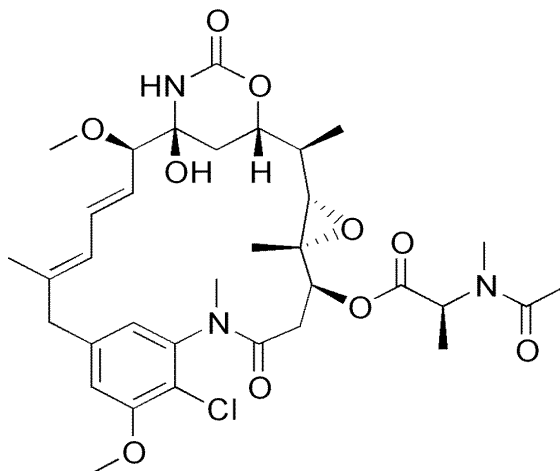
Ejemplo 16. Síntesis y evaluación de otros compuestos citotóxicos conjugados con PhAc-ALGP

20 1. PhAc-ALGP-maitansina

La maitansina es un potente compuesto dirigido a microtúbulos que induce la detención mitótica y mata las células tumorales en concentraciones subnanomolares. Sin embargo, sus efectos secundarios y la falta de especificidad tumoral han impedido el uso clínico exitoso. Inhibe el ensamblaje de los microtúbulos, lo que induce el desmontaje de los microtúbulos e interrumpe la mitosis. La maitansina presenta citotoxicidad contra muchas líneas celulares tumorales y muestra una citotoxicidad aproximadamente 100 veces mayor que los alcaloides de Vinca y una toxicidad aproximadamente 1000 veces mayor que la doxorubicina.

En los ensayos clínicos, la toxicidad neurológica gastrointestinal y central limitaba la dosis, mientras que la mielosupresión era poco frecuente. Cuando se evaluó como agente único, la maitansina no mostró una respuesta significativa en pacientes con diferentes tipos de cáncer.

La siguiente figura representa la maitansina:



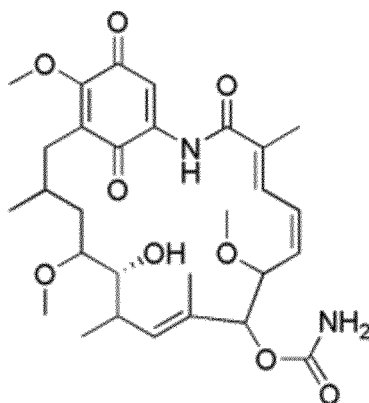
La maitansina se puede conjugar con PhAc-ALGP a través de un espaciador autoinmolativo que reacciona con su grupo libre -NH u OH. La maitansina está disponible en el mercado (p. ej., Medkoo Biosciences; Xuzkou Kaiyide Chemical Co).

5

2. PhAc-ALGP-geldanamicina

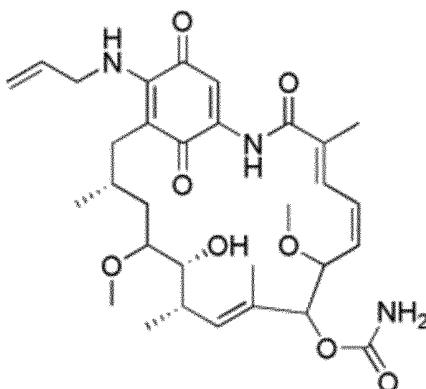
La geldanamicina y sus derivados son una familia de ansamicinas de benzoquinona, antibióticos originalmente aislados sobre la base de su débil actividad antibiótica que posteriormente mostraron una potente actividad antitumoral. La geldanamicina induce, en comparación con sus homólogos celulares normales, la degradación preferencial de proteínas que están mutadas en células tumorales como v-src, bcr-abl y p53. Este efecto está mediado por Hsp90. A pesar de su potente potencial antitumoral, la geldanamicina tiene varias desventajas importantes como agente antitumoral que ha conducido al desarrollo de análogos de geldanamicina, en particular análogos que contienen una sustitución en la posición 17.

10



geldanamicina natural

15

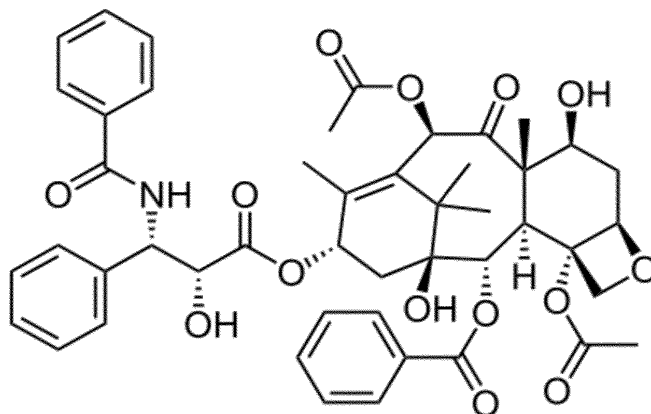


geldanamicina derivada en la posición 17 para producir 17AAG.

La derivación de geldanamicina en la posición conduce a 17AAG (17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina) que tiene una toxicidad *in vivo* más baja que la geldanamicina. Aunque la afinidad por Hsp90 con 17AAG es menor que con geldanamicina, 17AAG y geldanamicina produjeron efectos biológicos en células malignas a concentraciones similares o iguales. La geldanamicina se une con gran afinidad al bolsillo de unión a ATP de Hsp90. Hsp90 es una chaperona molecular ubicua crítica para el plegamiento, ensamblaje y actividad de múltiples proteínas de señalización mutadas y sobreexpresadas que promueven el crecimiento y/o supervivencia de las células tumorales. La unión de geldanamicina a Hsp90 provoca la desestabilización y degradación de su diana. Burke y col. 2009 (Bioorg Med Chem Lett 19, 2650-2653) describieron una técnica para unir geldanamicina a anticuerpos con un enlazador escindible por enzimas lisosomales. Este enlazador incorpora un resto de valina-alanina-p-aminobencil-amino (autoinmolativo) para permitir la unión con el grupo amino de geldanamicina por un lado y con un grupo amino libre del anticuerpo por otro lado. Se puede usar la misma técnica de unión para obtener PhAc-ALGP-geldanamicina pero después de la sustitución en el enlazador del dipéptido valina-alanina por el tetrapéptido alanina-leucina-glicina-prolina. La geldanamicina está disponible en el mercado (p. ej., Calbiochem, Fermentec Biosciences, AG Scientific-Paclitaxel).

3. PhAc-ALGP-paclitaxel y PhAc-docetaxel

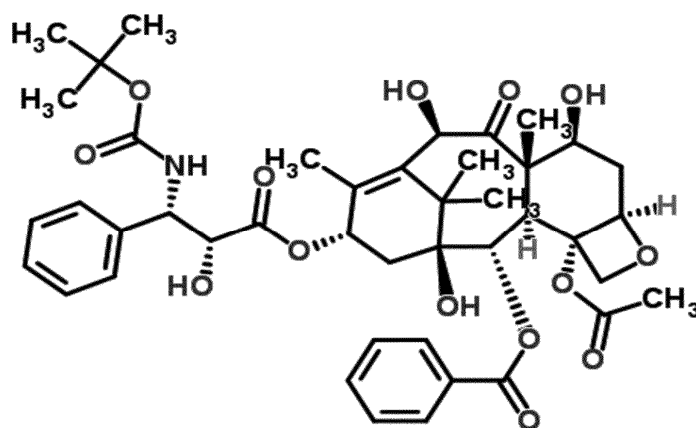
Los taxanos son diterpenos producidos por las plantas *Taxus*. Incluyen paclitaxel (Taxol) y docetaxel (taxotere; véase la figura a continuación)



Paclitaxel o taxol

El paclitaxel es uno de varios fármacos del citoesqueleto que se dirigen a la tubulina. Las células tratadas con paclitaxel tienen defectos en el ensamblaje del huso mitótico, la segregación cromosómica y la división celular. El paclitaxel estabiliza el polímero de microtúbulos, protegiéndolo de la despolimerización, y por lo tanto bloquea la mitosis. Estudios recientes han demostrado que la supresión de la dinámica se produce a concentraciones inferiores a las necesarias para bloquear la mitosis. A las concentraciones terapéuticas más altas, el paclitaxel parece suprimir el desprendimiento de microtúbulos de los centrosomas, un procedimiento que normalmente se activa durante la mitosis. El paclitaxel está aprobado para el tratamiento de los cánceres de ovario, mama y pulmón y el sarcoma de Kaposi. Los efectos secundarios comunes incluyen náuseas y vómitos, pérdida de apetito y toxicidad hematológica como neutropenia, anemia y trombocitopenia, aunque algunos efectos secundarios están asociados con el excipiente usado, Cremophor EL, un aceite de ricino polioxiethylado.

El docetaxel o taxotere difiere del paclitaxel en dos posiciones en su estructura química. Tiene un grupo funcional hidroxilo en el carbono 10 (donde el paclitaxel tiene un éster de acetato), y existe un éster de terc-butyl carbamato en la cadena lateral de fenilpropionato en lugar de la bencilamida en el paclitaxel. El cambio en el grupo funcional de carbono 10 hace que docetaxel sea más soluble en agua que el paclitaxel. El grupo hidroxilo en el carbono 2 permanece sin modificar.



docetaxel o taxotere

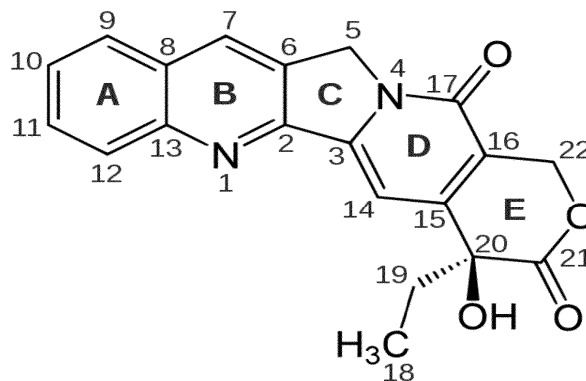
El paclitaxel se unió a los anticuerpos mediante una reacción simple (Guillemard y Saragovi 2001; Cancer Res 61, 694-699). El paclitaxel se derivatizó haciendo reaccionar aldehído glutárico para dar 2'-glutaril-paclitaxel que contiene un enlace éster escindible. El 2'-glutaril-paclitaxel se activó a continuación mediante la eliminación de un grupo hidroxilo con carbodiimida y se unió a un anticuerpo directamente a través de su grupo amino para formar un enlace peptídico. Esta técnica se utilizó recientemente (García y col Oncogene 2012; doi: 10.1038/onc.2012.283) para unir el taxol con un anticuerpo monoclonal antiherceptina. Los resultados experimentales indican que el conjugado está activo en tumores experimentales, lo que indica que el fármaco se libera *in vivo*.

El paclitaxel también se conjugó con anticuerpos después de la succinilación de paclitaxel en la posición 2' y el acoplamiento a anticuerpos a través de una unión amida (Safavy y col. 2003; Bioconj Chem 14, 302-310). Procedimientos similares para conjugar 2'-glutarilo o 2'-succinil paclitaxel activado con el tetrapéptido PhAc-ALGP-; como alternativa, se usa un espaciador autoinmolativo unido en el grupo carboxilo del succinil-paclitaxel. Y es razonable esperar la liberación *in vivo* de taxol del conjugado PhAc-ALGP-paclitaxel, ciertamente teniendo en cuenta que un tetrapéptido ejerce un mucho más pequeño impedimento estérico que los anticuerpos. La estabilidad del conjugado profármaco unido a succinilo en la sangre puede ser un problema dada la naturaleza del éster del grupo succinilo en el paclitaxel. Por lo tanto, puede ser preferible usar un grupo autoinmolativo entre el carbono 2' y el tetrapéptido. Estos procedimientos de conjugados también podrían aplicarse a docetaxel en vista del carbono 2' sin cambios. El paclitaxel está disponible en el mercado (p. ej., Hulang Pharmaceutical, Tradelndia).

4. PhAc-ALGP-camptotecina

La camptotecina (CPT; estructura que se muestra a continuación) es un alcaloide de quinolina citotóxico que inhibe la enzima del ADN topoisomerasa I (TopoI). La CPT mostró una notable actividad contra el cáncer en ensayos clínicos preliminares, pero sufre de baja solubilidad y (alta) reacción adversa al fármaco. Debido a estas desventajas, los químicos sintéticos y medicinales han desarrollado numerosas síntesis de camptotecina y diversos derivados. Dos análogos de CPT han sido aprobados y se usan hoy en quimioterapia contra el cáncer: topotecán e irinotecán.

Los estudios han demostrado que la sustitución en las posiciones 7, 9, 10 y 11 puede tener un efecto positivo sobre la actividad CPT y las propiedades físicas, p. ej., la potencia y la estabilidad metabólica. La ampliación del anillo de lactona por una unidad de metileno también mejora sus capacidades, como en la homocamptotecina. La sustitución en las posiciones 12 y 14 conduce a una derivada inactiva.



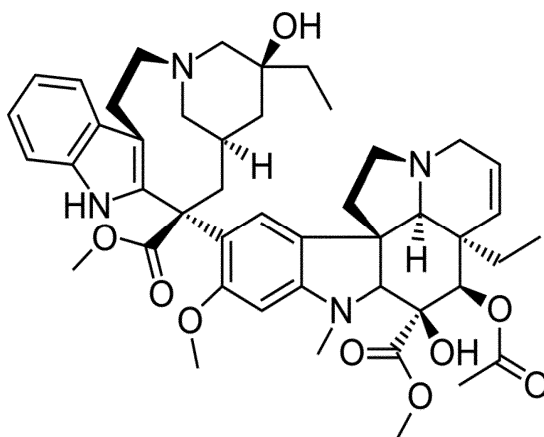
Burke y col. 2009 (Bioconj Chem 20, 1242-1250) describió el diseño y la síntesis de conjugados entre anticuerpos

y análogos de camptotecina. La 7-butil-10-aminocamptotecina y la 7-butil-9-amino-10,11-metilendioxi-camptotecina son de 10 a 1000 veces más potentes que la camptotecina y se pueden unir a los anticuerpos mediante un enlazador dipéptido con un espaciador autoinmolativo que libera los fármacos en presencia de enzimas lisosomales. Una técnica similar es factible para llegar a un conjugado de camptotecina o a un derivado del mismo con PhAc-ALGP.

La camptotecina está disponible en el mercado (p. ej., Calbiochem, Seeboo Dhakhwa).

5. PhAc-ALGP-vinblastina y PhAc-ALGP-vincristina

La vinblastina (estructura que se representa a continuación) es un fármaco antimicrotúbulos que se usa para tratar determinados tipos de cáncer, incluido el linfoma de Hodgkin, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer de mama, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer testicular. También se usa para tratar la histiocitosis de células de Langerhans. La vinblastina se obtenía tradicionalmente de *Catharanthus roseus*, también conocida como *Vinca rosea*, un bígaro de Madagascar. Se genera en la planta mediante la unión de los alcaloides catarantina y vindolina.



A concentraciones muy bajas suprime la dinámica de los microtúbulos y a concentraciones más altas reduce la masa de polímero de microtúbulos. Los efectos secundarios comunes son un bajo recuento en sangre de glóbulos blancos y rojos y las plaquetas pueden disminuir temporalmente.

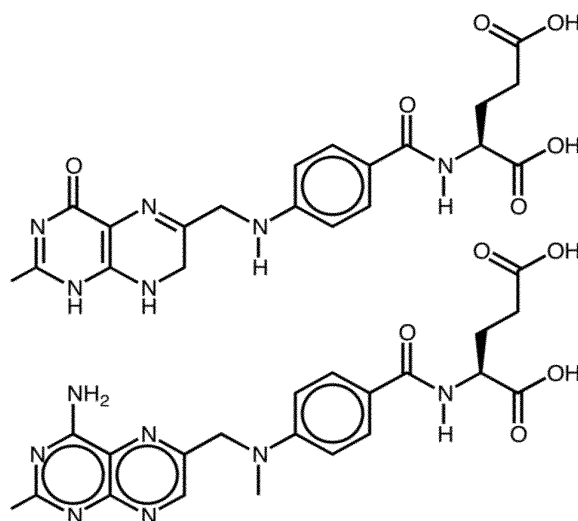
La vincristina es un análogo cercano que difiere de la vinblastina solo por CHO en lugar de CH₃ en N1. Aunque es muy similar a la estructura de la vinblastina, tiene otras indicaciones terapéuticas y un efecto secundario muy grave. Sus principales indicaciones son el linfoma no Hodgkin, la leucemia linfoblástica aguda y el tratamiento del nefroblastoma (tumor de Wilms, un tumor renal más común en niños pequeños). Los principales efectos secundarios de la vincristina son la neuropatía periférica, la hiponatremia, el estreñimiento y la caída del cabello. La neuropatía periférica puede ser grave y ser una razón para evitar, reducir o detener el uso de vincristina.

PhAc-ALGP-vinblastina o conjugados de vincristina puede obtenerse mediante la vinculación de una vinblastina desacetil o vincristina través de un espaciador autoinmolativo unido en su carbono C4.

Kandukuri y col. 1985 (J Med Chem 28, 1079-1088) desarrolló un procedimiento de síntesis de derivados de aminoácidos de vinblastina que implica un enlace amida con la cadena lateral del extremo carboxílico del aminoácido. El enlace se obtuvo mediante una condensación de anhídrido mixto entre los aminoácidos de deacetilvinblastina C4 y N-maleoilo; los maleoilos de aminoácido de vinblastina C4 también se conjugaron con albúmina sérica lactosaminada y se mostró que eran activos contra el carcinoma HepG2 (Rao y col. 1989; Anticancer Res 9, 973-979). Lógicamente, el mismo procedimiento es aplicable a la vincristina. La conjugación de vinblastina o vincristina con PhAc-ALGP también se puede lograr con este procedimiento. Los últimos conjugados tienen un mejor perfil de seguridad que la vinblastina o la vincristina no conjugada, mientras que conservan la actividad anticancerígena. La vinblastina está disponible en el mercado (p. ej., Medkoo Biosciences), así como la vincristina (p. ej., Tocris Bioscience, Medkoo Biosciences).

6. PhAc-ALGP-metotrexato y PhAc-ALGP aminopterina

El metotrexato es un fármaco antimetabolito y antifolato. Se usa en el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes.



La similitud en la estructura del ácido dihidrofólico (arriba) y el metotrexato (abajo) sugiere que el metotrexato es un inhibidor competitivo del ácido dihidrofólico.

5 El metotrexato se desarrolló originalmente y continúa utilizándose para quimioterapia, ya sea solo o en combinación con otros agentes. Es eficaz para el tratamiento de una serie de cánceres que incluyen: neoplasias de mama, cabeza y cuello, leucemia, linfoma, pulmón, osteosarcoma, vejiga y trofoblástico. Los efectos adversos más comunes incluyen: estomatitis ulcerosa, bajo recuento de glóbulos blancos y, por tanto, predisposición a infecciones, náuseas, dolor abdominal, fatiga, fiebre, mareos y neumonitis aguda.

10 Se cree que el metotrexato afecta el cáncer y la artritis reumatoide por dos vías diferentes. Para el cáncer, el metotrexato inhibe alostéricamente el dihidrofolato reductasa (DHFR), una enzima que participa en la síntesis de tetrahidrofolato. La afinidad del metotrexato por DHFR es aproximadamente 1000 veces mayor que la del folato. DHFR cataliza la conversión de dihidrofolato en el tetrahidrofolato activo. El metotrexato, por lo tanto, inhibe la síntesis de ADN, ARN, timidilatos y proteínas. Para el tratamiento de la artritis reumatoide, no se cree que la inhibición de DHFR sea el mecanismo principal, sino más bien la inhibición de las enzimas involucradas en el
15 metabolismo de las purinas, que conducen a la acumulación de adenosina, o la inhibición de la activación de las células T y la supresión de la expresión de la molécula de adhesión intercelular por las células T.

20 Umemoto y col. 1989 (Int J Cancer 43, 677-684) describió un procedimiento para unir metotrexato a través del grupo carboxilo libre a anticuerpos con un enlazador Ala-Leu-Ala-Leu. Este procedimiento también puede aplicarse para unir metotrexato al péptido PhAcALGP y restaurará el grupo carboxilo libre después de la escisión enzimática. Los derivados del grupo alfa-carboxilato son relativamente no activos y no tóxicos *in vitro* ya que es necesario un grupo alfa-carboxilato libre para la unión de metotrexato a DHFR.

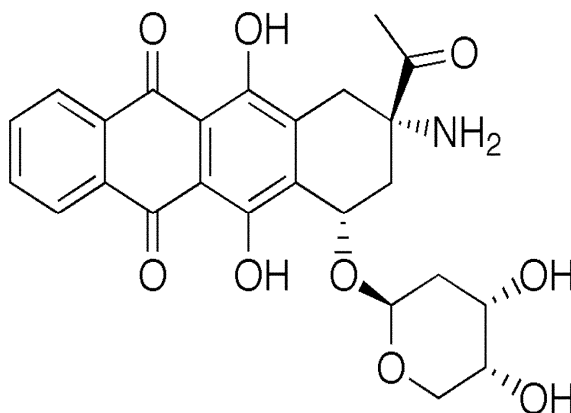
25 También se produjeron profármacos potenciales de metotrexato donde el 2-amino grupo se acilaba con alfa-aminoácidos (Smal y col. 1995; Biochemical Pharmacology 49, 567-574). Estos derivados de aminoácido se sustituyen en el anillo de pteridina 2-NH₂ de metotrexato. Es importante destacar que el derivado de 2-leucil-metotrexato se escinde rápidamente y se activa en presencia de suero, lo que ilustra su sensibilidad a las exoproteasas séricas. Esto hace posible que un conjugado PhAc-ALGP-metotrexato muestre actividad anticancerígena específica de células tumorales. La unión del metotrexato con PhAc-ALGP se realiza mediante la técnica descrita anteriormente. El metotrexato está disponible en el mercado (p. ej., CF Pharma Ltd, Yaskika Pharmaceuticals).

30 La aminopterina (ácido 4-aminopterico), un análogo de 4 aminoácidos del ácido fólico, es un fármaco antineoplásico con propiedades inmunosupresoras. La aminopterina es un derivado sintético de la pterina. La aminopterina funciona como un inhibidor enzimático al competir por el sitio de unión al folato de la enzima dihidrofolato reductasa. Su estructura es muy similar a la del metotrexato y también tiene un 2-NH₂ en su resto de pteridina. Desarrollada antes del metotrexato, fue reemplazada por este último a principios de la década de 1950 debido a su mayor toxicidad que podría resultar de una mayor actividad. Recientemente se confirmó una mayor efectividad en el tratamiento de la leucemia aguda (Cole y col. 2005; Clin Cancer Res 11, 8089-8096). Un conjugado de PhAc-ALGP-aminopterina puede sintetizarse mediante los procedimientos descritos para PhAc-ALGP-metotrexato y la especificidad mejorada de la actividad anticancerígena para las células tumorales también es plausible. La aminopterina está disponible en el mercado (p. ej., Cameo Chemicals, Sigma Aldrich).

40 7. PhAc-ALGP-amrubicina

La amrubicina (estructura representada a continuación) es un análogo sintético de antraciclina de tercera generación que ha demostrado una eficacia clínica sustancial en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas. La

amrubicina es un potente inhibidor de la topoisomerasa II y se está estudiando como agente único y en combinación con terapias contra el cáncer para una diversidad de tumores sólidos, incluidos los pulmones y las mamas. La FDA le concedió la clasificación de fármacos huérfanos.



5 Es una antraciclina que es estructuralmente diferente de la de la doxorubicina. Sin embargo, posee un grupo NH₂ en su anillo de tetraciclina. Los efectos secundarios son similares a los de la doxorubicina, como la neutropenia y la trombocitopenia. No se sabe nada sobre la cardiotoxicidad crónica como posible efecto secundario.

10 Como se describe para la doxorubicina, se aplica la conjugación de PhAc-ALGP a esta antraciclina. La presencia del PhAc-ALGP aumenta la selectividad de las células tumorales de la actividad anticancerígena de la amrubicina. La amrubicina está disponible en el mercado (p. ej., Medkoo Biosciences, Santa Cruz Biotech).

8. Etapas comunes para las pruebas *in vitro* e *in vivo* de conjugados de compuestos citotóxicos PhAc-ALGP

La síntesis de los derivados se basará en los procedimientos descritos de forma resumida en esta invención anteriormente y más detalladamente en las publicaciones referenciadas mencionadas para cada compuesto citotóxico.

15 En una primera etapa, se conjuga un dipéptido GP con el compuesto citotóxico y se desarrolla una metodología analítica para detectar y/o cuantificar el conjugado compuesto citotóxico GP, el compuesto citotóxico e intermedios entre los dos. Dicha metodología puede incluir uno o más de espectrofotometría, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas (MS), HPLC combinada y MS, RMN y MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo), o incluso UPLC-MS/MS (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem)

20 El conjugado compuesto citotóxico GP purificado se prueba *in vitro* en un sistema biológico para confirmar su citotoxicidad. Para los conjugados compuestos citotóxicos GP confirmados como citotóxicos, se realiza la síntesis del conjugado completo compuesto citotóxico PhAc-ALGP y se desarrolla una metodología analítica para detectar y/o cuantificar el conjugado compuesto citotóxico PhAc-ALGP, el compuesto citotóxico e intermedios entre los dos.

25 Aunque se espera que la síntesis química y el desarrollo del procedimiento analítico sean habituales, puede desearse estudiar posibles modificaciones en el procedimiento de síntesis inicialmente previsto o desarrollar un nuevo procedimiento de síntesis como, p. ej., aumentar el rendimiento y/o la pureza del conjugado péptido fármaco.

9. Etapas de prueba *in vitro*

9.1. Pruebas biológicas *in vitro* del conjugado compuesto citotóxico GP

30 La actividad citotóxica del compuesto de partida (no conjugado, el fármaco "parental") y de su derivado conjugado (el "fármaco GP") se analizará en líneas celulares *in vitro*. Las líneas celulares serán al menos algunas de las mencionadas en las publicaciones referenciadas mencionadas en esta invención anteriormente para cada uno de los compuestos citotóxicos. Será necesario realizar pruebas en función de la concentración del fármaco y el tiempo de incubación. El fármaco GP debe ser mucho menos activo que el fármaco parental después de cortos tiempos de incubación. Con el aumento del tiempo de incubación, esta diferencia podría volverse menos significativa debido al aumento de la hidrólisis del fármaco GP por las exoproteasas presentes en el suero que forma parte de los medios de incubación. En dicho caso, la presencia de exoproteasas en suero podría confirmarse, si es posible, por incubación del fármaco GP en medios de incubación sin suero.

40 Sin embargo, es más crucial el análisis de la citotoxicidad del fármaco GP antes y después de la incubación previa con prolil-peptidasas FAP y/o DPIV purificadas. En analogía con GP-doxorubicina, la acción de prolil-peptidasas FAP y/o DPIV sobre el fármaco GP debería aumentar significativamente la citotoxicidad mediante la liberación del fármaco libre. Si los resultados de este análisis son positivos, se realiza la síntesis del fármaco PhAc-ALGP. Si los resultados son negativos, esto podría resultar de la inaccesibilidad a las enzimas del enlace prolina-fármaco. Una

solución a este problema podría ser intercalar un espaciador con un disponible NFU terminal entre la prolina y el fármaco siempre que dicho derivado conserve su efecto citotóxico original. Otra posible solución sería intercalar un espaciador autoinmolutivo que restablezca el fármaco original después de la hidrólisis del espaciador del fármaco y de la prolina unida. Un posible espaciador de este tipo es PABC o PAB (para-aminobenciloxicarbonilo), que une el resto del fármaco al ligando en el conjugado. El resto enlazador comprende una secuencia peptídica que es un sustrato para una enzima extracelular, por ejemplo, FAP, que escinde el péptido en un enlace amida. El péptido contiene además un resto autoinmolutivo que conecta el fármaco y la secuencia del péptido proteico. Tras la escisión de la secuencia peptídica por una enzima intracelular, el resto autoinmolutivo se escinde del resto del fármaco de modo que el resto del fármaco sea una forma activa y no derivatizada.

9.2. Pruebas biológicas *in vitro* del conjugado citotóxico PhAc-ALGP

Cuando se obtiene un profármaco GP satisfactorio, se analizan las características biológicas *in vitro* del conjugado compuesto citotóxico PhAc-ALGP correspondiente. Este análisis incluye la evaluación de los efectos citotóxicos en células *in vitro* del fármaco original, no conjugado, parental y de su homólogo profármaco conjugado. Se comparan las curvas de respuesta a la dosis para el fármaco y el profármaco. Se espera que el profármaco ejerza una citotoxicidad comparable a la del fármaco no conjugado

Un experimento alternativo consiste en incubar el profármaco PhAc-ALGP con CD10 y TOP purificados, y analizar la conversión a profármaco GP; después de la incubación simultánea del profármaco PhAc-ALGP con CD10, TOP, FAP y DPIV, se puede analizar el grado de conversión del profármaco PhAc-ALGP en fármaco libre. Niveles significativamente altos de conversión a profármaco GP y fármaco libre, respectivamente, son indicativos de la eficacia citotóxica del profármaco PhAc-ALGP en un entorno celular/tumoral.

Ambas metodologías descritas anteriormente también se pueden combinar: la citotoxicidad en células cultivadas *in vitro* del producto de reacción del profármaco PhAc-ALGP con CD10 purificado y TOP, o del profármaco PhAc-ALGP con CD10, TOP, FAP y DPIV, o de ambos, se puede comparar con el del fármaco libre.

9.3. Farmacodinámica *in vitro* de conjugados de compuestos citotóxicos GP y conjugados de compuestos citotóxicos PhAc-ALGP

Se estudia la captación intracelular (tasa) de un profármaco antes y después de la preincubación con proteasas como se describió anteriormente. Para lograr esto, puede ser necesario un etiquetado adecuado del fármaco y el profármaco (véase más adelante).

10. Etapas de prueba *in vivo* del conjugado compuesto citotóxico PhAc-ALGP

10.1. Determinación de la dosis máxima tolerada (MTD)

Las pruebas *in vivo* primero determinan la MTD del conjugado de profármacos midiendo la pérdida de peso de los ratones inyectados con dosis crecientes del profármaco. Esto se compara con la MTD del fármaco citotóxico libre. La MTD se determinará como la dosis que no induce una pérdida de peso superior al 20 % del peso original de los animales.

Inicialmente, el profármaco y el fármaco libre se administrarán IV 2 veces con un intervalo semanal, posiblemente repetido una o más veces. Sobre la base de la experiencia descrita en esta invención con el profármaco de doxorubicina, la activación *in vivo* del profármaco podría ser muy baja. En dicho caso, la MTD se determina en ratones normales y en ratones xenoinjertados con un tumor humano, después de inyecciones IP dos veces al día durante 2 veces 5 días. Como alternativa, es posible la infusión lenta de los profármacos utilizando minibombas programables osmóticas u otras.

El efecto de los profármacos en el recuento de glóbulos blancos se comparará con el fármaco libre.

10.2. Actividad quimioterapéutica en ratones inmunodeficientes injertados con tumores humanos

Se seleccionan uno o dos modelos diferentes de tumor de xenoinjerto humano sobre la base de los datos publicados obtenidos con el compuesto citotóxico no conjugado/libre. El profármaco y el fármaco libre se inyectan IP a la MTD determinada como se describió anteriormente. El peso corporal y el volumen del tumor se miden cada dos días y se comparan con los resultados obtenidos con el fármaco de partida libre a su MTD.

Esto puede repetirse en otros tipos de tumores humanos tales como leucemias humanas en tumores xenoinjertados humanos ortotópicos en ratones SCID. Además del seguimiento del efecto citotóxico del profármaco y el fármaco sobre el tumor primario, se puede determinar el efecto sobre las metástasis.

10.3. Farmacocinética, distribución tumoral y tisular de conjugados de compuestos citotóxicos PhAc-ALGP

Excepto quizás por un fármaco fluorescente como la amrubicina, los estudios de distribución farmacocinética del fármaco y el profármaco en el tejido pueden requerir un etiquetado adecuado del fármaco y el profármaco que también produzcan suficiente sensibilidad en los procedimientos de determinación analítica química. Un tipo de

etiquetado es el radiomarcaje, los compuestos podrían, p. ej., radiomarcarse mediante intercambio de tritio o mediante neosíntesis con precursores marcados con C-14. El etiquetado debe ser tal que la etiqueta, o una etiqueta, se mantenga en los metabolitos del profármaco. Se explora la farmacocinética del plasma, así como la acumulación tumoral del fármaco conjugado y sus metabolitos, combinados con la distribución de órganos y tejidos.

5 Ejemplo 17. Eficacia *in vivo* de PhAc-ALGP-doxorrubicina en el modelo de xenoinjerto de sarcoma de tejido blando UZLX-ST3

Modelo de xenoinjerto de sarcoma

De los resultados del experimento presentado en las figuras 16 a 19, se pueden derivar varias propiedades interesantes de PhAc-ALGP-dox.

10 Volumen tumoral

En este experimento, el efecto de unir doxorubicina al péptido ALGP se ha evaluado probando su actividad en liposarcoma resistente a doxorubicina. Los resultados actuales demuestran que la unión de doxorubicina a ALGP da como resultado una dosis experimental tolerada más alta. Como tal, incluso en la quimioterapia experimental de un xenoinjerto de sarcoma resistente a doxorubicina, PhAc-ALGP-dox es capaz de limitar el crecimiento de xenoinjerto de dicho liposarcoma resistente a doxorubicina. En este estudio, los grupos de ratones (n = 4 en ambos grupos), con cada uno de los ratones con dos tumores fueron tratados respectivamente con solución salina (grupo de control), tratados con doxorubicina (grupo tratado con doxorubicina) y tratados con PhAc-ALGP-dox (grupo tratado con PhAc-ALGP-dox). Entre el día 0 y el día 21 de tratamiento en los tumores de control (n = 7) y tratados con doxorubicina (n = 8) hubo un aumento constante del volumen del tumor a 258 % (p = 0,018) y 246 % (p = 0,012), respectivamente. Por otro lado, los tumores tratados con PhAc-ALGP-dox pusieron de manifiesto una estabilización del volumen del tumor al 105 % (figura 16). El retraso en el crecimiento del volumen tumoral en ratones tratados con PhAc-ALGP-dox (n = 6) fue estadísticamente significativo en el día 21 cuando se compara con el grupo de control (p = 0,003) o con el grupo tratado con doxorubicina (p = 0,002).

El efecto observado de PhAc-ALGP-dox puede explicarse en parte por la administración continua de 7 días del fármaco a través de una minibomba.

Una segunda explicación más fascinante reside en una liberación probablemente mucho mayor de doxorubicina en el estroma tumoral que después de la administración de doxorubicina libre (que solo puede administrarse a una dosis mucho más baja). El efecto citostático y citotóxico de la doxorubicina liberada en las células del estroma puede a su vez afectar fuertemente el crecimiento de las células cancerosas. Este efecto estromal también puede explicar el efecto estabilizador en el volumen del tumor durante 21 días sin una reducción en su volumen. La observación prolongada más allá de 21 días, posiblemente junto con la administración repetida, utilizando, por ejemplo, diferentes vehículos con efecto sobre la liberación activa del fármaco, podría producir sinérgicamente un volumen tumoral reducido (después de la destrucción de todas las células del estroma tumoral).

Peso corporal

Durante todo el experimento, se controló el peso corporal y el bienestar general de los ratones. Un gráfico detallado que representa la evolución del peso corporal se presenta en la figura 17 (grupo de control: n = 4; grupo tratado con PhAc-ALGP-dox: n = 3; grupo tratado con doxorubicina: n = 4). No se observaron efectos secundarios importantes y, en general, el peso corporal de los animales no cayó por debajo del valor aceptable (20 % de la pérdida de peso corporal inicial durante el tratamiento). Se sacrificó un ratón por razones éticas el día 13 en el grupo PhAc-ALGP-dox (peso corporal 79,8 %, el animal adelgazó desde el día 11, se encontró líquido ascítico intraperitoneal limitado durante la necropsia probablemente debido a la infección como consecuencia de la implantación quirúrgica de la minibomba).

Recuento total de glóbulos blancos y recuento total de neutrófilos

No se observaron cambios importantes en el total de glóbulos blancos y neutrófilos en ratones tratados con PhAc-ALGP-dox en comparación con los animales de control o tratados con doxorubicina (figuras 18 y 19, respectivamente; grupo de control: n = 4; grupo tratado con PhAc-ALGP-dox: n = 3; grupo tratado con doxorubicina: n = 4). La neutropenia es uno de los efectos secundarios tóxicos más importantes del tratamiento con doxorubicina libre. Por lo tanto, el recuento inalterado de neutrófilos 21 días después de la administración de PhAc-ALGP-doxorrubicina a una dosis 40 veces mayor que la doxorubicina libre es, desde un punto de vista clínico, un resultado experimental muy prometedor y novedoso.

Listado de secuencias

<110> Life Sciences Research Partners vzw

<120> Profármacos mínimamente tóxicos

<130> LSRP-061 PCT
 <150> US 61/746,621
 <151> 2012-12-28
 5 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> oligopéptido sintético
 <400> 1
 Ala Leu Gly Pro
 20 1
 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> oligopéptido sintético
 <400> 2
 Ala Leu Ala Leu
 30 1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligopéptido sintético
 40 <400> 3
 Ala Leu Ala Pro
 1
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligopéptido sintético
 50 <400> 4
 Thr Ser Gly Pro
 1
 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> oligopéptido sintético
 60 <400> 5

Thr Ser Ala Pro
1

5 <210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> oligopéptido sintético
<400> 6

Lys Leu Gly Pro
1

15 <210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> oligopéptido sintético
<400> 7

Lys Leu Ala Pro
1

25 <210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> oligopéptido sintético
<400> 8

Ala Leu Lys Pro
1

35 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> oligopéptido sintético
<400> 9

Thr Ser Lys Pro
1

45 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> secuencia artificial

50 <220>
<223> oligopéptido sintético

55 <400> 10

Lys Leu Lys Pro
1

REIVINDICACIONES

1. Un profármaco que tiene la estructura general:



- 5 donde C es un grupo de bloqueo;
- OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), TSGP (SEQ ID NO: 4) o KLGP (SEQ ID NO: 6);
- D es un fármaco;
- x es un número entero que es al menos 1 cuando y = 1;
- 10 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

15 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

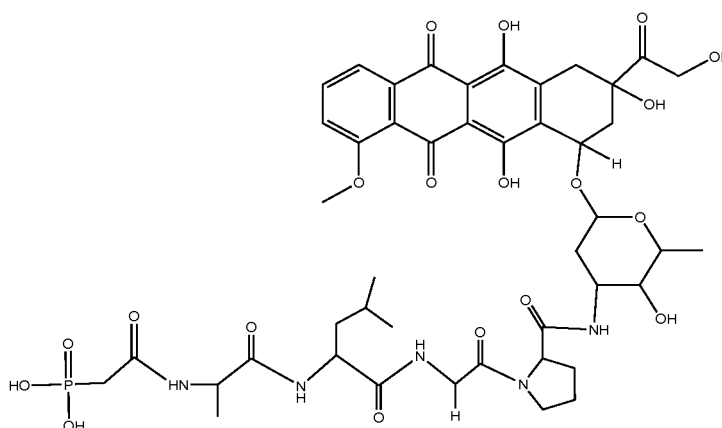
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. El profármaco o sal del mismo según la reivindicación 1, donde dicho grupo de bloqueo C es un grupo fosfonoacetilo.

20 3. El profármaco o sal del mismo según la reivindicación 1, donde dicho fármaco D se selecciona de doxorubicina, daunorubicina, amrubicina, vinblastina, vincristina, caliqueamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretastatina, fosfato de combretastatina A4, dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecán, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5 fluorouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, halicondrina B, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, bleomicina, melfalán, cloroquina, ciclosporina A, y maitansina.

4. El profármaco o sal del mismo según las reivindicaciones 1 o 3, donde dicho fármaco D está pegilado.

5. El profármaco o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho profármaco es el compuesto I:



30 6. Una composición que comprende el profármaco o la sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. El profármaco o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición según la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de un cáncer.

35 8. Un procedimiento de producción del profármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(i) obtener el fármaco;

(ii) unir el fármaco a un resto oligopeptídico bloqueado, dando como resultado el profármaco; o como alternativa,

(ii') unir el fármaco a un resto oligopeptídico seguido de unir el grupo de bloqueo al resto oligopeptídico, dando como resultado el profármaco; y

(iii) purificar el profármaco obtenido en la etapa (ii) o (ii');

5 donde el resto oligopeptídico es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), TSGP (SEQ ID NO: 4) o KLGP (SEQ ID NO: 6);

9. Un procedimiento de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

donde C es un grupo de bloqueo;

10 OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), TSGP (SEQ ID NO: 4) o KLGP (SEQ ID NO: 6);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

15 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

20 donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) poner en contacto cada uno de los fármacos D y profármaco $[C_x-OP]_y-D$ independientemente con células cultivadas *in vitro*;

25 (iv) determinar la citotoxicidad del fármaco D y el profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ con actividad citotóxica comparable al fármaco D; y

(vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

10. Un procedimiento de detección de profármacos candidatos que tienen la estructura general

$[C_x-OP]_y-D$,

30 donde C es un grupo de bloqueo;

OP es un tetrapéptido con la secuencia ALGP (SEQ ID NO:1), TSGP (SEQ ID NO: 4) o KLGP (SEQ ID NO: 6);

D es un fármaco;

x es un número entero que es al menos 1 cuando $y = 1$;

35 y es un número entero que es al menos 1, si y es mayor que 1, entonces al menos 1 OP lleva un grupo de bloqueo; y

40 donde el enlace entre C y OP y el enlace entre OP y D es directo o mediante un enlazador o grupo espaciador, y donde, si y es mayor que 1, los restos OP múltiples se unen individualmente entre sí directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador, y/o se unen individualmente a D directamente o mediante un enlazador o grupo espaciador;

donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) obtener el fármaco D;

(ii) conjugar el fármaco D con $[C_x-OP]_y$ para obtener un profármaco $[C_x-OP]_y-D$;

(iii) poner en contacto el profármaco $[C_x-OP]_y-D$ durante 5 h a 37 °C con células cultivadas *in vitro*, o durante 3 h a 37 °C con peptidasas CD10 y/o TOP aisladas y con peptidasas FAP y/o DPIV aisladas;

(iv) determinar la conversión del profármaco $[C_x-OP]_y-D$ en el fármaco libre D;

5 (v) identificar a partir de (iv) un profármaco $[C_x-OP]_y-D$ que se convierte al menos en un 50 % en D; y

(vi) seleccionar el $[C_x-OP]_y-D$ identificado en la etapa (v) como profármaco candidato.

10 11. El procedimiento según la reivindicación 9 o 10, donde dicho fármaco D se selecciona de doxorubicina, daunorubicina, amrubicina, vinblastina, vincristina, caliqueamicina, etopósido, fosfato de etopósido, CC-1065, duocarmicina, KW-2189, metotrexato, metopterina, aminopterina, diclorometotrexato, docetaxel, paclitaxel, epitiolona, combretastatina, fosfato de combretastatina A4, dolastatina 10, dolastatina 11, dolastatina 15, topotecán, camptotecina, mitomicina C, porfiromicina, 5 fluorouracilo, 6-mercaptopurina, fludarabina, tamoxifeno, arabinósido de citosina, arabinósido de adenosina, colchicina, halicondrina B, cisplatino, carboplatino, mitomicina C, bleomicina, melfalán, cloroquina, ciclosporina A, y maitansina.

15 12. Un kit que comprende un recipiente que comprende el profármaco o sal del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición según la reivindicación 6.

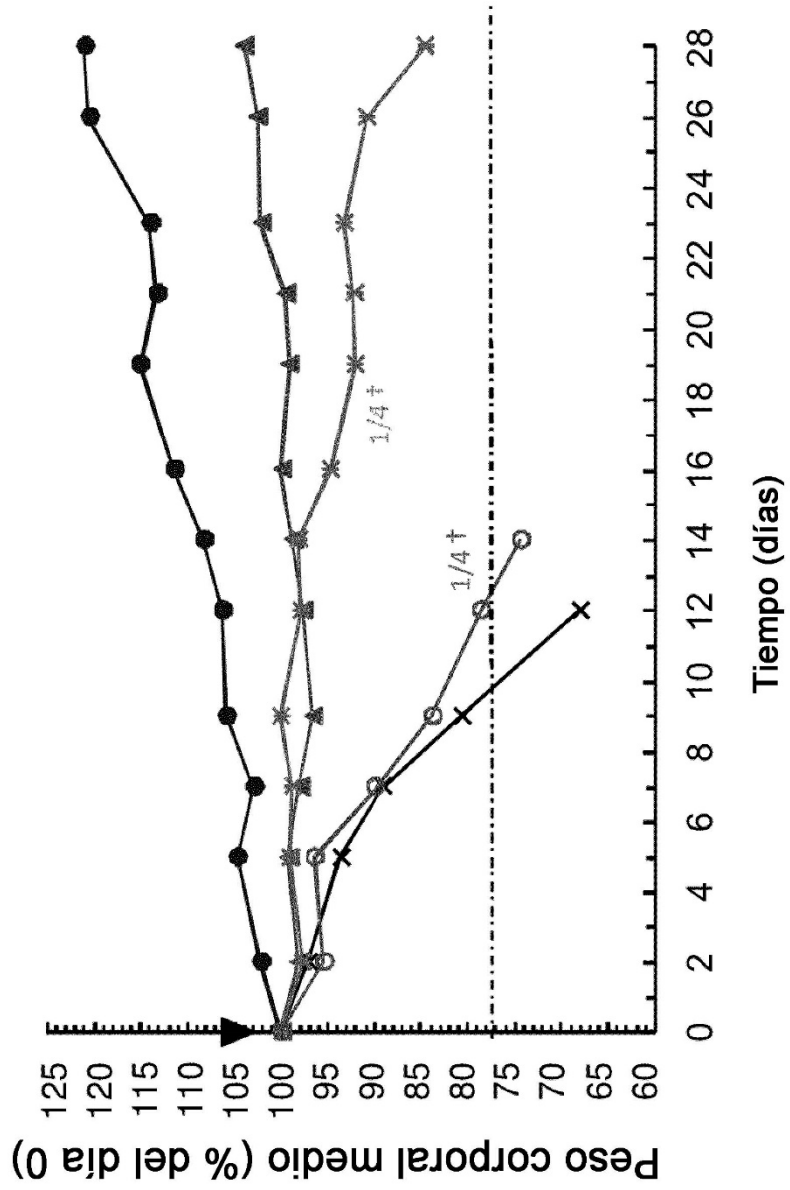


FIGURA 1

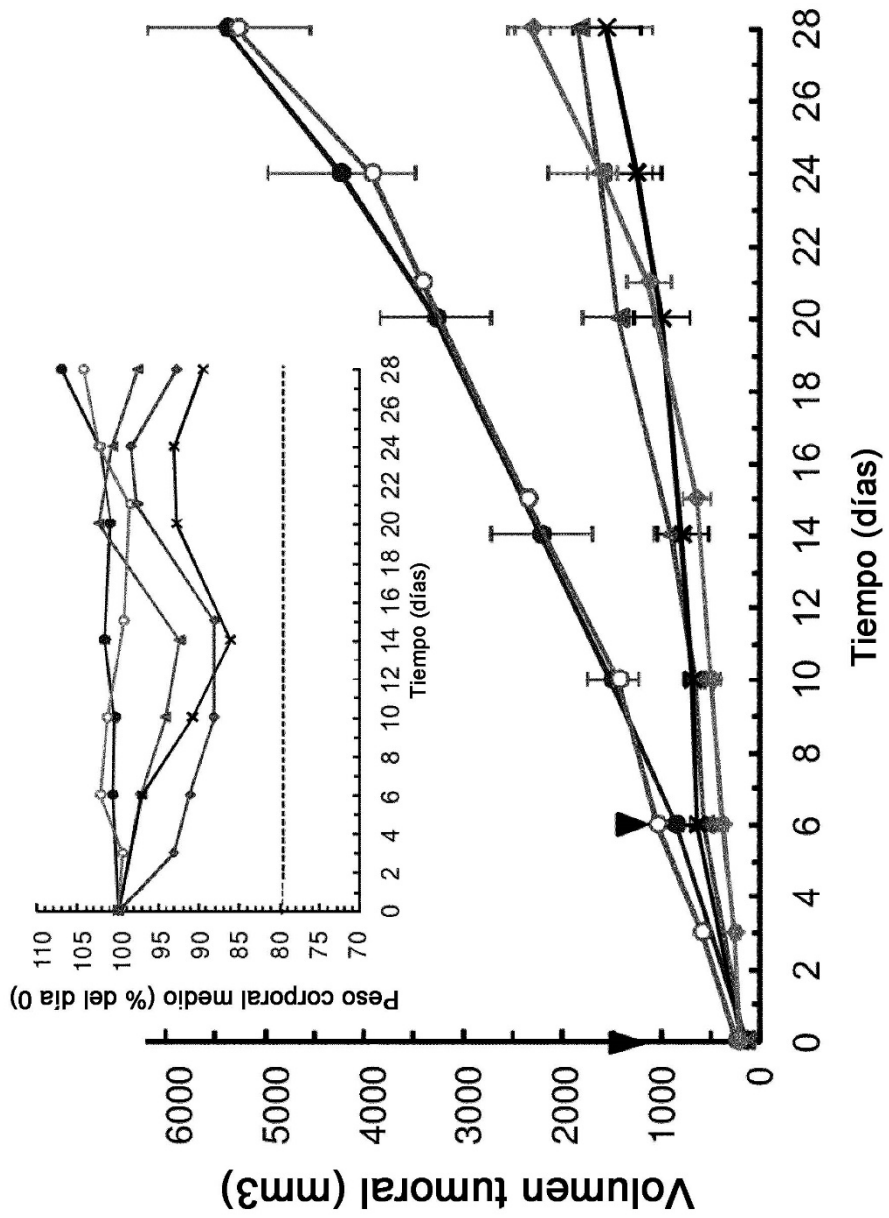


FIGURA 2

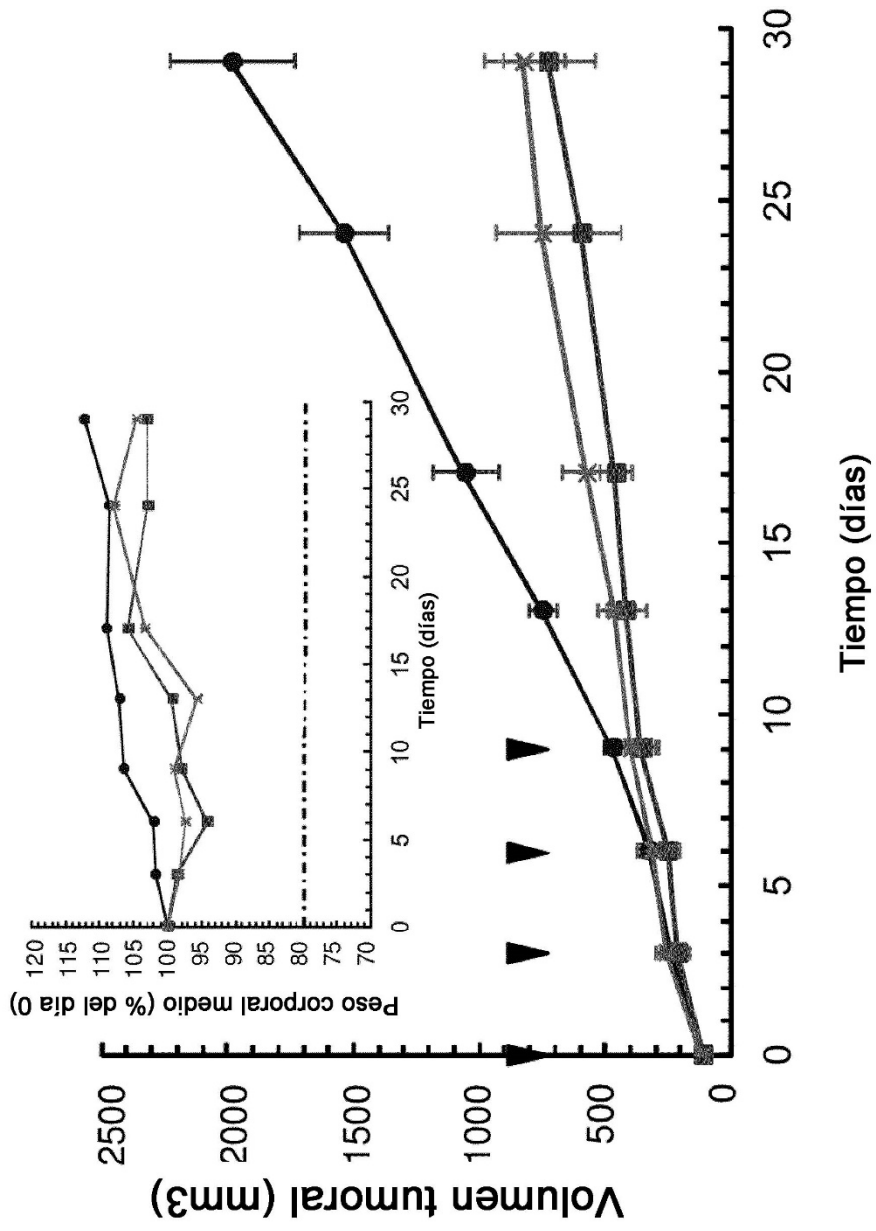


FIGURA 3

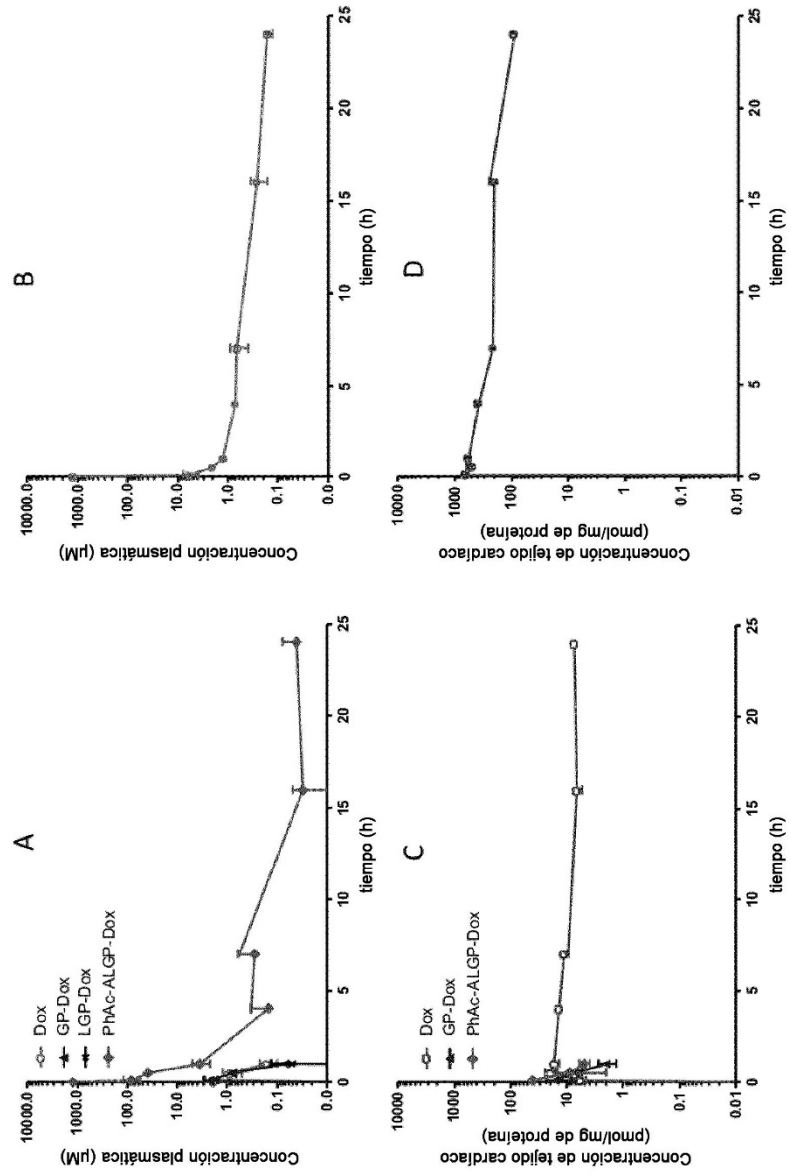


FIGURA 4

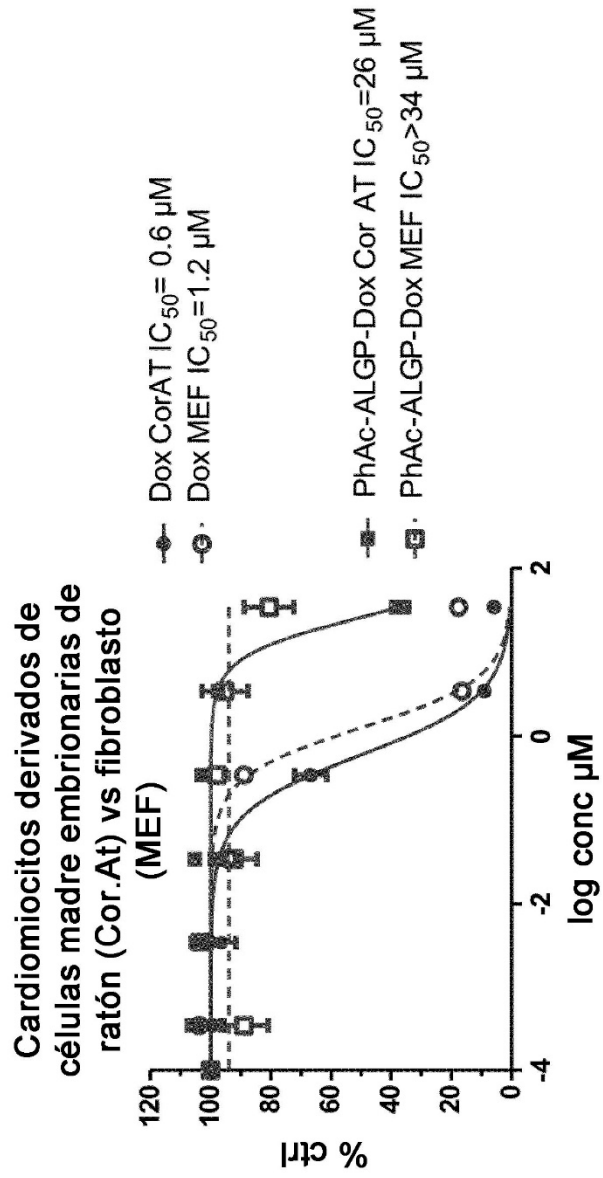


FIGURA 5

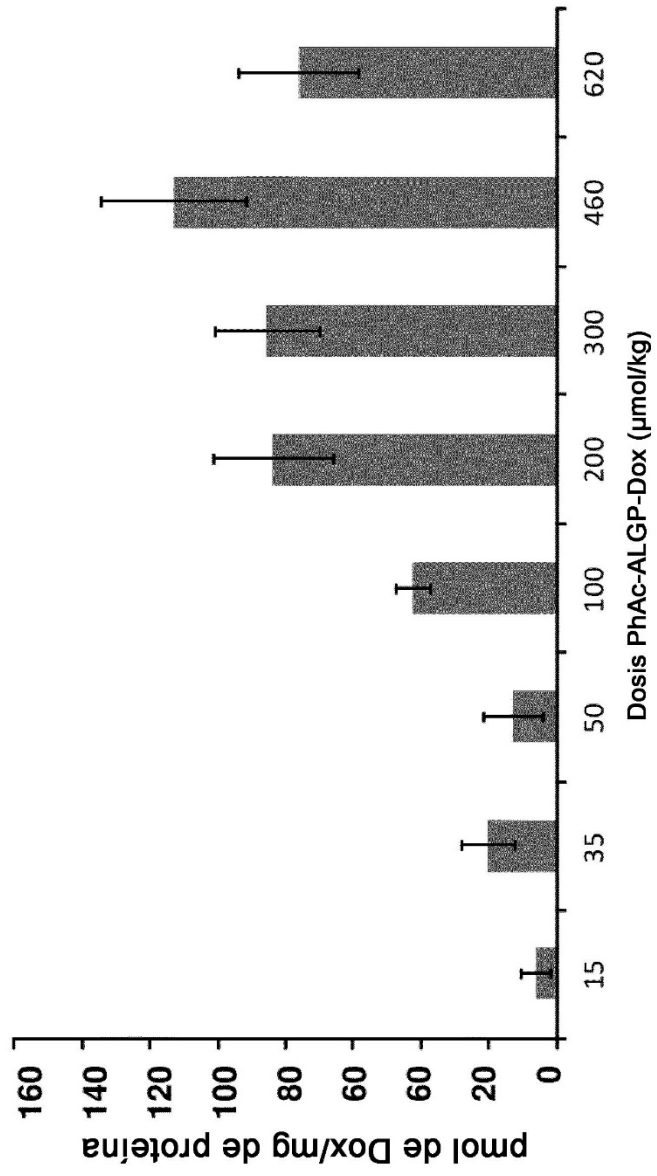


FIGURA 6

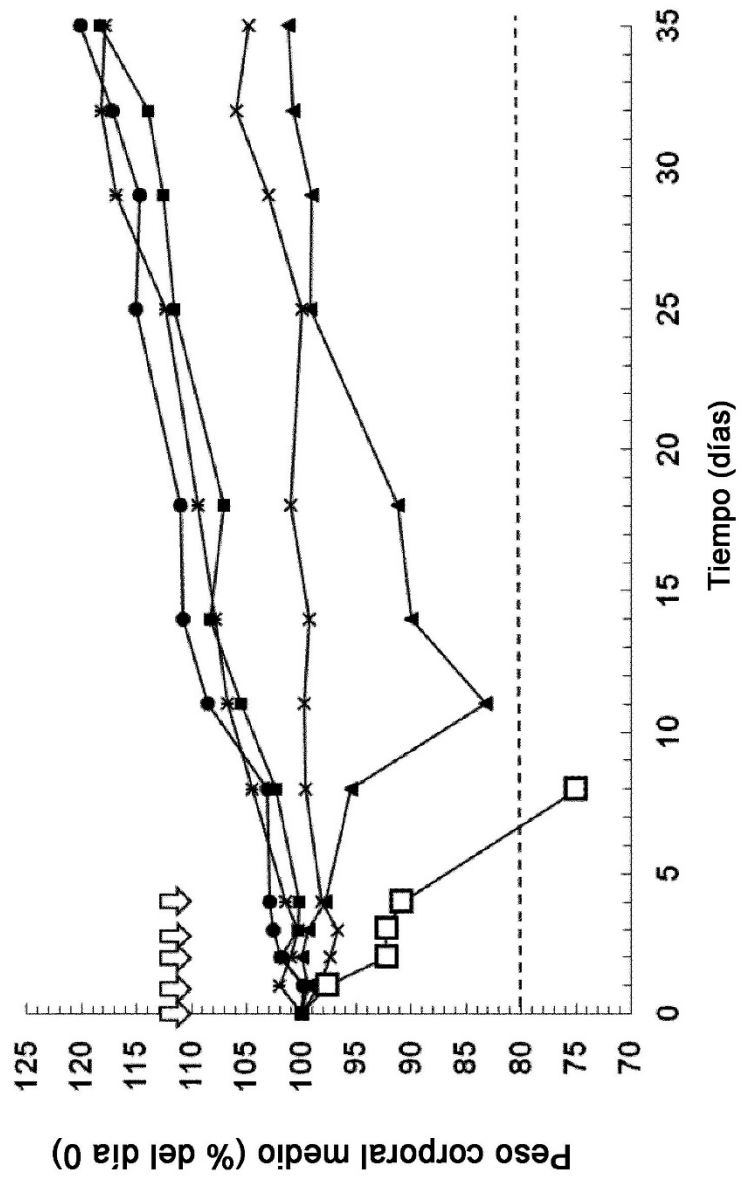


FIGURA 7

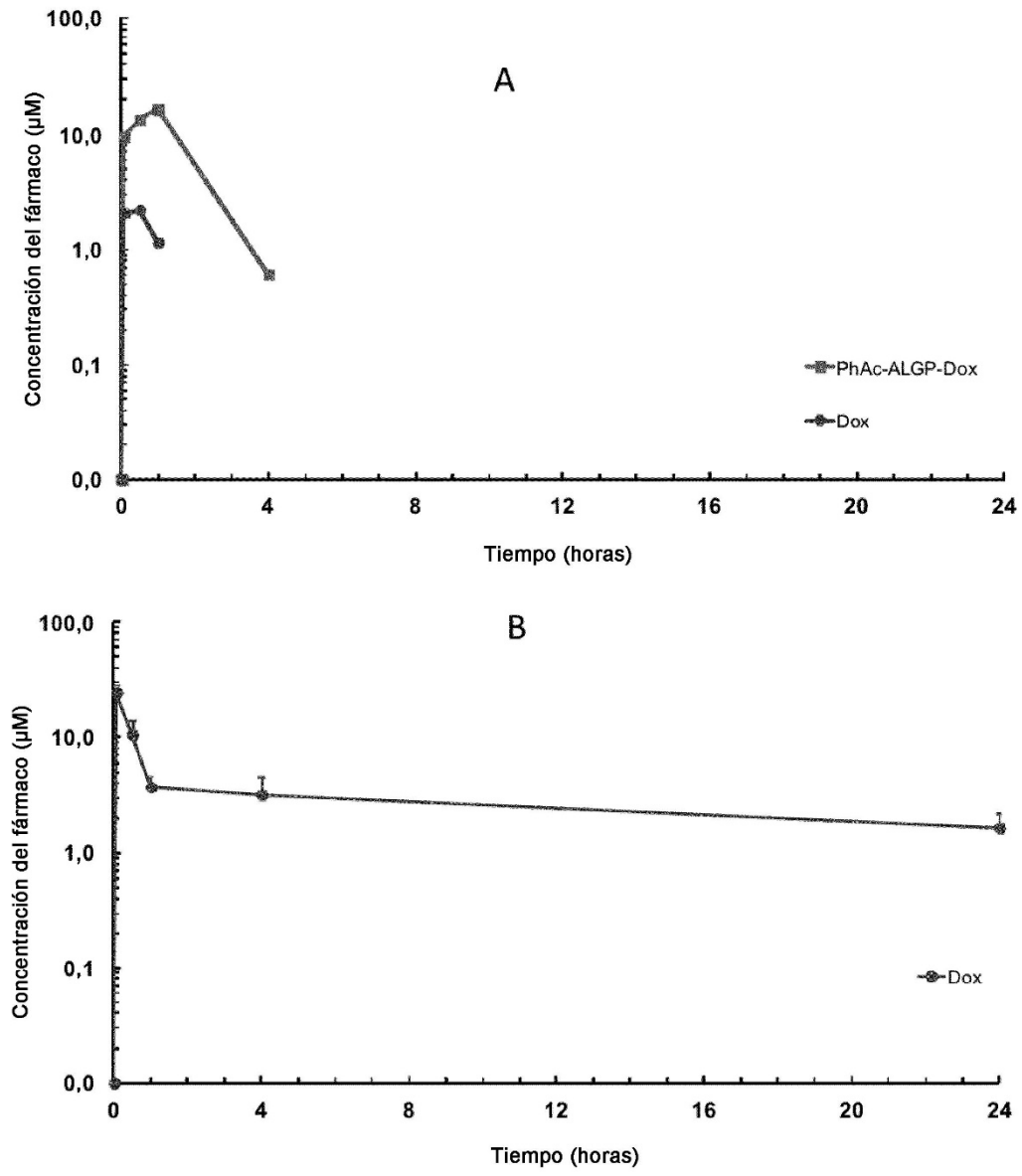


FIGURA 8

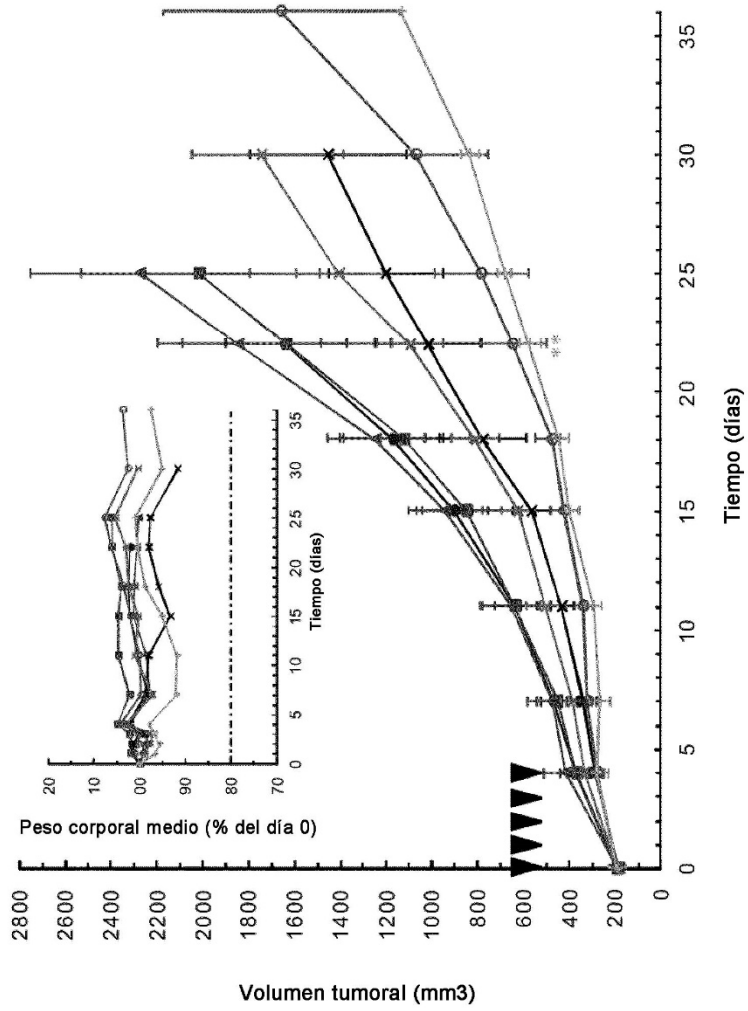


FIGURA 9

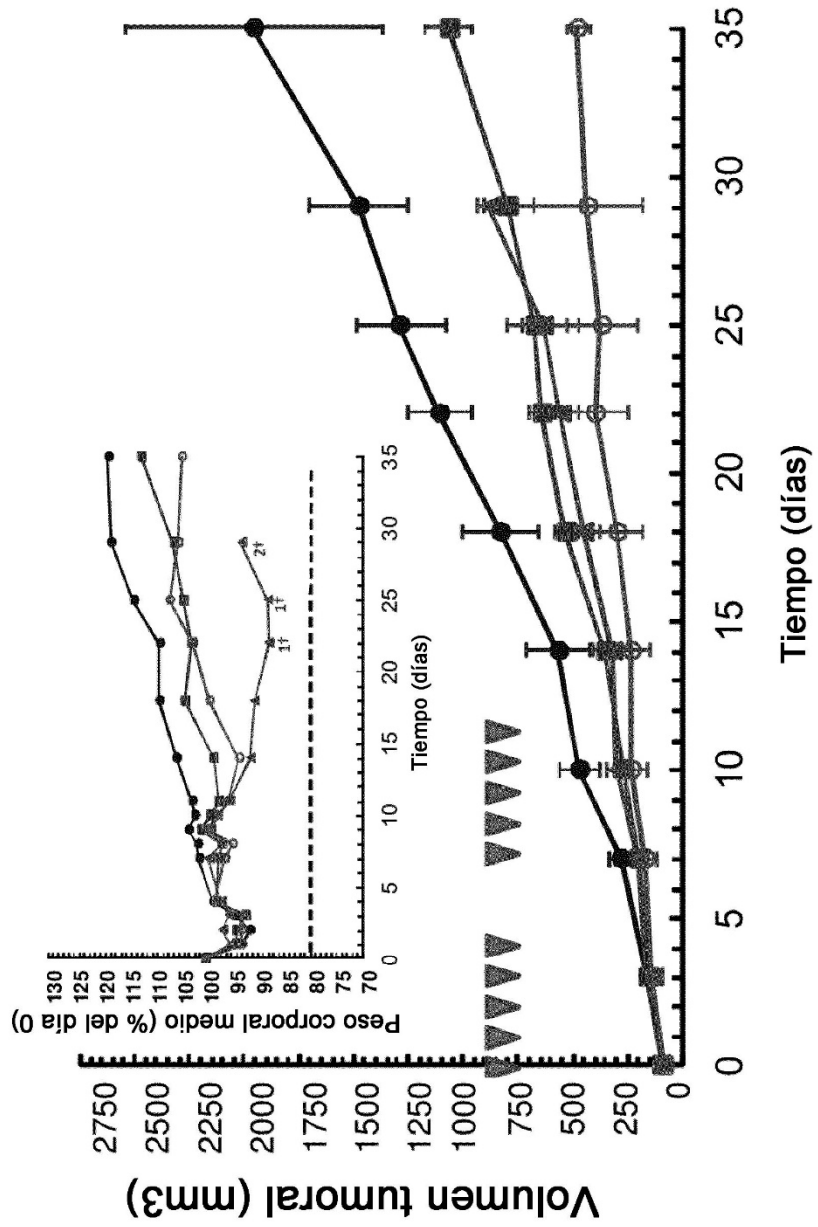


FIGURA 10

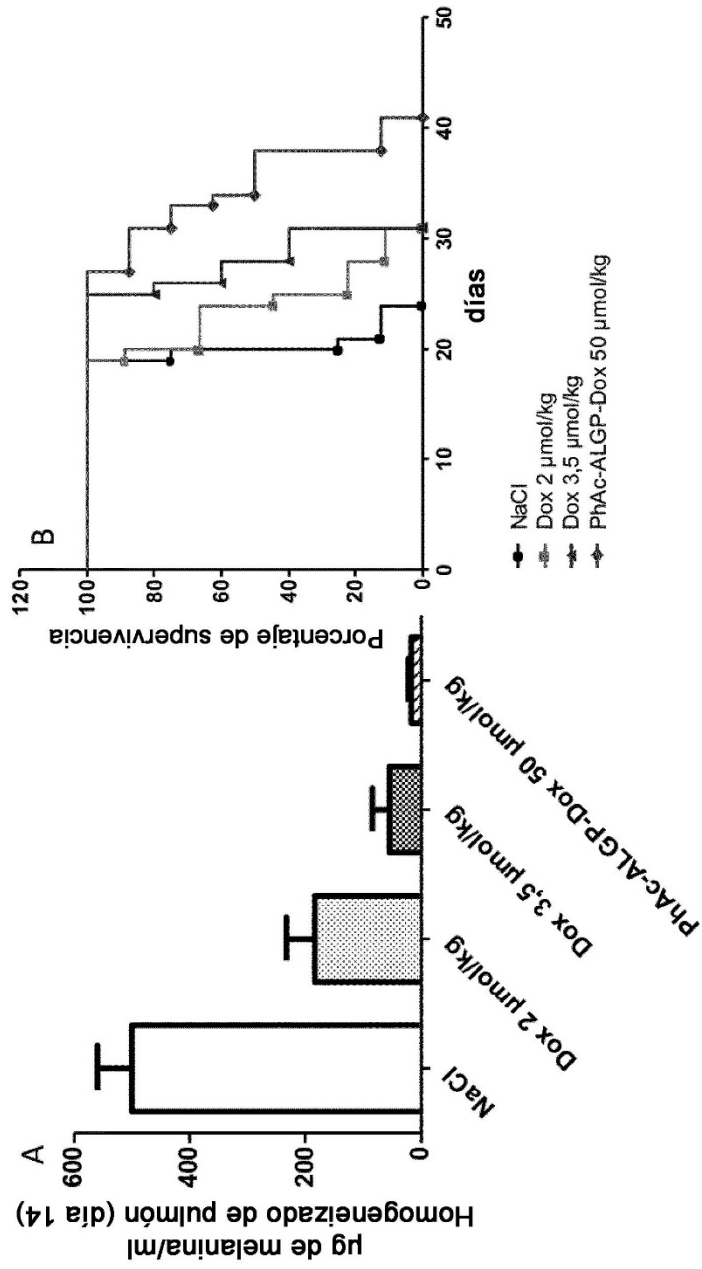


FIGURA 11

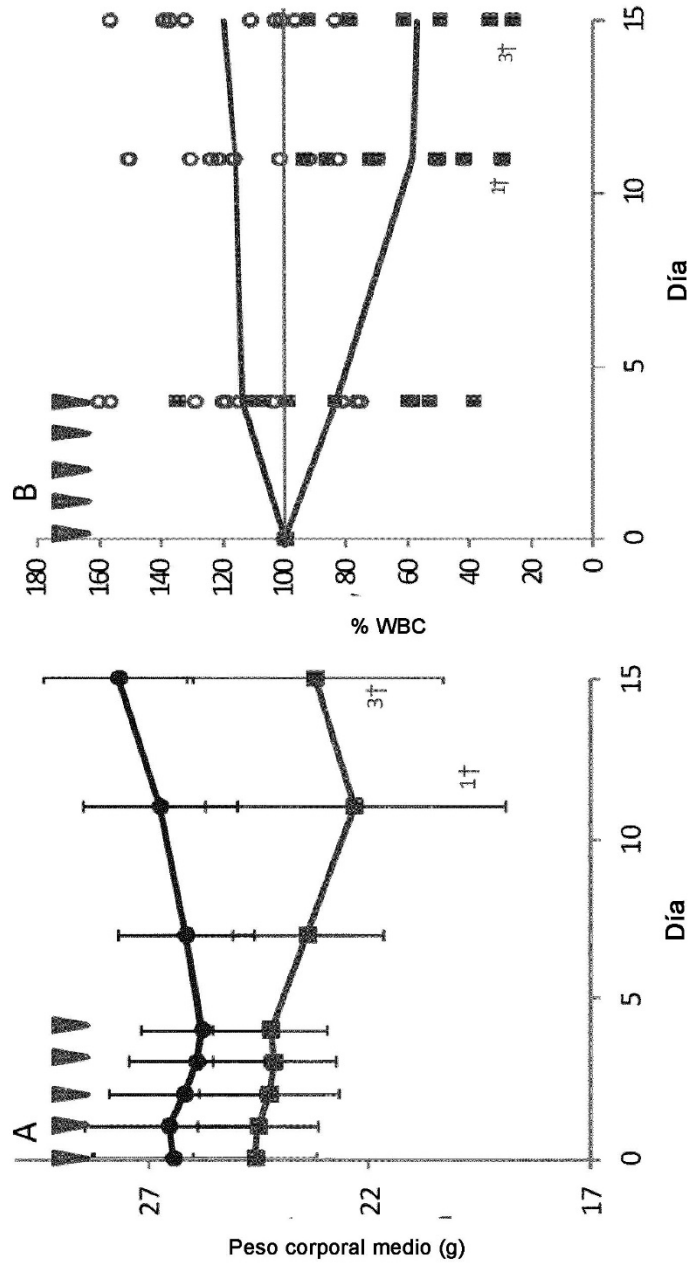


FIGURA 12

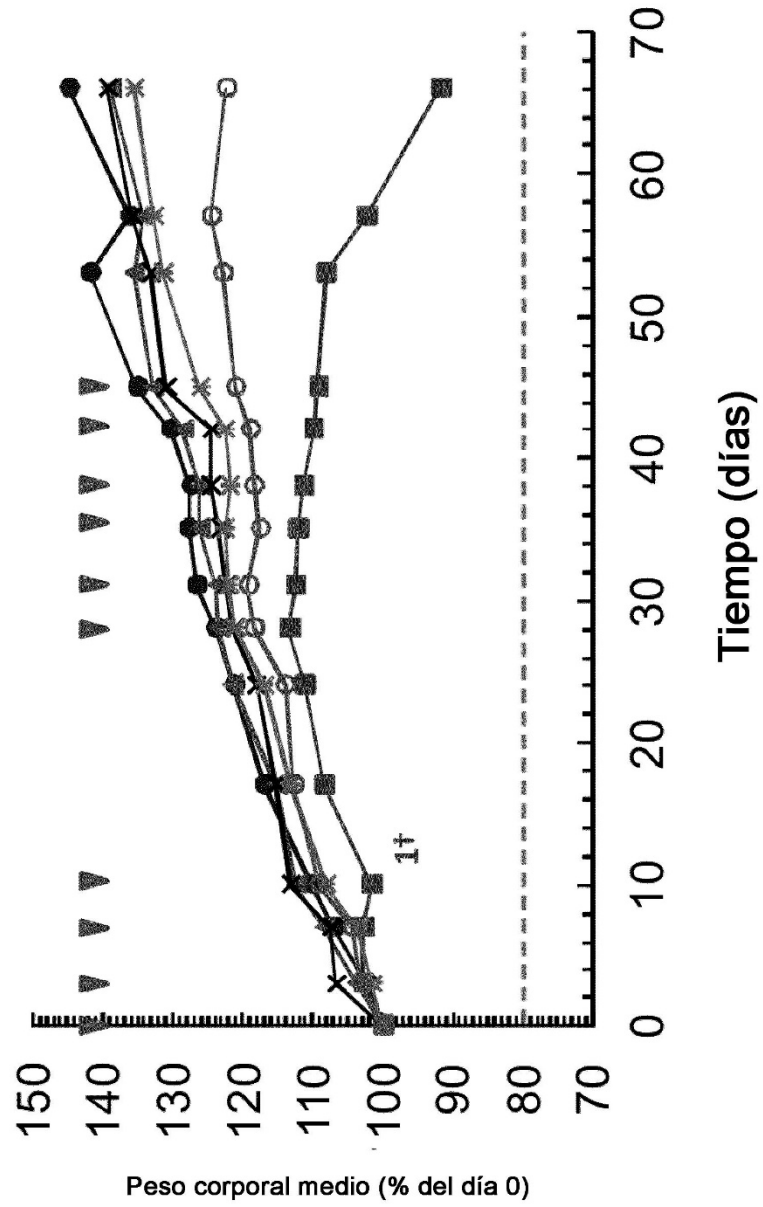
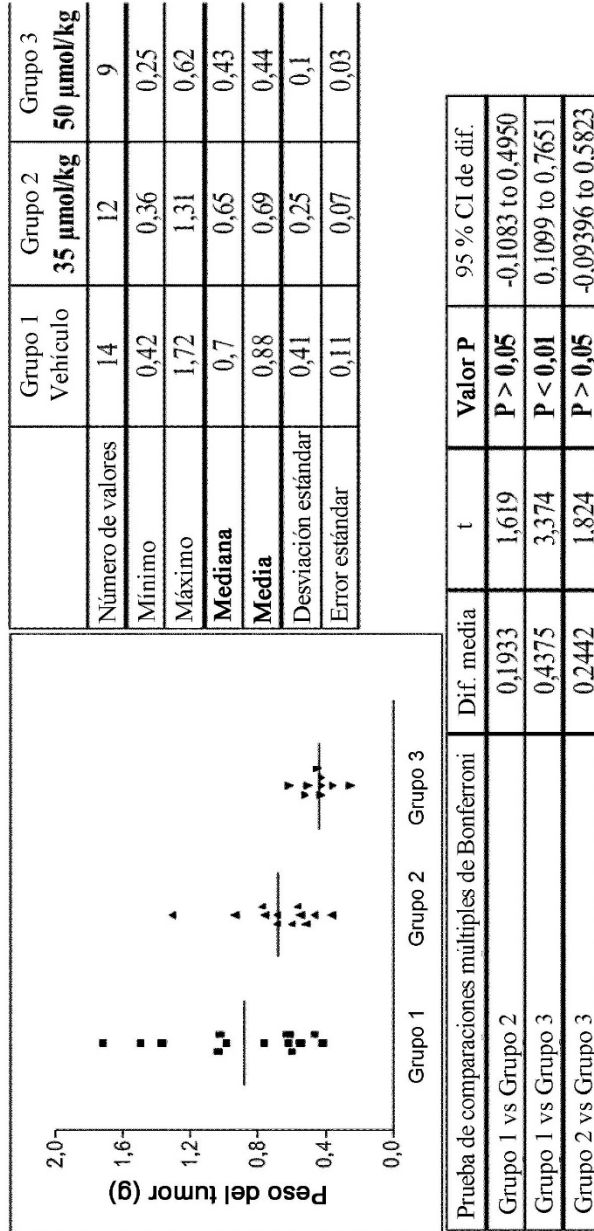


FIGURA 13



	Grupo 1 Vehículo	Grupo 2 35 µmol/kg	Grupo 3 50 µmol/kg
Número de valores	14	12	9
Mínimo	0,42	0,36	0,25
Máximo	1,72	1,31	0,62
Mediana	0,7	0,65	0,43
Media	0,88	0,69	0,44
Desviación estándar	0,41	0,25	0,1
Error estándar	0,11	0,07	0,03

FIGURA 14

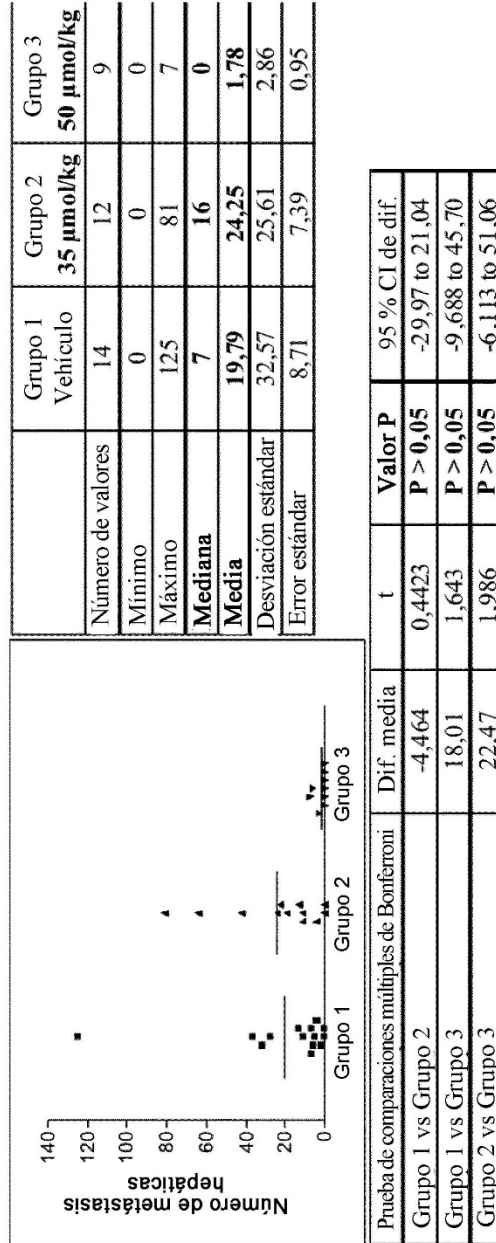


FIGURA 15

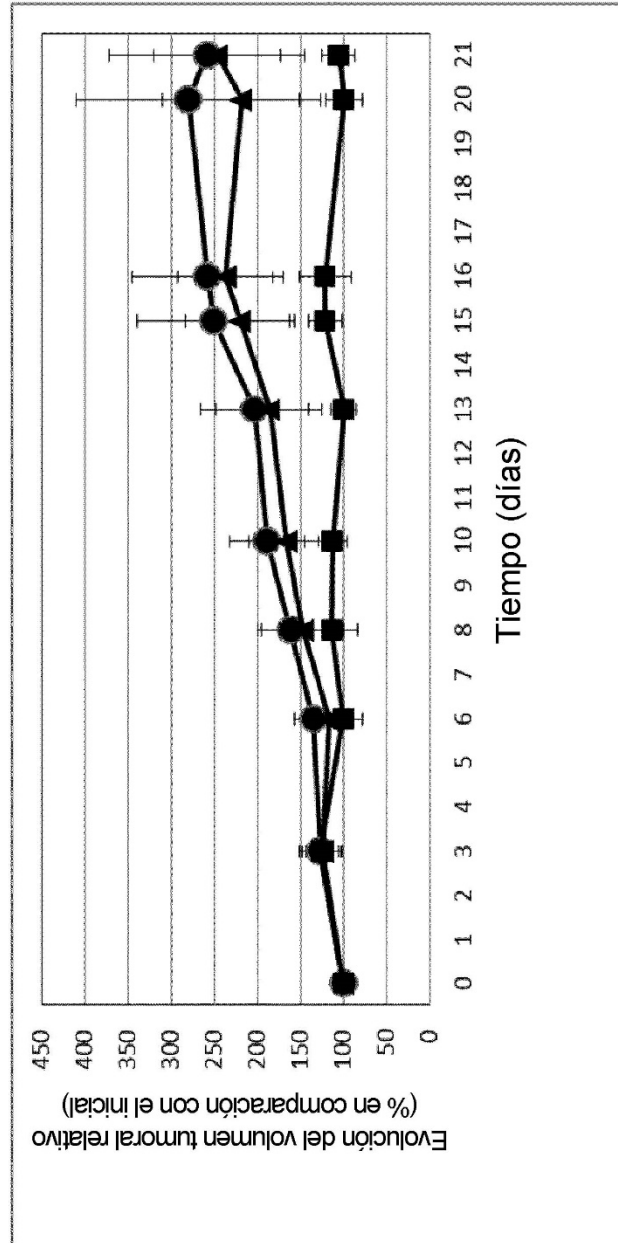


FIGURA 16

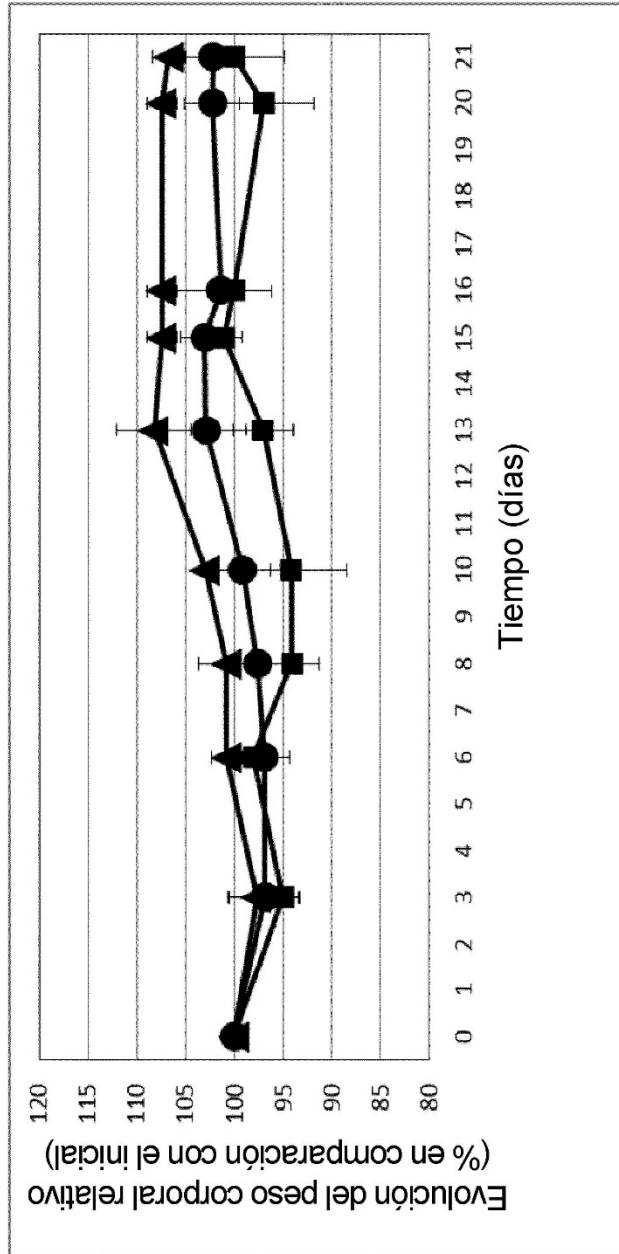


FIGURA 17

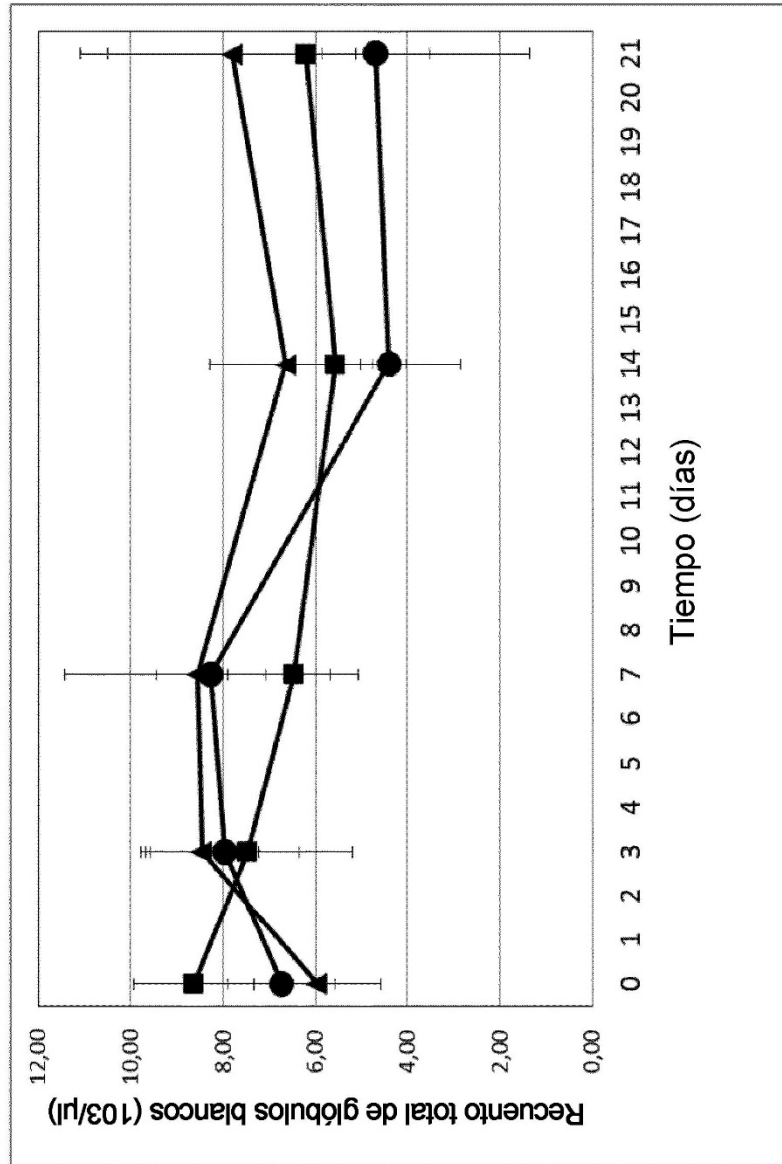


FIGURA 18

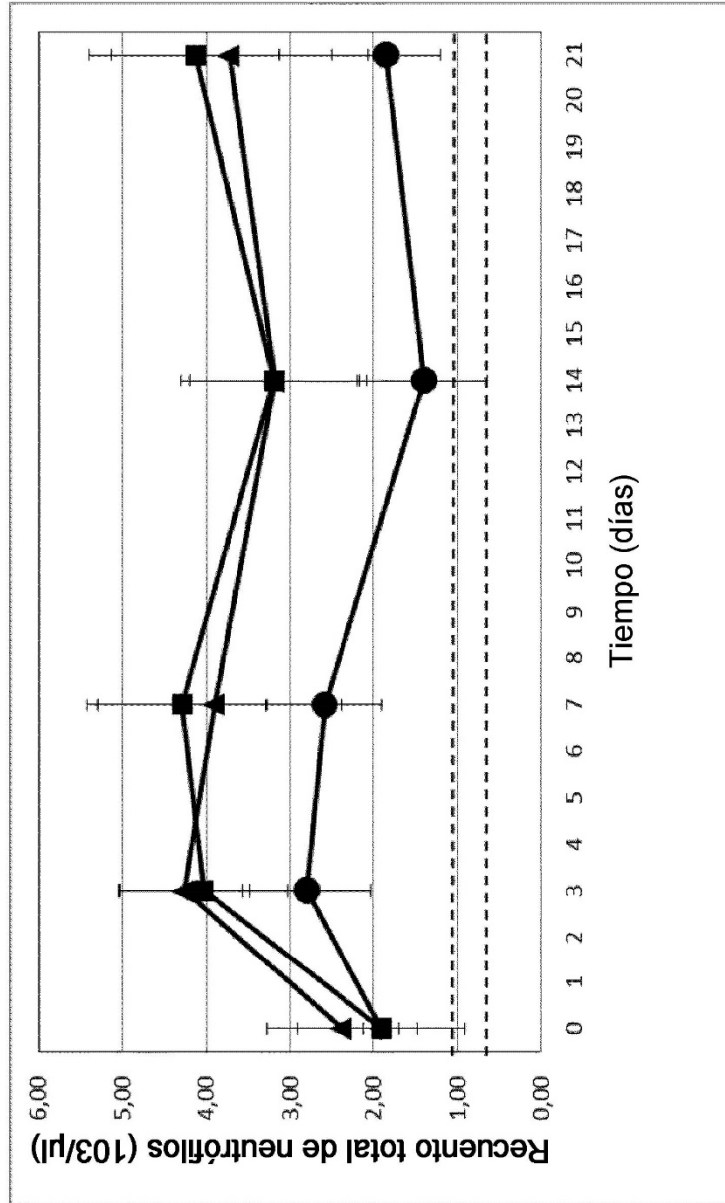


FIGURA 19