

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 929 179**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)	C07K 5/107	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)	C07K 5/065	(2006.01)
A61K 47/54	(2007.01)	A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/69	(2006.01)	A61P 17/06	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)		
C07K 5/087	(2006.01)		
C07K 5/062	(2006.01)		
C07K 5/083	(2006.01)		
C07K 5/097	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2012 PCT/US2012/053140**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13033396**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2012 E 12827686 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 2753334**

(54) Título: **Inhibidores del proteasoma activados por FAP para el tratamiento de tumores sólidos**

(30) Prioridad:

30.08.2011 US 201161528824 P

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

25.11.2022

(73) Titular/es:

**TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE (100.0%)
136 Harrison Avenue
Boston, MA 02111, US**

(72) Inventor/es:

**BACHOVCHIN, WILLIAM W.;
LAI, HUNG-SEN y
POPLAWSKI, SARAH E.**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 929 179 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

Inhibidores del proteasoma activados por FAP para el tratamiento de tumores sólidos

5 Antecedentes de la invención

Una de cada cuatro muertes en los Estados Unidos se debe al cáncer, la segunda causa principal de muerte después de las enfermedades cardíacas. El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad entre los cánceres, y la mayoría de los pacientes tienen cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) localmente avanzado o metastásico en el momento del diagnóstico. En las mujeres, el cáncer de mama es el cáncer de mayor prevalencia y es la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer.

El estándar actual de atención para el tratamiento de cánceres sólidos tiene una eficacia limitada. Por ejemplo, en el NSCLC la supervivencia se mantiene escasa a pesar de las mejoras logradas mediante la adición de agentes dirigidos a la quimioterapia de primera línea basada en el platino. En el cáncer de mama metastásico, la eficacia de trastuzumab está limitada por la resistencia del tumor. Cuando el NSCLC progresó después de la terapia de primera línea, los agentes de segunda línea aprobados solo logran tasas de supervivencia modestas.

Claramente se necesitan agentes anticancerígenos más efectivos. Muchos medicamentos contra el cáncer aprobados, tales como bortezomib (Velcade®), son agentes citotóxicos que destruyen las células normales así como también las células tumorales. El beneficio terapéutico de estos fármacos depende de que las células tumorales sean más sensibles que las normales, de esta manera se logran respuestas clínicas con dosis de fármacos relativamente seguras; sin embargo, el daño a los tejidos normales es inevitable y a menudo limita el tratamiento. Después del éxito del bortezomib en el tratamiento del mieloma múltiple (MM), la inhibición del complejo del proteasoma surgió como un nuevo y prometedor enfoque de la quimioterapia. Debido a su notable eficacia en el tratamiento del mieloma múltiple, el bortezomib se probó en cánceres sólidos; desafortunadamente, generalmente no ha logrado producir respuestas clínicas.

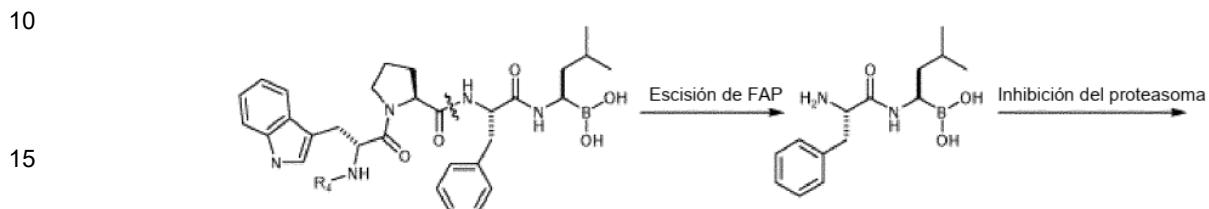
Bortezomib inhibe un complejo proteico intracelular llamado proteasoma. El proteasoma es un objetivo farmacológico atractivo porque está implicado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, procesos que, cuando se desregulan en las células cancerosas, conducen a la progresión del tumor, la resistencia a los medicamentos y la vigilancia inmunológica alterada. Mediante la inhibición del proteasoma 20S, que degrada selectivamente las proteínas implicadas en la homeostasis celular, el bortezomib estabiliza los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, inhibe dos trayectorias principales que conducen a la activación del NF-κB y provoca la acumulación intracelular de proteínas mal plegadas; todos estos efectos contribuyen a la destrucción de las células tumorales. El bloqueo de la activación de NF-κB aumenta la apoptosis, reduce la producción de citocinas angiogénicas, inhibe la adhesión de las células tumorales al estroma y alivia la supresión inmunitaria.

Sin embargo, el uso más amplio de bortezomib para tratar el cáncer parece evitarse por la toxicidad sistémica. El bortezomib se distribuye a los tejidos sanos, lo que causa diarrea, fatiga, retención de líquidos, hipopotasemia, hiponatremia, hipotensión, malestar general, náuseas, ortostatismo, neuropatía periférica inducida por el bortezomib (BIPN) y toxicidades hematológicas, de las cuales la trombocitopenia es la de mayor gravedad. A la dosis recomendada de bortezomib, existe una ventana terapéutica para el tratamiento del MM que puede proporcionarse por la sensibilidad única de las células del MM a la inhibición del factor nuclear-κB (NF-κB) y la inducción de la respuesta de proteína desplegada. Sin embargo, los cánceres sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, páncreas y de mama) parecen ser menos sensibles y los intentos de lograr la eficacia mediante el aumento de la dosificación de bortezomib se evitan por las toxicidades limitantes de la dosis (DLT). La escasa localización de bortezomib en los tumores parece contribuir a su bajo índice terapéutico (TI) en cánceres sólidos. En ratones portadores de tumores de próstata PC3, la exposición de órganos sanos a ¹⁴C-bortezomib fue hasta 9 veces mayor que la exposición tumoral, y la inhibición del proteasoma en el tejido sano parece ser mayor que en los tumores sólidos. Por tanto, es necesario diseñar compuestos que se dirijan selectivamente al proteasoma en las células tumorales para superar el obstáculo de las DLT debidas a la inhibición del proteasoma en los tejidos sanos.

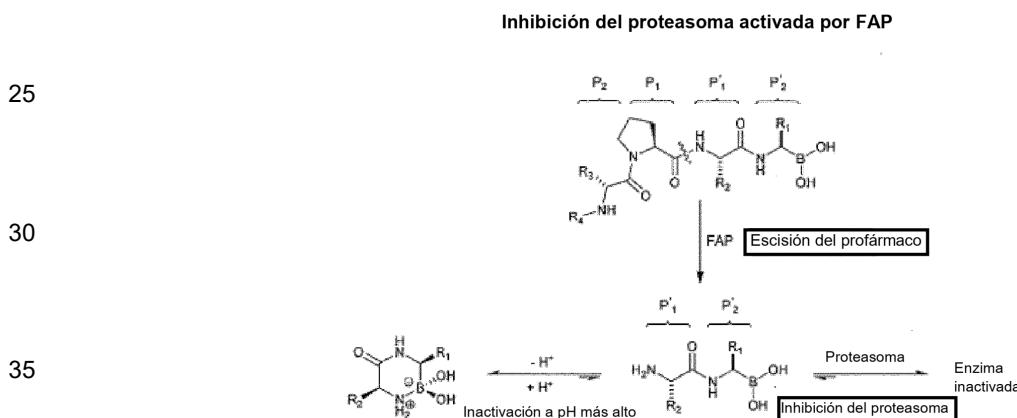
En las últimas décadas se realizaron grandes esfuerzos para crear terapias adaptadas a cada paciente, la llamada medicina personalizada. Debido a los avances en la tecnología de secuenciación genética, ahora es posible y cada vez más rentable genotipar el tejido canceroso para identificar el perfil genético individual del cáncer y, por tanto, las proteínas específicas mutadas o disfuncionales que pueden ser responsables del crecimiento tumoral. Estas proteínas "conductoras" pueden luego ser dirigidas con agentes que bloquen su función y, por tanto, destruyen el cáncer. Aunque conceptualmente es sólido, este enfoque está obstaculizado por la inesperada diversidad genética y la inestabilidad genómica del cáncer. Pueden estar presentes genotipos de cáncer significativamente diferentes dentro de un único tumor, lo que hace que la terapia dirigida sea ineficaz para muchos pacientes. Incluso cuando la mayoría de las células cancerosas de un tumor comparten una composición genética lo suficientemente parecida como para que una única terapia dirigida sea efectiva, un pequeño número de células cancerosas portadoras de una mutación resistente pueden sobrevivir a la terapia, lo que conduce a una recaída tras una mejora inicial.

Se necesitan terapias dirigidas selectivamente al tumor y su microambiente con agentes citotóxicos cuyo efecto no dependa de la composición genética del cáncer. Sin embargo, dichas terapias se mantienen distantes.

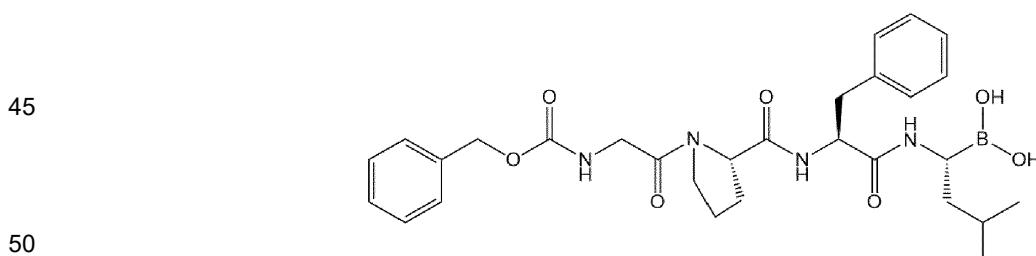
- 5 Los documentos WO 2009/006473 A2 y WO 2008/116054 A1 describen compuestos profármacos que pueden escindirse mediante la FAP, lo que resulta en una fracción que luego exhibe la inhibición del proteasoma. El documento WO 2009/006473 A2 proporciona el siguiente ejemplo de escisión mediante FAP del profármaco R4-TrP-PrO-Phe-Leu-B(OH)2:



- 20 La figura 3 del documento WO 2008/116054 A1 representa el siguiente esquema general para la inhibición del proteasoma activado por FAP mediante los compuestos de oxocarbonilo de la presente invención:

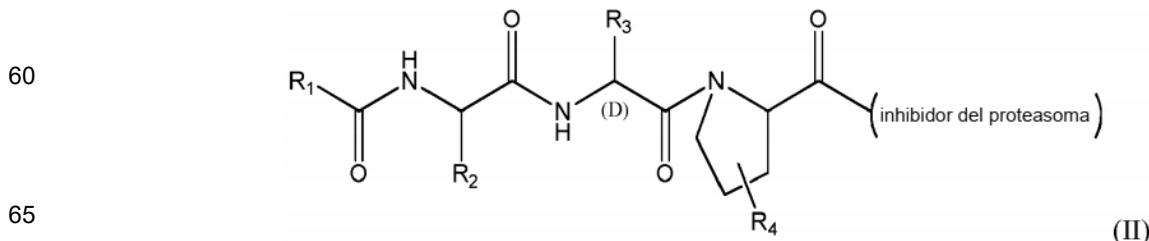


- 40 El documento US 2006/0089312 A1 describe profármacos de inhibidores de la proteasa, tales como inhibidores del proteasoma, DPOP IV, FAP-alfa y similares. Un profármaco ilustrativo es el compuesto 47g:



Resumen de la invención

- 55 Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto representado por la fórmula II:



en donde

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; - C(=O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(=O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;

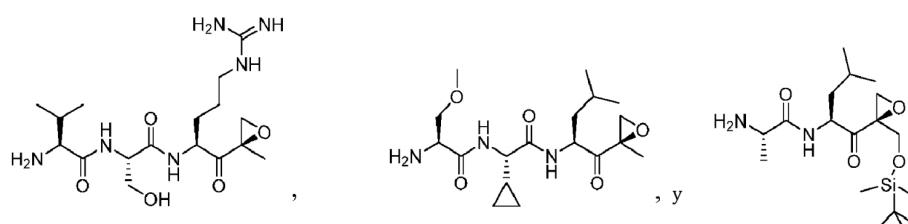
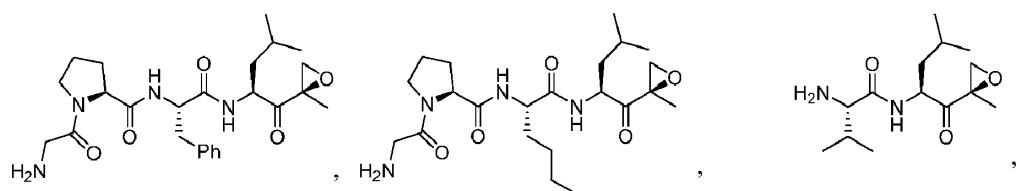
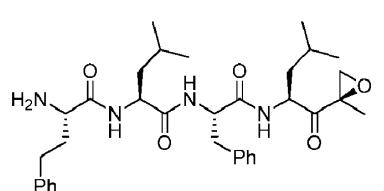
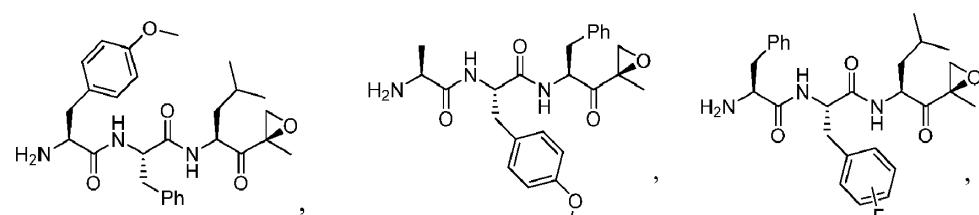
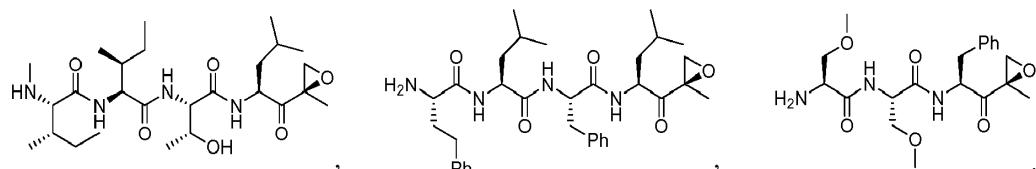
R_2 representa H, alquilo (C_1-C_{10}), o un alquilo (C_1-C_{10}) mono- o di-hidroxi-sustituido;

R_3 representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);

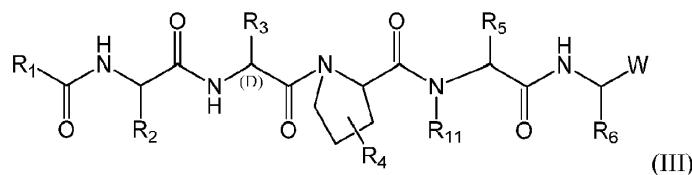
R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno;

el compuesto se escinde por FAP para liberar un inhibidor del proteasoma, en donde:

el inhibidor del proteasoma se selecciona del grupo que consiste en:



O
un compuesto representado por la fórmula III:



en donde

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; - C(=O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(=O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;

R₂ representa H, alquilo (C₁-C₁₀), o un alquilo (C₁-C₁₀) mono- o di-hidroxi-sustituido; R₃ representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);

R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno;

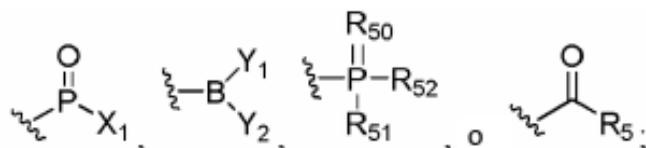
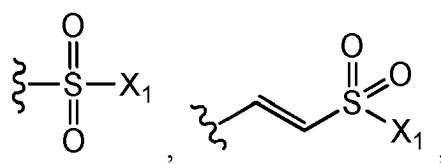
R₅ representa una cadena lateral grande de aminoácido hidrófobo;

R₆ representa alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo, arilo, heterociclo o -(CH₂)_n-R₇;

R₇ representa arilo, aralquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquistio, -OH o -SH;

R₁₁ representa H o alquilo (C₁-C₁₀);

W representa -CN, una epoxicetona, -CH=NR₈,



R₈ representa H, alquilo, alquenilo, alquinilo, -C(X₁)(X₂)X₃, -(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-OH, -(CH₂)_nO-alquilo, -(CH₂)_nO-alquenilo, -(CH₂)_nO-alquinilo, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-SH, -(CH₂)_nS-alquilo, -(CH₂)_nS-alquenilo, -(CH₂)_nS-alquinilo, -(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₉, -C(=O)C(=O)NH₂, -C(=O)C(=O)OR₁₀;

R₉ representa, independientemente para cada ocurrencia, un arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

R₁₀ representa, independientemente para cada ocurrencia, hidrógeno, o un alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

Y₁ y Y₂ pueden ser juntos o independientemente OH, o un grupo capaz de hidrolizarse a un grupo hidroxilo, que incluyen los derivados cíclicos donde Y₁ y Y₂ están conectados a través de un anillo que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

R₅₀ representa O S;

R₅₁ representa N₃, SH₂, NH₂, NO₂ o -OR₁₀;

R₅₂ representa hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), amina, -OR₁₀, o una sal farmacéuticamente aceptable, o R₅₁ y R₅₂ tomados junto con el átomo de fósforo al que están unidos, completan un anillo heterocíclico que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

X₁ es halógeno;

cada X₂ y X₃ representa H o halógeno;

m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8; y

n es un número entero en el intervalo de 1 a 8.

50 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la síntesis de ARI-2727D y ARI-3996. Se usaron los siguientes reactivos: (a) HATU/DMF/DIPEA, 95 %; (b) HCl 4 M en dioxano, 100 %; (c) HATU/DMF/DIPEA, 90 %; (d) HCl 4 M en dioxano, 100 %; (e) tBu-Suc-Ser(tBu)-OH, HATU/DMF/DIPEA, 90 %; f) Pd(OH)₂-C/H₂/metanol, 90 %; (g) 2727D, HATU/DMF/DIPEA, 85 %; (h) TFA/DCM, 90 %; (i) PhB(OH)₂, pentano-agua-acetonitrilo, 70 %.

La Figura 2 muestra la tasa de escisión *in vitro* de ARI-3996 por FAP y PREP en función de la concentración de ARI-3996. La escisión se monitoreó mediante el ensayo de liberación de ARI-2727 de "ojiva" mediante el uso de LCMS.

La Figura 3 muestra la escisión *in vitro* de ARI-3144 ((N-quinolina-4-carbonilo)-D-Ala-Pro-AMC) por FAP, pero no por DPP IV, DPP 8, DPP 9 o PREP. La escisión se monitoreó al medir la fluorescencia del grupo saliente AMC (excitación, 355 nm; emisión, 460 nm).

La Figura 4 muestra la relación de la actividad proteolítica de FAP en seres humanos y ratones para el tejido tumoral pancreático y el plasma. Se ensayó la actividad de FAP ex-vivo en homogeneizados tumorales y plasma mediante el uso del sustrato fluorogénico ARI-3144.

La Figura 5 muestra la actividad proteolítica de FAP en xenoinjertos de células HEK293 transfectadas con FAP y células HPAF-11. La actividad de FAP se ensayó mediante el uso del ensayo ARI-3144.

- La Figura 6 muestra una comparación de las actividades antitumorales de ARI-3996 y bortezomib (Velcade®) en los respectivos MTD en ratones SCID portadores de xenoinjertos de carcinoma HPAF-II establecidos (~200 mm³). ARI-3996 y bortezomib se administraron dos veces por semana (esquema día (D)1/ D4), y ARI-3996 también se administró del día 1 al día 5 durante 5 días consecutivos (esquema QDx5). Los asteriscos indican reducciones significativas ($p < 0,05$) del tamaño del tumor en los ratones tratados con ARI-3996, en comparación con los controles.
- La Figura 7 muestra la distribución de [¹⁴C] bortezomib a los tejidos y al tumor 1 hora después de la inyección iv. El gráfico y los datos fueron tomados de Adams y otros (71). Los datos son la media de dpm/100 mg de tejido y la media de dpm/100 µL de sangre.
- La Figura 8 muestra la distribución en el tejido de ARI-3996 y la ojiva 2727D en ratones SCID portadores de tumores HPAF-II por vía s.c. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados por vía s.c. con 50 mg/kg de ARI-3996. Los tejidos se cosecharon en 1 (A, B), 2 (C, D) y 3 horas ($n = 2$) después de la administración de ARI-3996, y las concentraciones del fármaco en los extractos de tejidos se determinaron por LCMS.
- La Figura 9 muestra el efecto antitumoral de ARI-3996 administrado por vía i.p. (IP) y s.c. (SQ) a 50 mg/kg dos veces al día (b.i.d) en los días 1 y 4 a ratones SCID portadores de xenoinjertos HPAF-II. ANOVA de una vía con posprueba de Dunnett para la prueba frente al vehículo ($P < 0,0001$).
- La Figura 10 muestra la actividad antitumoral de 50 mg/kg de ARI-3996 con o sin 6 mg/kg de gemcitabina. Se administró ARI-3996 b.i.d. por vía s.c. y gemcitabina una vez al día por vía i.p. dos veces por semana. Media ± SEM. Los dos compuestos exhiben un fuerte efecto sinérgico cuando se administran juntos.
- La Figura 11 muestra una imagen del sustrato fluorogénico de diagnóstico ARI-3144. El sitio de reconocimiento del FAP se une específicamente al FAP y es escindido por la enzima para liberar la fracción de cumarina fluorogénica.
- La Figura 12 muestra una imagen de ARI-3144 después de unirse a FAP. El sitio de reconocimiento FAP se escinde para liberar la fracción de cumarina fluorescente.
- La Figura 13 muestra que el ARI-3144 es un excelente sustrato para la FAP.
- La Figura 14 muestra mediciones de fluorescencia de la tasa de escisión de ARI-3144 por PREP, DPPIV, DPP8, DPP9 y DPPII. ARI-3144 es altamente selectivo para FAP.
- La Figura 15 muestra una imagen del profármaco ARI-3996, que contiene un sitio de reconocimiento FAP unido químicamente a ARI-2727D, un inhibidor del proteasoma que permanece inactivo mientras está unido al sitio de reconocimiento FAP (parte superior) y una imagen de lo que ocurre después de la escisión por FAP; la "ojiva" activa ARI-2727D se libera del sitio de reconocimiento FAP (parte inferior).
- La Figura 16 muestra actividad de FAP en tejidos de ratón cancerosos y normales. La actividad de FAP mucho más alta en y alrededor del tumor indica que FAP está regulada positivamente en ese tejido.
- La Figura 17 muestra actividad de FAP en líneas de células tumorales humanas y xenoinjertos de tumor de ratón HPAF-II. La actividad de FAP es generalmente más alta en las líneas de células tumorales humanas que en los xenoinjertos de tumores de ratón. Es probable que la actividad de la FAP sea aún más alta de lo que se muestra debido a una cierta desactivación de la FAP durante la recogida y manipulación de las muestras.
- La Figura 18 muestra un gráfico de la actividad de FAP en varios tejidos. Los xenoinjertos de tumor HEK transfectados con FAP coinciden con el tejido tumoral pancreático humano en cuanto al contenido de FAP.
- La Figura 19 muestra el volumen tumoral medio de los ratones tratados con un vehículo de control o con ARI-3996. ARI-3996 induce la regresión tumoral en ratones inmunocompetentes.
- La Figura 20 muestra la actividad anticancerígena de ARI-3996 en xenoinjerto de tumor HEK transfectado con FAP.
- La Figura 21 muestra que el plasma sanguíneo de ratón inactivado para FAP no activa ARI-3996 para liberar ARI-2727.
- La Figura 22 muestra la distribución en el tejido de Velcade® frente a ARI-3996 en ratones.
- La Figura 23 muestra la distribución en el tejido de Velcade® frente a ARI-2727D en ratones. ARI-3996 se escinde en ARI-2727D dentro y alrededor de los tumores, lo que facilita, por tanto, la acumulación de ARI-2727D en los tumores.
- La Figura 24 muestra la distribución en el tejido de ARI-2727D 1 hora después de la administración directa frente a la administración como forma de profármaco, ARI-3996 (parte superior); y la relación promedio en la que ARI-2727D se acumula en el tumor frente al hígado.
- La Figura 25 muestra la citotoxicidad de Velcade® frente a ARI-2727D en mieloma múltiple, células normales y tumores sólidos.
- La Figura 26 muestra la citotoxicidad de Velcade® frente a ARI-2727D frente a ARI-3996 en mieloma múltiple, células normales y tumores sólidos.
- La Figura 27 muestra la actividad de FAP en diversas líneas celulares de cáncer humano.
- La Figura 28 muestra los efectos anticancerígenos de los inhibidores del proteasoma Velcade® y ARI-3996 en ratones portadores del tumor U266.
- La Figura 29 muestra las estructuras químicas y los nombres de varios inhibidores del proteasoma conocidos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos diseñados selectivamente para dirigirse tumores sólidos con un perfil de toxicidad reducido. Bortezomib (Velcade®) es un tratamiento efectivo para el mieloma múltiple, pero su mecanismo de acción resulta en toxicidades limitantes de la dosis (DLT) de neuropatía periférica y pérdida de plaquetas, que

evitan el tratamiento de cánceres sólidos comunes. Los compuestos de la presente invención están diseñados para mantenerse inactivos en órganos sanos y para ser activados por la enzima asociada a tumores llamada proteína de activación de fibroblastos (FAP) para liberar una ojiva citotóxica similar a bortezomib en tumores, y de esta manera se reducen los efectos secundarios tóxicos que evitan el tratamiento seguro de tumores sólidos con bortezomib.

5 El direccionamiento selectivo y la toxicidad reducida de los compuestos de la invención permiten el tratamiento de cánceres sólidos independientemente de su composición genética. Además, la activación selectiva de los compuestos en los alrededores de los tumores da como resultado una alta concentración del agente citotóxico en el tumor pero una baja concentración en el resto del cuerpo. La alta concentración local destruye los tumores con una dosis más 10 baja del fármaco de lo que era posible anteriormente, porque un fármaco que carece de la capacidad de suministrarse selectivamente circula por todo el cuerpo, por lo que causa toxicidad sistémica, a menudo en una dosis que es subóptima para el tratamiento del cáncer.

15 La presente invención también permite compensar las propiedades inmunosupresoras de los tumores. Debido a que los tumores sólidos a menudo están rodeados de células estromales cancerosas, están protegidos del sistema inmunitario del paciente. Esta inmunosupresión puede eliminarse al destruir las células del estroma, pero las quimioterapias convencionales, que incluyen Velcade® no lo consiguen. La presente invención es capaz de destruir células del estroma porque sobreexpresan FAP y, por tanto, activan los compuestos de la invención para liberar la ojiva. Por tanto, la presente invención puede tener múltiples mecanismos de acción, tales como la destrucción directa 20 de los tumores o la reactivación de la respuesta inmunitaria del paciente después de la destrucción del tejido estromal de soporte, lo que resulta en la destrucción del tumor a través de una respuesta inmunitaria natural.

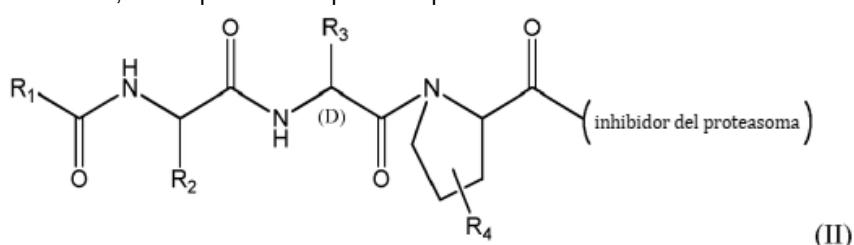
25 La fracción de dirección FAP, o la porción de unión FAP, de la invención puede unirse químicamente a una variedad de ojivas citotóxicas. Por tanto, cualquier inhibidor del proteasoma con un objetivo y un modo de acción validados se beneficiaría de su uso con la invención reivindicada. La conjugación (unión química) de un inhibidor del proteasoma validado que posee actividad anticancerígena, a la fracción de dirección FAP confiere un suministro selectivo, un aumento de la potencia y una disminución de la toxicidad fuera del objetivo.

30 La conjugación de la fracción de dirección FAP con un inhibidor de proteasa conocido es similar, pero conceptualmente diferente, a un profármaco, porque la fracción de dirección FAP está diseñada para unirse y escindirse por FAP selectivamente sobre otras proteasas presentes en el cuerpo, especialmente DPPII, DPP8, DPP9, DPPIV y PREP. Esta especificidad para el subtipo de enzima es esencial para el efecto deseado de suministrar el agente citotóxico liberado al tumor.

35 Se conocen en la técnica muchos inhibidores del proteasoma con actividad anticancerígena, que pueden dividirse de acuerdo con los inhibidores covalentes y no covalentes, y los inhibidores covalentes se dividen además en aldehídos, boronatos, epoxicetonas, betalactonas, vinil sulfonas y α,β-carbonilos insaturados, entre otros. Los ejemplos en la clase de aldehído incluyen MG-132, PSI y felutamida B. Los ejemplos en la clase de boronato incluyen bortezomib (Velcade®), CEP-18770, MLN2238 y MLN9708. Los ejemplos en la clase de epoxicetona incluyen epoxomicina, 40 carfilzomib (PR-171), NC-005, YU-101, LU-005, YU-102, NC-001, LU-001, NC-022, PR-957 (LMP7), CPSI (β5), LMP2-sp-ek, BODIPY-NC-001, azido-NC-002, y ONX 0912 (opromozib). Los ejemplos en la clase de betalactona incluyen omuralida, PS-519, marizomib y belactosina A. Los ejemplos en la clase de vinilsulfona incluyen ¹²⁵I-NIP-L₃VS, NC-005-VS y MV151. La discusión y validación de estos inhibidores y otros pueden encontrarse, por ejemplo, en Kisseelev y otros "Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target," Chemistry and Biology 19, 27 de enero 45 de 2012, 99-115.

50 Se espera que la conjugación química de cualquiera de estos inhibidores del proteasoma con una fracción de dirección FAP como se describe en la presente invención suministre selectivamente el agente citotóxico a los tumores sólidos y a las células estromales circundantes. Dado que la fracción de dirección FAP es un sustrato selectivo para FAP, la identidad del agente citotóxico unido a la fracción de dirección FAP no es importante para el suministro selectivo. La FAP escindirá el enlace químico que une la fracción de dirección a la ojiva; dicho enlace químico puede ser, por ejemplo, un enlace éster o amida, entre otros.

55 En determinadas modalidades, el compuesto se representa por la fórmula II:



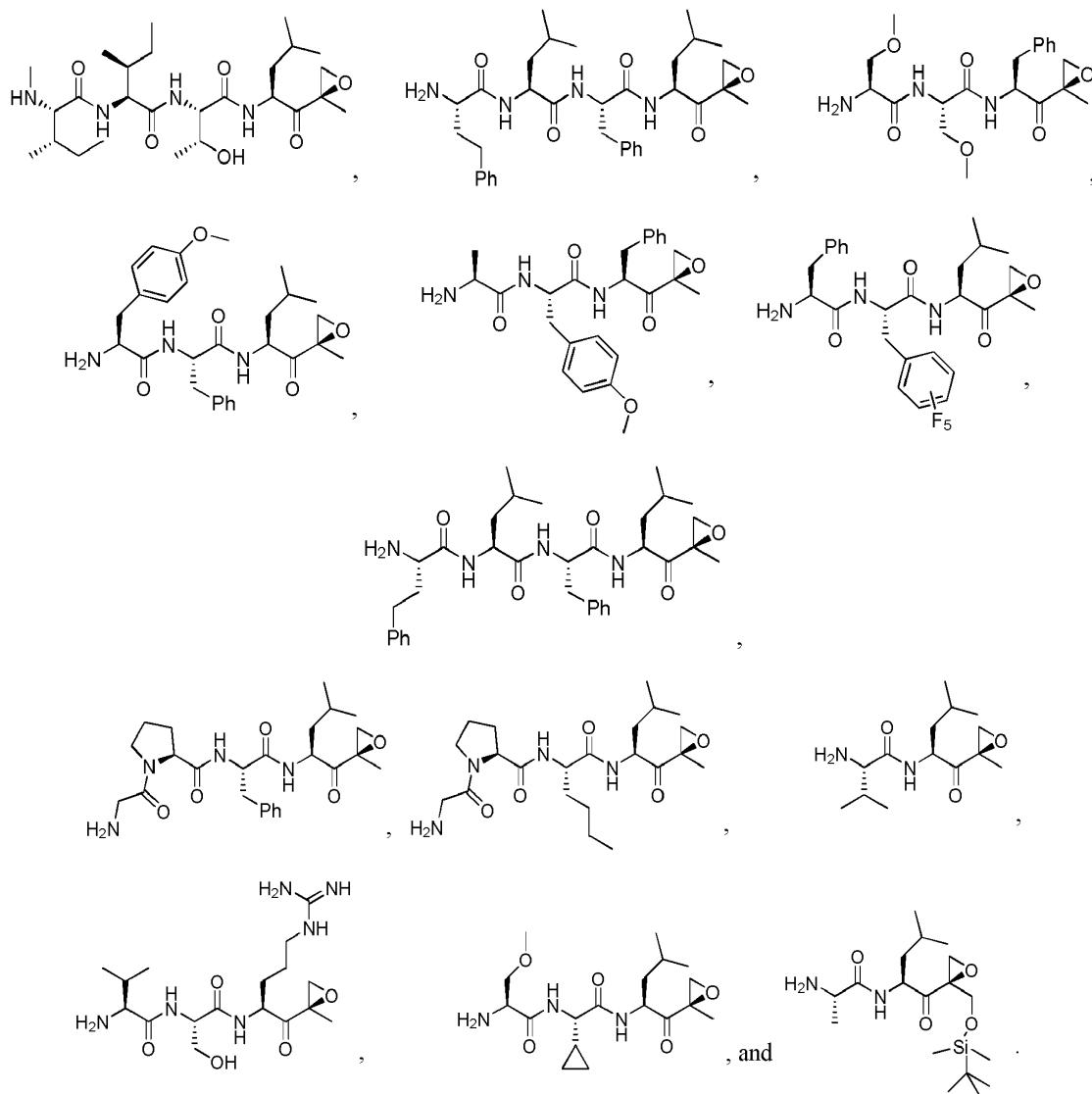
65 en donde

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; -C(=O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(=O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;

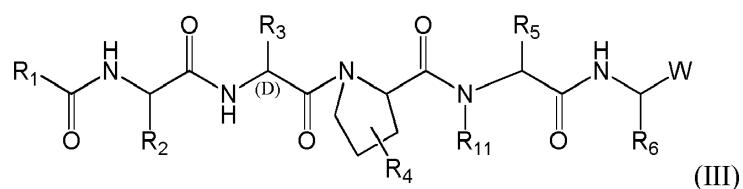
R₂ representa H, alquilo (C₁-C₁₀), o un alquilo (C₁-C₁₀) mono- o di-hidroxi-sustituido;

R₃ representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);

R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno; y el compuesto se escindió por FAP para liberar un inhibidor de proteasoma, en donde el inhibidor de proteasoma se selecciona del grupo que consiste en:



En otras modalidades, el compuesto se representa por la fórmula III:



en donde

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; -C(=O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(=O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;

R₂ representa H, alquilo (C₁-C₁₀), o un alquilo (C₁-C₁₀) mono- o di-hidroxi-sustituido;

R₃ representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);

R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno;

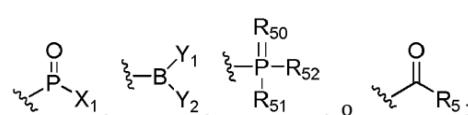
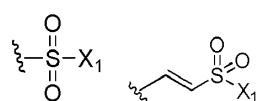
R₅ representa una cadena lateral grande de aminoácido hidrófobo;

R₆ representa alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo, arilo, heterociclo o -(CH₂)_n-R₇;

R₇ representa arilo, aralquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquistio, -OH o -SH;

R₁₁ representa H o alquilo (C₁-C₁₀);

W representa -CN, una epoxicetona, -CH=NR₅,



R₈ representa H, alquilo, alquenilo, alquinilo, -C(X₁)(X₂)X₃, -(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-OH, -(CH₂)_n-O-alquilo, -(CH₂)_n-O-alquenilo, -(CH₂)_n-O-alquinilo, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-SH, -(CH₂)_n-S-alquilo, -(CH₂)_n-S-alquenilo, -(CH₂)_n-S-alquinilo, -(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₉, -C(=O)C(=O)NH₂, -C(=O)C(=O)OR₁₀;

R₉ representa, independientemente para cada ocurrencia, un arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

R₁₀ representa, independientemente para cada ocurrencia, hidrógeno, o un alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

Y₁ y Y₂ pueden ser juntos o independientemente OH, o un grupo capaz de hidrolizarse a un grupo hidroxilo, que incluyen los derivados cíclicos donde Y₁ y Y₂ están conectados a través de un anillo que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

R₅₀ representa O o S;

R₅₁ representa N₃, SH₂, NH₂, NO₂ o -OR₁₀;

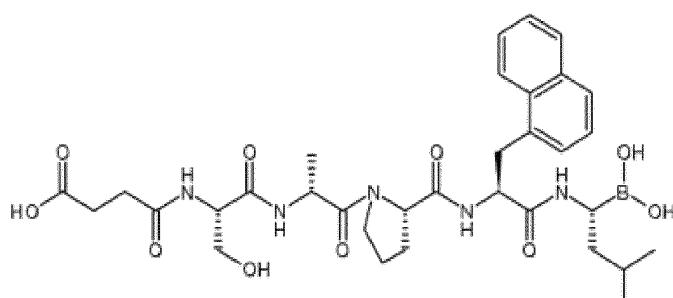
R₅₂ representa hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), amina, -OR₁₀, o una sal farmacéuticamente aceptable, o R₅₁ y R₅₂ tomados junto con el átomo de fósforo al que están unidos, completan un anillo heterocíclico que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

X₁ es halógeno;

cada X₂ y X₃ representa H o halógeno;

m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8; y n es un número entero en el intervalo de 1 a 8.

En determinadas modalidades, el compuesto se representa por



También sin formar parte de la presente invención, se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente descripción; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También sin formar parte de la presente invención, se describe un método de:

- i) inhibir la función del proteasoma en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- ii) reducir la tasa de degradación de la proteína muscular en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- 5 iii) reducir la actividad de NF- κ B en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- iv) reducir la tasa de desintegración de proteínas intracelulares dependientes del proteasoma, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- 10 v) reducir la tasa de degradación de la proteína p53 en una célula, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- vi) inhibir la degradación de ciclina en una célula, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción; y
- vii) inhibir la presentación de antígenos en una célula, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método para tratar el cáncer, la psoriasis, la reestenosis u otra enfermedad de proliferación celular.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método para tratar el cáncer, la psoriasis, la reestenosis u otra enfermedad de proliferación celular, en donde el compuesto es para la coadministración con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico.

25 En determinadas modalidades, el agente quimioterapéutico es docetaxel, paclitaxel, mesilato de imatinib, gemcitabina, cis-platino, carboplatino, 5-fluorouracilo, pemetrexed, metotrexato, doxorrubicina, lenalidomida, dexametasona o monometil auristatina.

En determinadas otras modalidades, el agente quimioterapéutico es docetaxel, gemcitabina, carboplatino o doxorrubicina.

30 Aún en otras modalidades, el agente quimioterapéutico es MG-132, PSI, felutamida B, bortezomib, CEP-18770, MLN-2238, MLN-9708, epoxomicina, carfilzomib (PR-171), NC-005, YU-101, LU-005, YU-102, NC-001, LU-001, NC-022, PR-957 (LMP7), CPSI (β 5), LMP2-sp-ek, BODIPY-NC-001, azido-NC-002, ONX -0912, omuralida, PS-519, marizomib, belactosina A, 125 I-NIP-L₃VS, NC-005-VS o MV151.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método para tratar el cáncer.

En determinadas modalidades, el cáncer es un tumor sólido.

40 En determinadas otras modalidades, el método comprende además administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico.

Aún en otras modalidades, el cáncer es un tumor sólido.

45 Todavía en otras modalidades, el agente quimioterapéutico es docetaxel, paclitaxel, mesilato de imatinib, gemcitabina, cis-platino, carboplatino, 5-fluorouracilo, pemetrexed, metotrexato, doxorrubicina, lenalidomida, dexametasona o monometil auristatina.

En otra modalidad, el agente quimioterapéutico es docetaxel, gemcitabina, carboplatino o doxorrubicina.

50 En determinadas modalidades, el agente quimioterapéutico es MG-132, PSI, felutamida B, bortezomib, CEP-18770, MLN-2238, MLN-9708, epoxomicina, carfilzomib (PR-171), NC-005, YU-101, LU-005, YU-102, NC-001, LU-001, NC-022, PR-957 (LMP7), CPSI (β 5), LMP2-sp-ek, BODIPY-NC-001, azido-NC-002, ONX- 0912, omuralida, PS-519, marizomib, belactosina A, 125 I-NIP-L₃VS, NC-005-VS o MV151.

También sin formar parte de la presente invención, se describe un método de:

- 55 i) reducir la tasa de pérdida de masa muscular en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- ii) reducir la actividad de NF- κ B en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción.
- 60 iii) reducir la tasa de desintegración de proteínas intracelulares dependientes del proteasoma en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción.
- iv) reducir la tasa de degradación de la proteína p53 en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;

- v) inhibir la degradación de ciclina en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- vi) inhibir la presentación de antígenos en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción;
- 5 vii) inhibir la adhesión celular dependiente de NF- κ B inducible en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción; y
- viii) inhibir la infección por HIV en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método descrito en la presente descripción, en donde dicho mamífero es un primate, equino, canino, felino o bovino.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método descrito en la presente descripción, en donde dicho mamífero es un ser humano.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método descrito en la presente descripción, en donde el compuesto se administra al mamífero por inhalación, por vía oral, intravenosa, sublingual, ocular, transdérmica, rectal, vaginal, tópica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea, bucal o intranasal.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método descrito en la presente descripción, en donde el compuesto se administra al mamífero por vía intravenosa.

25 También sin formar parte de la presente invención, se describe un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método para reducir la inmunosupresión local y/o la actividad de soporte tumoral mediada por células estromales FAP+, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un profármaco de un agente activo, en donde el agente activo es citotóxico o inhibe la expresión o secreción de proteínas a dichas células estromales FAP+, y es al menos 2 veces más citotóxico para las células estromales FAP+ que el profármaco; y el profármaco (i) incluye una secuencia de sustrato FAP; (ii) se convierte en el agente activo mediante la escisión de la secuencia de sustrato FAP por la FAP, cuya secuencia de sustrato tiene una k_{cat}/K_m para la escisión por FAP al menos 10 veces mayor que para la escisión por la prolil endopeptidasa EC 3.4.14.5 (PREP); y (iii) se convierte selectivamente *in vivo* en el agente activo por las células estromales FAP+.

35 También sin formar parte de la presente invención, se describe un compuesto descrito en la presente descripción para su uso en un método descrito en la presente descripción, en donde la secuencia de sustrato de FAP tiene una k_{cat}/K_m para la escisión por FAP al menos 10 veces mayor que para la escisión por otras prolil endopeptidasas S9.

Definiciones

40 El término "aminoácido" pretende abarcar todos los compuestos, ya sean naturales o sintéticos, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida, lo que incluye los análogos y derivados de los aminoácidos. En determinadas modalidades, los aminoácidos contemplados en la presente invención son los aminoácidos de origen natural que se encuentran en las proteínas, o los productos anabólicos o catabólicos naturales de dichos aminoácidos, 45 que contienen grupos amino y carboxilo. Los aminoácidos de origen natural se identifican en todo momento con las abreviaturas convencionales de tres letras y/o de una letra, correspondientes al nombre trivial del aminoácido, de acuerdo con la siguiente lista. Todos los aminoácidos descritos en la presente descripción se contemplan como isómeros (D)- y (L)- a menos que se indique de cualquier otra manera. Las abreviaturas están aceptadas en la técnica de los péptidos y son recomendadas por la comisión IUPAC-IUB en la nomenclatura bioquímica.

50 Por el término "residuo de aminoácido" se entiende un aminoácido. En general, las abreviaturas usadas en la presente descripción para designar los aminoácidos de origen natural se basan en las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Véase Biochemistry (1972) 11:1726-1732). Por ejemplo, Met, Ile, Leu, Ala y Gly representan "residuos" de metionina, isoleucina, leucina, alanina y glicina, respectivamente. Por residuo se entiende un radical derivado del α -aminoácido correspondiente mediante la eliminación de la porción OH del grupo carboxilo y la porción H del grupo α -amino.

60 El término "cadena lateral de aminoácido" es la parte de un residuo de aminoácido que no es la cadena principal, como se define en K. D. Kopple, "Peptides and Amino Acids", W. A. Benjamin Inc, Nueva York y Amsterdam, 1966, páginas 2 y 33; ejemplos de dichas cadenas laterales de los aminoácidos comunes son -CH₂CH₂SCH₃ (la cadena lateral de la metionina) -CH₂(CH₃)-CH₂CH₃ (la cadena lateral de la isoleucina), -CH₂CH(CH₃)₂ (la cadena lateral de la leucina) o H- (la cadena lateral de la glicina). Estas cadenas laterales son colgantes del carbono Ca de la cadena principal.

65 El término "análogo de aminoácido" se refiere a un compuesto estructuralmente similar a un aminoácido de origen natural en donde el grupo carboxilo C-terminal, el grupo amino N-terminal o el grupo funcional de la cadena lateral se

modifican químicamente. Por ejemplo, el ácido aspártico-(éster beta-metilo) es un aminoácido análogo del ácido aspártico; la N-etilglicina es un aminoácido análogo de la glicina; o la alanina carboxamida es un aminoácido análogo de la alanina.

- 5 La frase "grupo protector" como se usa en la presente, significa sustituyentes que protegen al grupo funcional reactivo de reacciones químicas no deseadas. Ejemplos de dichos grupos protectores incluyen a ésteres de ácidos carboxílicos y ácidos borónicos, éteres de alcoholes y acetales y cetales de aldehídos y cetonas. Por ejemplo, la frase "grupo protector N-terminal" o "grupo amino-protector", como se usa en la presente, se refiere a varios grupos amino-protectores que pueden emplearse para proteger el N-terminal de un aminoácido o péptido contra reacciones indeseables durante los procedimientos de síntesis. Ejemplos de grupos adecuados incluyen grupos protectores de acilo tales como, para ilustrar, formilo, dansilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, succinilo y metoxisuccinilo; grupos protectores de uretano aromático como, por ejemplo, benciloxicarbonilo (Cbz); y grupos protectores de uretano alifático tales como t-butoxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).
- 10 15 El término "grupo protector amino-terminal", como se usa en la presente, se refiere a los grupos protectores amino-terminales que se emplean típicamente en la síntesis orgánica, especialmente en la síntesis de péptidos. Puede emplearse cualquiera de las categorías conocidas de grupos protectores, que incluyen grupos protectores de acilo, tales como acetilo y benzoilo; grupos protectores de uretano aromático, tales como benciloxicarbonilo; y grupos protectores de uretano alifático, tales como terc-butoxicarbonilo. Véase, por ejemplo, Gross y Mienhoffer, Eds., *The Peptides*, Academic Press: Nueva York, 1981; vol. 3, 3-88; y Green, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2a ed., Wiley: Nueva York, 1991. Los grupos protectores preferidos incluyen las fracciones de arilo-, aralquilo-, heteroarilo- y heteroarilquil-carbonilo y sulfonilo.
- 20 25 Como se usa en la presente, el término "condiciones fisiológicas" se refiere a la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la viscosidad y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable, y/o que existen típicamente de forma intracelular en una célula de mamífero viable.
- 30 35 El término "profármaco", como se usa en la presente, abarca los compuestos que, bajo condiciones fisiológicas, se convierten en agentes activos terapéuticamente. Un método común para fabricar un profármaco es incluir fracciones seleccionadas que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para revelar la molécula deseada. En otras modalidades, el profármaco se convierte por una actividad enzimática del animal huésped.
- 40 45 La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un solvente o un material de encapsulamiento, implicado en el transporte de la sustancia química en cuestión desde un órgano o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, no perjudicial para el paciente y sustancialmente no pirogénico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas que se emplean en las formulaciones farmacéuticas. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la presente invención no son pirogénicas, es decir, no inducen elevaciones significativas de la temperatura cuando se administran a un paciente.
- 50 55 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos relativamente no tóxicas del (de los) inhibidor(es). Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento y la purificación final del (de los) inhibidor(es), o al hacer reaccionar por separado un(os) inhibidor(es) purificado(s) en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y por tanto aislar la sal formada. Las sales representativas incluyen hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y sales de laurilsulfonato, y similares. Véase, por ejemplo, Berge y otros (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19.
- 60 65 En otros casos, los compuestos útiles en los métodos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas de un(os) inhibidor(es). Igualmente, estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento y la purificación final del (de los) inhibidor(es), o al hacer reaccionar por separado el(los) inhibidor(es) purificado(s) en su forma ácida libre con una base adecuada, tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco o con una amina orgánica

primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge y otros, *arriba*).

- 5 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto con respecto a su uso en el tratamiento, se refiere a una cantidad del compuesto en una preparación que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación deseado (a un mamífero, preferentemente un ser humano) alivia un síntoma, mejora una afección o retrasa la aparición de las condiciones de la enfermedad de acuerdo con las normas clínicamente aceptables para el trastorno o la afección que va a tratarse o el propósito cosmético, por ejemplo, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

10 El término tratamiento "profiláctico o terapéutico" se reconoce en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones de interés. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, una enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), entonces el tratamiento es profiláctico, (es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada), mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico, (es decir, está destinado a disminuir, mejorar o estabilizar la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

- 15 20 El término "enlazador autoeliminador" o "enlazador autoinmolador" se refiere a un extensor temporal, espaciador, o unidad de reserva que une dos o más moléculas mediante enlaces químicos que se escinden en condiciones definidas para liberar las dos moléculas. Los ejemplos de enlazadores autoeliminadores incluyen, pero no se limitan a, *p*-aminobenziloxicarbonilo (PABC) y 2,4-bis(hidroximetil)anilina. El enlazador autoeliminador o el enlazador autoinmolador puede ser lineal o ramificado, y puede enlazar dos o más moléculas iguales, o puede enlazar dos o más moléculas diferentes. El enlazador autoeliminador o el enlazador autoinmolador puede degradarse, descomponerse o fragmentarse bajo, por ejemplo, condiciones fisiológicas, condiciones ácidas, condiciones básicas o en presencia de agentes químicos específicos.

25 30 Como se indicó anteriormente, determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas geométricas o estereoisoméricas particulares. La presente invención contempla todos estos compuestos, que incluyen los isómeros cis- y trans-, los enantiómeros *R*- y *S*-, los diastereómeros, los isómeros (D)-, los isómeros (L)-, las mezclas racémicas de los mismos, y otras mezclas de los mismos, como pertenecientes dentro del alcance de la invención. Los átomos de carbono asimétricos adicionales pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Todos estos isómeros, así como también las mezclas de los mismos, pretenden incluirse en esta invención.

35 40 Si, por ejemplo, se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente invención, puede prepararse por síntesis asimétrica o por derivación con un auxiliar quiral, donde la mezcla diastereomérica resultante se separa y el grupo auxiliar se escinde para proporcionar el enantiómero puro deseado. Alternativamente, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico, tal como el amino, o un grupo funcional ácido, tal como el carboxilo, las sales diastereoméricas se forman con un ácido o una base ópticamente activos apropiados, seguidos de la resolución de los diastereómeros por tanto formados mediante cristalización fraccionada o medios cromatográficos bien conocidos en la técnica, y la subsiguiente recuperación del enantiómero puro.

45 50 Una cadena alifática comprende las clases de alquilo, alquenilo y alquinilo definidas más abajo. Una cadena alifática lineal está limitada a fracciones de cadena de carbono no ramificadas. Como se usa en la presente, el término "grupo alifático" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclico e incluye grupos alifáticos saturados e insaturados, tales como un grupo alquilo, un grupo alquenilo o un grupo alquinilo.

55 60 "Alquilo" se refiere a una fracción de cadena de carbono completamente saturada, cíclica o acíclica, ramificada o no ramificada, con el número de átomos de carbono especificado, o hasta 30 átomos de carbono si no se especifica. Por ejemplo, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono se refiere a fracciones tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo, y aquellas fracciones que son isómeros posicionales de estas fracciones. Alquilo de 10 a 30 átomos de carbono incluye decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, heneicosilo, docosilo, tricosilo y tetracosilo. En determinadas modalidades, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su cadena principal (por ejemplo, C₁-C₃₀ para las cadenas lineales, C₃-C₃₀ para las cadenas ramificadas), y con mayor preferencia 20 o menos.

"Cicloalquilo" significa anillos carbocíclicos saturados mono o bicíclicos o puenteados, cada uno de los cuales tiene de 3 a 12 átomos de carbono. Igualmente, los cicloalquilos preferidos tienen de 5-12 átomos de carbono en su estructura de anillo, y con mayor preferencia tienen de 6-10 carbonos en la estructura de anillo.

65 A menos que el número de carbonos se especifique de cualquier otra manera, "alquilo inferior", como se usa en la presente, significa un grupo alquilo, como se definió anteriormente, pero que tiene de uno a diez carbonos, con mayor preferencia de uno a seis átomos de carbono en su estructura de cadena principal, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. Igualmente, "alquenilo inferior" y "alquinilo inferior" tienen

longitudes de cadena similares. En toda la solicitud, los grupos alquilos preferidos son alquilos inferiores. En determinadas modalidades, un sustituyente designado en la presente descripción como alquilo es un alquilo inferior.

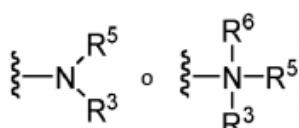
"Alquenilo" se refiere a cualquier fracción de cadena de carbono insaturada, cíclica o acíclica, ramificada o no ramificada, que tenga el número de átomos de carbono especificado, o hasta 26 átomos de carbono si no se especifica ninguna limitación en el número de átomos de carbono; y que tenga uno o más dobles enlaces en la fracción. Los alquenilos de 6 a 26 átomos de carbono se ejemplifican con hexenilo, heptenilo, octenilo, nonenilo, decenilo, undecenilo, dodenilo, tridecenilo, tetradecenilo, pentadecenilo, hexadecenilo, heptadecenilo, octadecenilo, nonadecenilo, eicosenilo, heneicosenilo, docosenilo, tricosenilo y tetracosenilo, en sus diversas formas isoméricas, donde el (los) enlace(s) insaturado(s) puede(n) localizarse en cualquier parte de la fracción y puede(n) tener la configuración (Z) o (E) aproximadamente en el (los) doble(s) enlace(s).

"Alquinilo" se refiere a fracciones hidrocarbilo del alcance de alquenilo, pero que tienen uno o más enlaces triples en la fracción.

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, como se definió anteriormente, que tiene una fracción de azufre unida a él. En determinadas modalidades, la fracción "alquiltio" se representa por una de las siguientes: -(S)-alquilo, -(S)-alquenilo, -(S)-alquinilo, y -(S)-(CH₂)_m-R¹, en donde m y R¹ se definen más abajo. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

Los términos "alcoxilo" o "alcoxi", como se usan en la presente, se refieren a un grupo alquilo, como se define más abajo, que tiene una fracción de oxígeno unida a él. Los grupos alcoxilos representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, terc-butoxi y similares. Un "éter" es dos hidrocarburos covalentemente enlazados por un oxígeno. En consecuencia, el sustituyente de un alquilo que hace que ese alquilo sea un éter es o se asemeja a un alcoxilo, tal como puede representarse por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R¹, donde m y R¹ se describen más abajo.

Los términos "amina" y "amino" son reconocidos en la técnica y se refieren tanto a las aminas no sustituidas como a las sustituidas, por ejemplo, una fracción que puede representarse por la fórmula:



en donde R³, R⁵ y R⁶ representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, -(CH₂)_m-R¹, o R³ y R⁵ tomados junto con el átomo de N al que están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R¹ representa un alquenilo, un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclico o un policíclico; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En determinadas modalidades, sólo uno de R³ o R⁵ puede ser un carbonilo, por ejemplo, R³, R⁵, y el nitrógeno juntos no forman una imida. Aún más, en determinadas modalidades, R³ y R⁵ (y opcionalmente R⁶) representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, o -(CH₂)_m-R¹. Por tanto, el término "alquilamina", como se usa en la presente, significa un grupo amina, como se definió anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido a él, es decir, al menos uno de R³ y R⁵ es un grupo alquilo. En determinadas modalidades, un grupo amino o una alquilamina es básica, lo que significa que tiene un ácido conjugado con un pK_a ≥ 7,00, es decir, las formas protonadas de estos grupos funcionales tienen pK_a con relación al agua más arriba de aproximadamente 7,00.

El término "arilo", como se usa en la presente, incluye grupos aromáticos de 3 a 12 miembros sustituidos o no sustituidos de un solo anillo en los que cada átomo del anillo es carbono (es decir, arilo carbocíclico) o en los que uno o más átomos son heteroátomos (es decir, heteroarilo). Preferentemente, los grupos arilo incluyen anillos de 5 a 12 miembros, con mayor preferencia anillos de 6 a 10 miembros. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos. Los grupos arílicos carbocíclicos incluyen el benceno, la naftalina, el fenantreno, el fenol, la anilina y similares. Los grupos heteroarilo incluyen estructuras de anillo aromáticas sustituidas o no sustituidas de 3 a 12 miembros, con mayor preferencia anillos de 5 a 12 miembros, con mayor preferencia anillos de 6 a 10 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares.

Los términos "heterociclico" o "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras de anillos de 3 a 12 miembros, con mayor preferencia anillos de 5 a 12 miembros, con mayor preferencia anillos de 6 a 10 miembros, cuyas estructuras de anillos incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policíclicos. Los grupos heterociclico incluyen, por ejemplo, tiofeno, tianreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina,

quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazán, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidinonas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas, y similares. El anillo heterocíclico puede sustituirse en una o más posiciones con dichos sustituyentes como se describió anteriormente, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, sulfamoilo, sulfinilo, éter, alquilito, sulfonilo, cetona, aldehido, éster, un heterociclico, una fracción aromática o heteroaromática, $-CF_3$, $-CN$, y similares.

- 10 El término "carbonilo" se reconoce en la técnica e incluye las fracciones que pueden representarse por la fórmula:



en donde X es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R^7 representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(CH_2)_m-R^1$ o una sal farmacéuticamente aceptable, R^8 representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R^1$, donde m y R^1 son como se definió anteriormente. Cuando X es un oxígeno y R^7 o R^8 no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". Cuando X es un oxígeno, y R^7 es como se definió anteriormente, la fracción se denomina en la presente descripción como un grupo carboxilo, y particularmente cuando R^7 es un hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico". Cuando X es un oxígeno y R^8 es un hidrógeno, la fórmula representa un "formiato". En general, cuando el átomo de oxígeno de la fórmula anterior se sustituye por un azufre, la fórmula representa un grupo "tiocarbonilo". Cuando X es un azufre y R^7 o R^8 no es hidrógeno, la fórmula representa un grupo "tioéster". Cuando X es un azufre y R^7 es un hidrógeno, la fórmula representa un grupo "ácido tiocarboxílico". Cuando X es un azufre y R^8 es un hidrógeno, la fórmula representa un grupo "tioformiato". Por otro lado, cuando X es un enlace y R^7 no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "cetona". Cuando X es un enlace y R^7 es un hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "aldehído".

- 30 El término "tioxamida", como se usa en la presente, se refiere a una fracción que puede representarse por la fórmula:



en el que R^t se selecciona del grupo que consiste en el grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, aralquilo o arilo, preferentemente hidrógeno o alquilo. Además, los compuestos "derivados de tioxamida" o "análogos de tioxamida" se refieren a compuestos en los que uno o más grupos amida son reemplazados por uno o más grupos tioxamida correspondientes. Las tioxamidas también se denominan en la técnica "tioamidas".

Como se usa en la presente, el término "sustituido" se contempla para incluir todos los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permitidos incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos anteriormente en la presente descripción. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferente para los compuestos orgánicos apropiados. Para los propósitos de esta invención, los heteroátomos tales como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquiera de los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos que se describen en la presente descripción que satisfacen las valencias de los heteroátomos. Esta invención no pretende limitarse de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos. Se debe entender que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución esté de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente, y que la sustitución resulte en un compuesto estable, por ejemplo, que no sufra espontáneamente una transformación tal como por reordenamiento, ciclación o eliminación.

55 Como se usa en la presente, el término "nitro" significa $-NO_2$; el término "halógeno" designa $-F$, $-Cl$, $-Br$ o $-I$; el término "sulfhidrilo" significa $-SH$; el término "hidroxilo" significa $-OH$; el término "sulfonilo" significa $-SO_2-$; el término "azido" significa $-N_3$; el término "ciano" significa $-CN$; el término "isocianato" significa $-NCO$; el término "tiocianato" significa $-SCN$; el término "isotiocianato" significa $-NCS$; y el término "cianato" significa $-OCN$.

- 60 El término "sulfamoilo" se reconoce en la técnica e incluye una fracción que puede representarse por la fórmula:



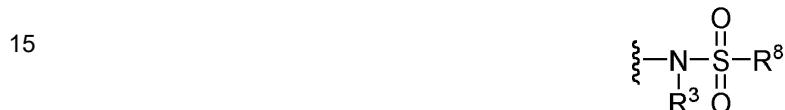
en la que R³ y R⁵ son como se definió anteriormente.

El término "sulfato" se reconoce en la técnica e incluye una fracción que puede representarse por la fórmula:



10 en la que R⁷ es como se definió anteriormente.

El término "sulfonamida" se reconoce en la técnica e incluye una fracción que puede representarse por la fórmula:



20 en la que R³ y R⁸ son como se definió anteriormente.

El término "sulfonato" se reconoce en la técnica e incluye una fracción que puede representarse por la fórmula:



en el que R⁷ es un par de electrones, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo.

30 Los términos "sulfóxido" o "sulfinilo", tal como se usan en la presente, se refieren a una fracción que puede representarse por la fórmula:



en el que R¹² se selecciona del grupo que consiste en el grupo que consiste de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclico, aralquilo o arilo.

40 Como se usa en la presente, la definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n, etc., cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en otra parte en la misma estructura.

Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67^a ed., 1986-87, en el interior de la cubierta.

45 Ejemplos

La invención que ahora se describe generalmente, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen de manera sencilla para propósitos de ilustración de determinados aspectos y las modalidades de la presente invención, y no están destinados a limitar la invención.

50 Ejemplo 1. ARI-3996 e Inhibidores del Proteasoma de la Invención

ARI-3996 y su ojiva PI ARI-2727D se sintetizaron como se muestra en la Figura 1, mediante el uso de métodos sintéticos y analíticos previamente descritos para la obtención de ácidos borónicos peptídicos. Bortezomib se adquirió de Selleck Chemicals o ChemieTek. Cada lote de ARI-3996 se validó para la escisión selectiva por FAP frente a PREP como se describe en la presente descripción.

60 Se usaron los siguientes reactivos: (a) HATU/DMF/DIPEA, 95 % de rendimiento; (b) HCl 4 M en dioxano, 100 % de rendimiento; (c) HATU/DMF/DIPEA, 90 % de rendimiento; (d) HCl 4 M en dioxano, 100 % de rendimiento; (e) tBu-Suc-Ser(tBu)-OH, HATU/DMF/DIPEA, 90 % de rendimiento; (f) Pd(OH)₂-C/H₂/metanol, 90 % de rendimiento; (g) 2727D, HATU/DMF/DIPEA, 85 % de rendimiento; (h) TFA/DCM, 90 % de rendimiento; (i) PhB(OH)₂, pentano-agua-acetonitrilo, 70 % de rendimiento. La síntesis química de péptidos, en particular de péptidos cortos tales como di- y tripéptidos tales como los descritos en la presente, es bien conocida en la técnica y suficientemente predecible debido a su naturaleza modular. Por lo tanto, los métodos de síntesis de la Tabla 1 o los métodos de síntesis en fase sólida estandar que se aplican a los péptidos tendrían éxito en el suministro de cualquier compuesto de la fórmula I.

ARI-3996 es una versión pro-fármaco de un agente citotóxico similar al bortezomib, diseñado para dirigirse más selectivamente al proteasoma en tumores sólidos (Figura 15). ARI-3996 se diseñó para reducir los DLT basados en los mecanismos asociados a la inhibición del proteasoma al mantenerse inactivo hasta que se escinde por la proteína de activación de los fibroblastos (FAP) en la superficie de los fibroblastos estromales reactivos de los tumores epiteliales. Debido a que FAP se produce en los tumores epiteliales, pero no suele hacerlo en los tejidos sanos (FAP se expresa en el estroma de muchos tumores epiteliales comunes: cáncer de pulmón, de colon, de mama y de páncreas), ARI-3996 no debería activarse en el tejido nervioso o en la médula ósea, donde se generan las plaquetas. ARI-3996 es relativamente no tóxico para todas las células y no puede destruir las células tumorales hasta que sea activado por FAP. Por lo tanto, ARI-3996 debería destruir los tumores que producen FAP con PN y trombocitopenia menos graves que las asociadas con bortezomib.

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) es una serina proteasa de escisión posprolil que pertenece a la subfamilia (dipeptidil peptidasa) similar a la DPP-IV, en la que la FAP y la prolil endopeptidasa (PREP) son las únicas proteasas de mamíferos que pueden escindir en el lado C-terminal de la prolina interna. A diferencia de FAP, PREP se expresa de manera constitutiva y ubicua. Resolvimos el problema de especificidad de la escisión de FAP frente a PREP necesaria para fabricar un profármaco activado selectivamente por FAP. La especificidad de escisión de FAP en P₄-P₁ requiere prolina en P₁, glicina o aminoácidos D en P₂, prefiere aminoácidos pequeños sin carga en P₃, y tolera la mayoría de los aminoácidos en P₄. Descubrimos que D-alanina en P₂ permite la escisión por FAP como se esperaba pero evita la escisión por PREP. Por tanto, el enlace del tripeptido Suc-Ser-D-Ala-Pro mediante un enlace peptídico C-terminal al dipéptido aminoboronato similar al bortezomib Ala(1-Nal)-boroLeu (ARI-2727D) produce el profármaco ARI-3996 en el que la actividad inhibidora del proteasoma se desencadena selectivamente mediante la escisión FAP del enlace Pro-Ala(1-Nal). *In vitro*, ARI-3996 se escinde por FAP, pero en mucha menor medida por PREP, para producir la "ojiva" citotóxica ARI-2727D como se demuestra mediante la espectrometría de masas (Figura 2) y por el ensayo de destrucción de células tumorales *in vitro* mediante fluorescencia celular: título azul (Promega) (Tabla 1).

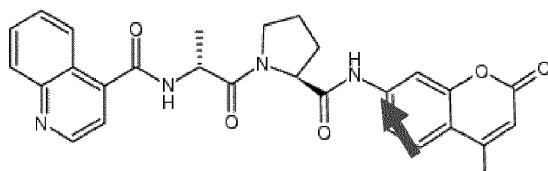
Tabla 1. FAP activa específicamente a ARI-3996 para destruir las células tumorales *in vitro*

Línea celular	Citotoxicidad EC ₅₀ ^a (μM) de ARI-3996 incubada con ^b :		
	Ninguno	FAP	PREP
RPMI 8226	5,8	0,18	3,1
KG-1	22,0	0,30	13,0
RPMI 1788	6,2	0,13	3,6
BxPC-3	34,0	0,80	21,0

^aConcentración del fármaco que destruye al 50 % de las células

^b24 horas a 37 °C, excepto BxPC-3, 48 horas

Ejemplo Comparativo 2. Uso de ARI-3144 como herramienta de diagnóstico/estratificación de pacientes



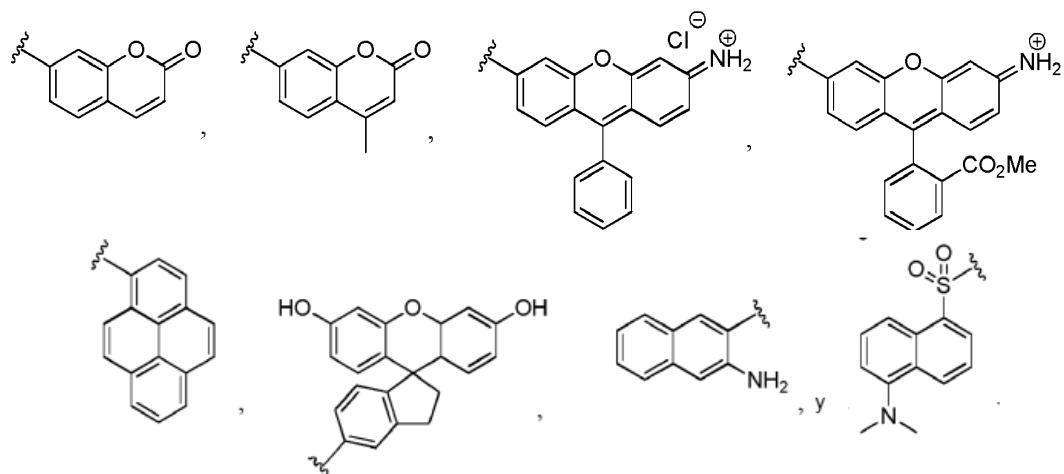
ARI-3144

La estructura de ARI-3144 se muestra anteriormente e incluye una flecha que indica el enlace químico que se escinde por FAP. La Figura 11 muestra una imagen del concepto subyacente al uso diagnóstico de este compuesto. El sitio de reconocimiento de FAP se une químicamente a la fracción de cumarina fluorogénica (AMC). Después de la unión de ARI-3144 a FAP, tiene lugar la escisión del enlace químico (Figura 12) para liberar el sitio de reconocimiento de FAP del AMC. Una vez liberado, AMC ahora es fluorescente y su concentración puede cuantificarse al medir sus propiedades espectroscópicas.

La D-alanina en P₂ del sustrato fluorogénico, N-(quinolina-4-carbonilo)-D-Ala-Pro-AMC [AMC = 7-amino-4-metilcumarina] (ARI-3144), confiere selectividad por FAP de modo que se escinde para liberar AMC fluorescente por

FAP recombinante pero no por otras proteasas similares a DPP-IV (Figura 3). Como se muestra en la Figura 13, ARI-3144 es un sustrato excelente para FAP y no se detectó escisión por PREP, DPPIV, DPP8, DPP9 o DPPII (Figura 14). Según se informa, FAP no se expresa de manera constitutiva en tejido sano con la excepción del endometrio, aunque la actividad proteolítica de FAP es detectable en plasma. Con excepción de los tumores de ovario y próstata, se demostró la inducción de la expresión de FAP en fibroblastos del estroma de tumores epiteliales comunes (pulmón, colon, mama y páncreas) mediante inmunohistoquímica y análisis de ARNm. Se requiere la capacidad de medir la actividad proteolítica de FAP en tumores para evaluar la utilidad de ARI-3996 como agente quimioterapéutico. Hasta ahora, la actividad de FAP no se cuantifica en tumores humanos o de ratón. Usamos el ensayo ARI-3144 ex vivo para demostrar un aumento de la actividad proteolítica de FAP en el carcinoma pancreático humano con relación a los tejidos y el plasma sanos. Usaremos el ensayo para seleccionar un modelo de tumor de ratón para la investigación de la actividad de los ARI-3996 en el que el aumento de la actividad de FAP asociada al tumor con relación al plasma es equivalente al del cáncer epitelial humano.

Además de los cromóforos basados en cumarina, otros cromóforos ampliamente usados funcionarían igual de bien siempre que pudiera usarse un enlace amida para la unión (es decir, el cromóforo tiene un grupo amino primario disponible para unirse a la prolina del sitio de reconocimiento de FAP). Dichos cromóforos usados comúnmente son, por ejemplo:



Ejemplo 3. Modelo de ratón de cáncer epitelial en el que la actividad proteolítica de FAP del tejido tumoral es equivalente a la de los pacientes humanos con cáncer.

Se usó el sustrato fluorogénico específico de la FAP, ARI-3144, para medir la actividad proteolítica de FAP en homogenados de tejido y plasma en un ensayo fluorométrico continuo estándar, como se describió previamente.

En muestras de tejido de 14 pacientes con cáncer de páncreas en el Fox Chase Cancer Center, determinamos la actividad FAP media (\pm SE) en tejido canceroso de $903,7 \pm 161,4$ expresada como cambio en unidades fluorescentes (ΔFU)/min/mg de proteína. La actividad de FAP varió entre pacientes con 4 expresiones altas que estaban en el intervalo de 1200 a 3000. Por el contrario, los xenoinjertos de adenocarcinoma pancreático HPAF-II en *ratones scid* exhibió una actividad media de sólo $200 \pm 12,5$. En los ratones, encontramos que los niveles circulantes de la actividad FAP en plasma son aproximadamente 6- veces más altos que en los seres humanos, independientemente de que cualquiera de las dos especies tenga un tumor. Por tanto, la relación tumor: plasma de la actividad de FAP es al menos 100:1 en seres humanos; pero sólo 3:1 en los ratones xenoinjertados con HPAFII (Figuras 4 y 16).

Se espera que el TI de un profármaco activado por FAP, tal como el ARI-3996, dependa de la diferencia entre el nivel sistémico de la actividad proteolítica de FAP y el nivel en el tejido tumoral. ARI-3996 exhibe una actividad antitumoral significativa en ratones HPAF-II (véase más abajo). Sin embargo, el modelo HPAF-II no refleja con exactitud la relación tumor:sistema de la actividad FAP en pacientes con carcinoma pancreático humano (Figuras 16 y 17). Para probar la viabilidad de ARI-3996 como un PI más seguro y efectivo que el bortezomib en el cáncer sólido, se necesita un modelo de carcinoma en el que la actividad de FAP del tumor sea ~35 veces más alta que en los xenoinjertos HPAF-II. Debido a que FAP se induce en los fibroblastos reactivos del estroma durante la tumorigénesis, el nivel de actividad de FAP del tumor debería ser más alto en los modelos de ratón que recapitulan el patrón de desarrollo del estroma en el cáncer humano que en los xenoinjertos de líneas celulares. Dos modelos diferentes parecen prometedores. En el modelo de adenocarcinoma de pulmón inducible por Cre-recombinasa en ratones *Lox-Stop-Lox (LSL)-K-ras G12D*, el desarrollo tumoral endógeno induce un estroma FAP⁺ que se asemeja mucho al del carcinoma humano histológicamente. Un modelo alternativo lo proporcionan los tumores de pacientes trasplantados directamente a ratones inmunodeficientes. Se informó que los tumores humanos trasplantados mantienen la organización estromal y la vasculatura del tumor de

origen. La actividad de FAP se analizará en muestras de trasplantes de xenoinjertos de carcinomas epiteliales humanos con estroma bien desarrollado proporcionadas por Oncotest <http://www.oncotest.de/for-pharma/index.php>.

Como se muestra en la Figura 5, el modelo de xenoinjerto HEK293 transfectado con FAP puede usarse para modelar tumores humanos que sobreexpresan FAP en un grado similar al de los tumores encontrados en pacientes de cáncer humano. Una variante de la línea celular HEK293 transfectada con FAP forma tumores de células epiteliales FAP⁺ en ratones *scid* (69). Demostramos niveles de actividad FAP de 6000 a 12 500 ΔFU/min/mg en tumores FAP-HEK293 *in vivo* (Figura 5). El modelo FAP-HEK293 es, por lo tanto, adecuado para la investigación de TI de los ARI-3996. Sin embargo, a diferencia de los modelos de tumor pulmonar conducido por *K-ras*^{G12D}- y de trasplante directo a pacientes, el modelo HEK293 no imita la expresión estromal de FAP en el carcinoma humano.

Además, como se muestra en la Figura 18, los xenoinjertos tumorales HEK transfectados tienen una actividad FAP que coincide con la de los tumores de cáncer de páncreas humanos. Una batería de muestras de tumores de páncreas humanos presentaba niveles de actividad FAP que iban de insignificantes a más de 250 (FAP tumoral/FAP plasmática). El lado derecho de la Figura 18 muestra que las muestras de xenoinjerto de ratón HEK muestran relaciones de FAP tumoral/FAP plasmático de 150-270.

Ejemplo 4. Validación del modelo de ratón de xenoinjerto tumoral HEK

Una vez determinados los niveles de expresión de FAP en el modelo de xenoinjerto HEK, se evaluó a continuación la actividad anticancerosa de ARI-3996 en un estudio de 40 días. La Figura 20 muestra los resultados. De manera impresionante, mientras que Velcade® apenas frenó el crecimiento de los tumores, tanto ARI-2727D como ARI-3996 mostraron una potente inhibición tumoral. Se espera que ARI-2727D sea menos potente que ARI-3996 porque carece del sitio de reconocimiento de FAP, o fracción de dirección. También sufre una inactivación dependiente de la conformación con el tiempo. No obstante, ARI-2727 mostró un efecto inhibidor notablemente mayor que Velcade®. A una dosis de 25 mg/kg, ARI-3996 mostró una inhibición casi completa del crecimiento tumoral. Incluso en un modelo de simulación en HEK (Figura 20, parte inferior), a una dosis de 50 mg/kg, ARI-3996 se toleró bien y mostró un efecto inhibidor sobre el control.

Como prueba adicional de su eficacia, se administró ARI-3996 a ratones WT BALB/c inmunocompetentes. Como muestra la Figura 19, se observó la regresión del tumor en el transcurso de un experimento de 30 días.

Ejemplo 5. Dosis máximas toleradas (MTD) y dosis mínimas efectivas (MED) de ARI-3996, ARI-2727D, y bortezomib en el modelo de cáncer FAP⁺.

ARI-3996 se administró (i.p.) a ratones xenoinjertados con la línea celular HPAF-II redujo significativamente el crecimiento tumoral a su MTD de 100 mg/kg (Figura 6). El efecto antitumoral de ARI-3996 se confirmó tanto como agente único como en combinación con gemcitabina (Figuras 9 y 10). En particular, se observó un efecto antitumoral altamente significativo cuando se administró ARI-3996 por vía s.c. en lugar de i.p. (Figura 9). Por el contrario, los tumores HPAF-II fueron refractarios a bortezomib en su MTD de 1 mg/kg (Figura 6). ARI-3996, por lo tanto, parece ser 100 veces más seguro que bortezomib basado en la MTD y supera a bortezomib en un modelo de cáncer epitelial. Sin embargo, el efecto antitumoral de ARI-3996 probablemente estuvo limitado por el nivel relativamente bajo de actividad de FAP, que se requiere para activar el profármaco, en los tumores HPAF-II. Como se describió anteriormente, la relación tumor: plasma FAP es ≥100:1 para el cáncer de páncreas humano frente a 3:1 en ratones xenoinjertados con HPAF-II (Figura 4). Por lo tanto, para juzgar mejor el potencial de los ARI-3996 para producir efectos antitumorales en pacientes con carcinoma a niveles de dosis tolerados, se compararán las MTD y MED de ARI-3996, bortezomib y ARI-2727D en el modelo de ratón seleccionado para la actividad FAP asociada al tumor equivalente a la del cáncer humano.

Las MTD se determinarán mediante la administración (ip) de dosis crecientes de los compuestos dos veces por semana (días 1 y 4) a grupos de ratones normales y portadores de tumores ($n = 2$ hembras + 2 machos). La comparación de la toxicidad en los ratones portadores de tumores frente a los no portadores determinará si la activación de ARI-3996 por la FAP del tumor contribuye a la toxicidad sistémica. La salud de los ratones se controlará diariamente y se pesarán dos veces por semana. En niveles de dosis subletales, la dosis más alta que no cause problemas de salud y no mayor del 10 % de pérdida de peso se definirá como la MTD. Las MED se determinarán a partir de las respuestas a las dosis de los efectos antitumorales en ratones portadores de tumores ($n = 5-7$ por grupo de tratamiento) a los que se administran los compuestos dos veces por semana. La MED se definirá como la dosis más pequeña que produce una reducción significativa en el crecimiento tumoral, como se determina mediante la prueba *t* de Student no pareada, de dos colas, para comparar el tamaño de los tumores entre los ratones de prueba y los de control. Los detalles experimentales dependerán del modelo elegido en el Experimento 1. El diseño del estudio será similar al descrito previamente para la demostración del efecto antitumoral del agente antitumoral dirigido a FAP, Glu-boroPro. Los TI para ARI-3996, bortezomib y la 'ojiva', ARI-2727D, se calcularán mediante la fórmula: $TI = MTD \div MED$. Si la disponibilidad de ratones *LSL-K-ras*^{G12D} u Oncotest es limitante, la toxicidad y la MTD pueden ser investigadas en ratones *scid* xenoinjertados FAP-HEK293 (Figura 5).

Ejemplo 6. Caracterización del mecanismo del efecto antitumoral de ARI-3996 mediante la investigación de la inhibición del proteasoma 20S, la inducción de la apoptosis y la reducción de la angiogénesis en tumores FAP+.

- 5 Una hora después de la administración final del fármaco a la terminación del Ejemplo 5, se recogerán la sangre periférica, el tumor, el bazo y el hígado. Se prepararán lisados de tejido a partir de muestras congeladas para el ensayo de inhibición del proteasoma. Las muestras de tejido histológico se fijarán en formol y se incrustarán en parafina en condiciones adecuadas para la inmunotinción y el ensayo de apoptosis y se seccionarán.
- 10 La actividad de la subunidad quimotriptíca del proteasoma 20S se determinará mediante el uso del sustrato fluorogénico succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo Life Science). Bortezomib y ARI-2727D se distribuirán en todos los tejidos y se espera que inhiban la actividad del proteasoma en todos los tejidos, de manera uniforme y dependiente de la dosis. El ensayo probará si ARI-3996 se dirige a la actividad del proteasoma tumoral de forma más selectiva mediante el uso de una prueba *t* de Student pareada, de dos colas, para las comparaciones entre muestras pareadas de tejido tumoral y no tumoral (por ejemplo, el bazo) en cada animal. Las secciones histológicas de los tumores que respondieron de forma óptima a los tratamientos farmacológicos se compararán con los controles en cuanto a la densidad de microvasos (MVD) mediante la inmunotinción con el anticuerpo específico para CD34 de ratón (BD-Pharmingen). La apoptosis se cuantificará mediante el marcado de extremos nítidos mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) mediante el uso del kit de detección de apoptosis *in situ* (Millipore). Los eventos se contarán microscópicamente de forma ciega, y el significado de las diferencias entre los tumores tratados con el vehículo y con el fármaco se determinará mediante una prueba *t* de Student no pareada y de dos colas para al menos 5 ratones por grupo de tratamiento. Los tejidos también se teñirán con H y E (hematoxilina y eosina) para investigar la toxicidad sistémica.
- 15 Encontramos que la actividad proteolítica de FAP en el plasma sanguíneo parece ser aproximadamente 6 veces más alta en los ratones (~60 ΔFU/min) que en los humanos (~10 ΔFU/min), independientemente del estado del tumor. Los modelos de ratón pueden exagerar la toxicidad sistémica de ARI-3996 en comparación con la posible en pacientes con cáncer. Esto se verificó además mediante el tratamiento de ratones con genes inactivados para FAP con ARI-3996. En los ratones con genes inactivados (Figura 21), no se produjo la activación de ARI-3996 para liberar ARI-2727, mientras que en los ratones FAP+ se alcanzó una concentración de la ojiva liberada ARI-2727 de 150 ng/ml.
- 20 Una mayor activación de profármacos en la sangre periférica de los ratones podría resultar en una mayor exposición sistémica a la "ojiva" ARI-2727D que en los seres humanos. Si la toxicidad en ratones evita alcanzar el objetivo de un TI 10 veces mayor para ARI-3996 frente a bortezomib, investigaremos la toxicidad en ratones genéticamente deficientes en FAP (*Fap^{LacZ/LacZ}*) (70). Demostramos que los ratones deficientes en FAP no tienen una actividad proteolítica significativa detectable con el sustrato específico de FAP ARI-3144 (Figura 1). Por lo tanto, la comparación de la MTD de ARI-3996 en ratones con FAP suficiente frente a ratones con FAP deficiente determinará cómo la actividad plasmática de FAP afecta a la toxicidad. Si encontramos que ARI-3996 tiene una actividad antitumoral preclínica altamente significativa, pero el TI se ve comprometido debido al nivel basal de la actividad plasmática del PAF en los ratones, consideraríamos que se cumple la Prueba de viabilidad.
- 25

30 Ejemplo 7. Evidencia de administración tumoral de ARI-2727D por el profármaco activado por FAP ARI-3996.

- 35 La toxicidad limitante de la dosis (DLT) evita la administración de dosis suficientemente altas de bortezomib para producir respuestas tumorales en el cáncer sólido. Los resultados preclínicos en ratones xenoinjertados por vía s.c. con el tumor de próstata humano PC-3 sugieren que la DLT se debe a la baja exposición de los tumores sólidos al bortezomib con relación a la exposición del tejido no canceroso (Figura 7). ARI-3996 es un profármaco diseñado para liberar un PI similar al bortezomib, ARI-2727D, en el sitio tumoral tras la escisión por la actividad proteolítica de la proteína de activación de fibroblastos (FAP). Debido a que FAP se expresa predominantemente en el estroma del cáncer epitelial humano, ARI-3996 debería aumentar la exposición del tumor al PI y reducir la exposición en tejidos sanos con relación al bortezomib.
- 40 En ratones SCID xenoinjertados con el adenocarcinoma pancreático humano HPAF-II, comparamos la distribución en los tejidos de ARI-3996 y ARI-2727D en el hígado, las células de sangre periférica (PBC) y el tumor después de una única inyección por vía s.c. de ARI-3996 a una dosis de 50 mg/kg. A las 1, 3 y 6 horas después de la administración, al igual que para el bortezomib (Figura 7), la exposición del hígado al ARI-3996 intacto es mayor que la del tumor (Figura 8 A, C, E), y la exposición de PBC y del tumor al profármaco es similar a las 3 horas. Sin embargo, en todos los puntos temporales, la exposición de los tumores a la "ojiva" activa, ARI-3996, superó las exposiciones del hígado o del PBC (Figura 8 B, D, F).
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En una evaluación adicional (Figuras 22 y 23) de la distribución en los tejidos de Velcade® frente a ARI-3996 en ratones mostró que Velcade® alcanzaba concentraciones mucho mayores en el corazón, el pulmón, el riñón, el hígado, el bazo y el pulmón que en el tumor, lo que sugiere que la ineficacia del fármaco contra los tumores sólidos se debe a su baja concentración en el tumor. La alta toxicidad de Velcade® también sería el resultado de la acumulación del fármaco en los órganos a expensas de la acumulación en el tumor. Por el contrario, ARI-3996 se acumula inicialmente principalmente en el hígado; la activación/escisión de FAP para formar ARI-2727D da como resultado que ARI-2727D

forme concentraciones relativas mucho más altas en el tumor con cantidades menores en los pulmones y el plasma. Por tanto, ARI-2727D se administra selectivamente en los tumores sólidos a través de la activación FAP de ARI-3996.

Finalmente, se verificó que la activación de FAP era el modo por el que se producía la acumulación tumoral de ARI-2727D. En la Figura 24, las concentraciones de ARI-2727D 1 hora después de la inyección se compararon con las concentraciones de ARI-2727D 1 hora después de la inyección de la forma de profármaco (ARI-3996). La inyección directa de ARI-2727D resultó en la acumulación de la concentración más alta del fármaco en los riñones y los pulmones; cuando se inyectó ARI-3996, la concentración más alta de ARI-2727D se encontró en el tumor, seguido de los pulmones y el plasma.

Sorprendentemente, los resultados sugieren que ARI-3996 aumenta la exposición del tumor al PI activo al mismo tiempo que evita el tejido no tumoral. Curiosamente, en el modelo tumoral HPAF-II, comprobamos que el bortezomib carece de actividad antitumoral significativa a la dosis máxima tolerada de 1 mg/kg en ratones (Figura 6), mientras que ARI-3996 es bien tolerado y produce reducciones significativas del tamaño del tumor a 50 mg/kg (Figuras 9 y 10). La respuesta del tumor HPAF-II a ARI-3996 refuerza nuestra hipótesis de que los tumores sólidos pueden responder a la inhibición del proteasoma. La relación tumor: plasma de la actividad de FAP es sólo de 3:1 en ratones HPAF-II, mientras que en pacientes con cáncer de páncreas la relación es de 100:1 o mayor. Por lo tanto, anticipamos una activación significativamente mayor de ARI-3996 y, en consecuencia, se identificarán mejoras adicionales en las respuestas tumorales en el modelo de ratón con una FAP de tumor más alta: plasma en estudios posteriores.

Ejemplo 8. Citotoxicidad de Velcade® frente a ARI-2727D y ARI-3996 en mieloma múltiple, células normales y tumores sólidos

Aunque Velcade® tiene actividad clínica robusta en pacientes con MM, la resistencia a los fármacos se desarrolla en todos los pacientes que responden inicialmente al tratamiento. Los fibroblastos del estroma de los tumores epiteliales promueven la progresión del tumor y la metástasis a través de la remodelación de la matriz extracelular y como una fuente de factores de crecimiento paracrinos tales como el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante-β. Al dirigir la inhibición del proteasoma al microambiente tumoral, ARI-3996 puede destruir tanto los fibroblastos del estroma así como también las células epiteliales malignas. Esto proporcionaría la oportunidad de atacar el tumor al destruir un tipo de célula que es menos probable que la propia célula tumoral desarrolle resistencia a los fármacos.

Las Figuras 25 y 26 demuestran una evaluación biológica adicional de ARI-2727D y ARI-3996 frente a Velcade® para la citotoxicidad hacia el mieloma múltiple (MM), células normales y varios tumores sólidos. La figura 25 muestra que tanto Velcade® como ARI-2727D tienen una potencia extremadamente alta contra varias líneas celulares de MM y una toxicidad ligeramente menor contra las células normales. Su toxicidad es mucho menor contra los tumores sólidos. En la Figura 26, ARI-3996 se compara con ARI-2727D y Velcade®. Su citotoxicidad es mucho menor en general, particularmente en tumores sólidos.

Estos resultados subrayan la importancia de la administración selectiva para resolver los retos actuales de la quimioterapia convencional contra el cáncer. Sin el suministro selectivo de agentes citotóxicos a las células cancerosas, a menudo muestran la misma toxicidad para las células normales y cancerosas por igual.

Ejemplo 9. Actividad FAP de los cánceres humanos

Un aspecto importante para determinar qué cánceres se beneficiarán del tratamiento con los compuestos de la invención. Como se mencionó anteriormente, FAP tiene una expresión muy baja en tejidos humanos normales. Se recogió un gran número de muestras de tejido de tumores y se midió su actividad FAP, no los niveles de expresión. Como muestra la Figura 27, prácticamente todas las muestras muestran un nivel de actividad FAP mucho más alto en el tumor frente al suero. Por tanto, se espera que la mayoría de los tumores sólidos susceptibles a los inhibidores del proteasoma respondan al tratamiento con profármacos activados por FAP de la invención. Como se muestra en la Figura 4, los tumores humanos tienen, en promedio, 100:1 los niveles de actividad FAP del tejido humano normal.

Ejemplo 10. Efectos anticancerígenos de los inhibidores del proteasoma en ratones portadores de tumores U266

ARI-3996 superó consistentemente a Velcade® en un modelo de ratón MM. Los ratones portadores de xenoinjertos tumorales U266 (2 hembras, 2 machos) se trataron con el vehículo, ARI-3996 o Velcade® dos veces por semana (día 1 y día 4) durante 2 semanas. Como se muestra en la Figura 28, ARI-3996 se dosificó a 50 mg/kg (la mitad de la MTD) y Velcade® a 0,5 mg/kg (también la mitad de la MTD). La inhibición del tumor se evaluó mediante el uso de ELISA (μ g/ml) y bioluminiscencia. ARI-3996 mostró una marcada ventaja sobre Velcade®. Mientras que 1 muerte tuvo lugar en el grupo Velcade®, todos los ratones del grupo ARI-3996 sobrevivieron con mejores resultados frente al grupo Velcade®.

Ejemplo 11. Conjugación del sitio de reconocimiento de FAP con inhibidores de proteasoma conocidos

Dado que los ejemplos anteriores demuestran que el sitio de reconocimiento FAP (la cadena peptídica corta que confiere especificidad FAP) cuando se une al ARI-2727D confiere una entrega selectiva de la ojiva a los tumores y las células del estroma circundante, es razonable concluir que la misma secuencia de reconocimiento FAP podría unirse a otros inhibidores del proteasoma para producir el mismo efecto. Se conoce que muchas secuencias de péptidos cortos y análogos de péptidos inhiben el proteasoma. La unión de estas secuencias al sitio de reconocimiento de FAP por la amida N-terminal del inhibidor/ojiva formará un profármaco de potencia, especificidad y (baja) toxicidad similares a ARI-3996.

Muchos de los inhibidores del proteasoma de mayor potencia contienen 2-4 péptidos o análogos peptídicos con una fracción electrofílica que reemplaza o se adjunta al extremo carboxilo terminal. Esta fracción electrofílica es una especie reactiva que modifica covalentemente un residuo nucleofílico del proteasoma, lo que destruye su actividad catalítica. Dicho método de inactivación de una enzima se conoce comúnmente como "inhibición suicida" en la literatura. Ejemplos de fracciones electrofílicas validadas con éxito incluyen boronatos, epoxicetonas, aldehídos, cianatos, sulfonas de vinilo, α,β-carbonilos insaturados y cetoaldehídos.

En la Figura 29 se muestran las estructuras de una serie de inhibidores del proteasoma clínicamente relevantes o validados de cualquier otra manera. Una cuidadosa consideración de las estructuras químicas revela determinadas similitudes. La mayoría son di-, tri- o tetrapéptidos con una fracción electrófila unida al extremo carboxilo. En el extremo amino generalmente hay un grupo acilo o aracilo (bortezomib, CEP-18770, MLN2238, MLN9708, MG-132, PSI, ¹²⁵I-NIP-L₃VS, carfilzomib, oprozomib, epoximicina, PR-957, NC-005, NC-005-VS, YU-101, LU-005, YU-102, NC-001, NC-022, CPSI, y IPSI-001). Estos grupos acilo o aracilo están presentes para aumentar la resistencia del inhibidor del proteasoma contra las proteasas no específicas que, de cualquier otra manera, podrían degradar los péptidos cortos.

Si estos grupos acilo o aracilo N-terminales unidos a los diversos inhibidores del proteasoma mostrados en la Figura 29 se eliminan y se sustituyen por el sitio de reconocimiento FAP descrito en la presente descripción, el resultado serían nuevos inhibidores del proteasoma activados por FAP cuya especificidad y toxicidad mejoraría enormemente con respecto a sus moléculas de origen.

Referencias citadas

1. Dolznig, H., N. Schweifer, C. Puri, N. Kraut, W.J. Rettig, D. Kerjaschki, y P. Garin-Chesa. 2005. Characterization of cancer stroma markers: *in silico* analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun* 5:10.
2. Lee, K.N., K.W. Jackson, V.J. Christiansen, C.S. Lee, J.G. Chun, y P.A. McKee. 2006. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 107:1397-1404.
3. Orlowski, R.Z., y D.J. Kuhn. 2008. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 14:1649-1657.
4. Orlowski, R.Z., y A.S. Baldwin, Jr. 2002. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8:385-389.
5. Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V.J. Palombella, P.J. Elliott, J. Adams, y K.C. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61:3071-3076.
6. LeBlanc, R., L.P. Catley, T. Hideshima, S. Lentzsch, C.S. Mitsiades, N. Mitsiades, D. Neuberg, O. Goloubeva, C.S. Pien, J. Adams, D. Gupta, P.G. Richardson, N.C. Munshi, y K.C. Anderson. 2002. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62:4996-5000.
7. Orlowski, R.Z., J.R. Eswara, A. Lafond-Walker, M.R. Grever, M. Orlowski, y C.V. Dang. 1998. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 58:4342-4348.
8. Richardson, P.G., T. Hideshima, y K.C. Anderson. 2003. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10:361-369.
9. Bross, P.F., R. Kane, A.T. Farrell, S. Abraham, K. Benson, M.E. Brower, S. Bradley, J.V. Gobburu, A. Goheer, S.-L. Lee, J. Leighton, C.Y. Liang, R.T. Lostritto, W.D. McGuinn, D.E. Morse, A. Rahman, L.A. Rosario, S.L. Verbois, G. Williams, Y.-C. Wang, y R. Pazdur. 2004. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 10:3954-3964.
10. Chauhan, D., H. Uchiyama, Y. Akbarali, M. Urashima, K. Yamamoto, T.A. Libermann, y K.C. Anderson. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-1112.
11. Obeng, E.A., L.M. Carlson, D.M. Gutman, W.J. Harrington, Jr., K.P. Lee, y L.H. Boise. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107:4907-4916.
12. McConkey, D.J., y K. Zhu. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 11:164-179.
13. Engel, R.H., J.A. Brown, J.H. Von Roenn, R.M. O'Regan, R. Bergan, S. Badve, A. Rademaker, y W.J. Gradishar. 2007. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest* 25:733-737.

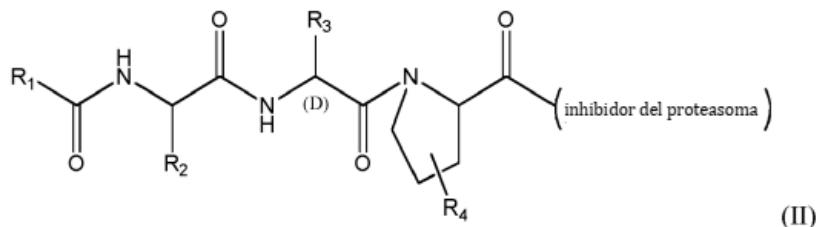
14. Dees, E.C., y R.Z. Orlowski. 2006. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer therapy. *Future Oncol* 2:121-135.
- 5 15. Hamilton, A.L., J.P. Eder, A.C. Pavlick, J.W. Clark, L. Liebes, R. Garcia-Carbonero, A. Chachoua, D.P. Ryan, V. Soma, K. Farrell, N. Kinchla, J. Boyden, H. Yee, A. Zeleniuch-Jacquotte, J. Wright, P. Elliott, J. Adams, y F.M. Muggia. 2005. Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle. *J Clin Oncol* 23:6107-6116.
- 10 16. Aghajanian, C., J.A. Blessing, K.M. Darcy, G. Reid, K. DeGeest, S.C. Rubin, R.S. Mannel, J. Rotmensch, R.J. Schilder, y W. Riordan. 2009. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 115:215-220.
- 15 17. Lonial, S., E.K. Waller, P.G. Richardson, S. Jagannath, R.Z. Orlowski, C.R. Giver, D.L. Jaye, D. Francis, S. Giusti, C. Torre, B. Barlogie, J.R. Berenson, S. Singhal, D.P. Schenkein, D.L. Esseltine, J. Anderson, H. Xiao, L.T. Heffner, y K.C. Anderson. 2005. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 106:3777-3784.
- 20 18. Richardson, P.G., H. Briemberg, S. Jagannath, P.Y. Wen, B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, D.S. Siegel, D. Irwin, M. Schuster, G. Srkalovic, R. Alexanian, S.V. Rajkumar, S. Limentani, M. Alsina, R.Z. Orlowski, K. Najarian, D. Esseltine, K.C. Anderson, y A.A. Amato. 2006. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol* 24:3113-3120.
- 25 19. Groll, M., R. Huber, y L. Moroder. 2009. The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J Pept Sci* 15:58-66.
- 20 20. Park, J.E., M.C. Lenter, R.N. Zimmermann, P. Garin-Chesa, L.J. Old, y W.J. Rettig. 1999. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 274:36505-36512.
- 25 21. Scanlan, M.J., B.K. Raj, B. Calvo, P. Garin-Chesa, M.P. Sanz-Moncaso, J.H. Healey, L.J. Old, and W.J. Rettig. 1994. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5657-5661.
- 30 22. Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, y M.J. Thun. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
- 35 23. Stinchcombe, T.E., y M.A. Socinski. 2009. Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6:233-241.
- 30 24. Pennell, N.A., y T. Mekhail. 2009. Investigational agents in the management of non-small cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 11:275-284.
- 35 25. Di Costanzo, F., F. Mazzoni, M. Micol Mela, L. Antonuzzo, D. Checcacci, y M. Saggese. 2008. Bevacizumab in non-small cell lung cancer. *Drugs* 68:737-746.
- 40 26. Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C.C. Benz, L. Dantis, N.T. Sklarin, A.D. Seidman, C.A. Hudis, J. Moore, P.P. Rosen, T. Twaddell, I.C. Henderson, y L. Norton. 1996. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14:737-744.
- 45 27. Cobleigh, M.A., C.L. Vogel, D. Tripathy, N.J. Robert, S. Scholl, L. Fehrenbacher, J.M. Wolter, V. Paton, S. Shak, G. Lieberman, y D.J. Slamon. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-2648.
- 50 28. Vogel, C.L., M.A. Cobleigh, D. Tripathy, J.C. Gutheil, L.N. Harris, L. Fehrenbacher, D.J. Slamon, M. Murphy, W.F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S.J. Stewart, y M. Press. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:719-726.
- 55 29. Nahta, R., y F.J. Esteva. 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 8:215.
- 30 30. Richardson, P.G., C. Mitsiades, T. Hideshima, y K.C. Anderson. 2006. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57:33-47.
- 50 31. Milano, A., R.V. Iaffaioli, y F. Caponigro. 2007. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer* 43:1125-1133.
- 35 32. Caravita, T., P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori, y M. Boccadoro. 2006. Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nat Clin Pract Oncol* 3:374-387.
- 40 33. Gilardini, A., P. Marmiroli, y G. Cavalletti. 2008. Proteasome inhibition: a promising strategy for treating cancer, but what about neurotoxicity? *Curr Med Chem* 15:3025-3035.
- 45 34. Sterz, J., I. von Metzler, J.C. Hahne, B. Lamottke, J. Rademacher, U. Heider, E. Terpos, y O. Sezer. 2008. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 17:879-895.
- 50 35. Zavrski, I., L. Kleeberg, M. Kaiser, C. Fleissner, U. Heider, J. Sterz, C. Jakob, y O. Sezer. 2007. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. *Curr Pharm Des* 13:471-485.
- 55 36. Spataro, V., C. Norbury, y A.L. Harris. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 77:448-455.
- 60 37. Windebank, A.J., y W. Grisold. 2008. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 13:27-46.
- 65 38. Adams, J., V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, y P.J. Elliott. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622.
39. Wang, C.Y., M.W. Mayo, y A.S. Baldwin, Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.

40. Wang, C.Y., J.C. Cusack, Jr., R. Liu, y A.S. Baldwin, Jr. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5:412-417.
- 5 41. Cusack, J.C., Jr., R. Liu, M. Houston, K. Abendroth, P.J. Elliott, J. Adams, y A.S. Baldwin, Jr. 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 61:3535-3540.
- 10 42. Ling, Y.H., L. Liebes, B. Ng, M. Buckley, P.J. Elliott, J. Adams, J.D. Jiang, F.M. Muggia, y R. Perez-Soler. 2002. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1:841-849.
- 15 43. Loo, T.W., y D.M. Clarke. 1998. Superfolding of the partially unfolded core-glycosylated intermediate of human P-glycoprotein into the mature enzyme is promoted by substrate-induced transmembrane domain interactions. *J Biol Chem* 273:14671-14674.
- 20 44. Messersmith, W.A., S.D. Baker, L. Lassiter, R.A. Sullivan, K. Dinh, V.I. Almuete, J.J. Wright, R.C. Donehower, M.A. Carducci, y D.K. Armstrong. 2006. Phase I trial of bortezomib in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 12:1270-1275.
- 25 45. Lieu, C., L. Chow, A.S. Pierson, S.G. Eckhardt, C.L. O'Bryant, M. Morrow, Z.V. Tran, J.J. Wright, y L. Gore. 2009. A phase I study of bortezomib, etoposide and carboplatin in patients with advanced solid tumors refractory to standard therapy. *Invest New Drugs* 27:53-62.
- 30 46. Ryan, D.P., L.J. Appleman, T. Lynch, J.G. Supko, P. Fidias, J.W. Clark, M. Fishman, A.X. Zhu, P.C. Enzinger, O. Kashala, J. Cusack, Jr., y J.P. Eder. 2006. Phase I clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 107:2482-2489.
- 35 47. Voortman, J., E.F. Smit, R. Honeywell, B.C. Kuenen, G.J. Peters, H. van de Velde, y G. Giaccone. 2007. A parallel dose-escalation study of weekly and twice-weekly bortezomib in combination with gemcitabine and cisplatin in the first-line treatment of patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 13:3642-3651.
- 40 48. Emmenegger, U., G. Francia, Y. Shaked, y R.S. Kerbel. Metronomic chemotherapy: principles and lessons learned from applications in the treatment of metastatic prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* 180:165-183.
- 45 49. Mutsaers, A.J. 2009. Metronomic chemotherapy. *Top Companion Anim Med* 24:137-143.
- 50 50. Navon, A., y A. Ciechanover. 2009. The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem* 284:33713-33718.
- 55 51. Adams, J. 2002. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 7:9-16.
- 60 52. Sayers, T. 2008. Productively combining proteasome inhibition with the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 86:857-860.
- 65 53. Landowski, T.H., C.J. Megli, K.D. Nullmeyer, R.M. Lynch, y R.T. Dorr. 2005. Mitochondrial-mediated disregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade® (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 65:3828-3836.
- 70 54. Pei, X.Y., Y. Dai, y S. Grant. 2004. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 10:3839-3852.
- 75 55. Pineiro-Sanchez, M.L., L.A. Goldstein, J. Dodt, L. Howard, Y. Yeh, H. Tran, W.S. Argraves, y W.T. Chen. 1997. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J Biol Chem* 272:7595-7601.
- 80 56. Rosenblum, J.S., y J.W. Kozarich. 2003. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 7:496-504.
- 85 57. Edosada, C.Y., C. Quan, T. Tran, V. Pham, C. Wiesmann, W. Fairbrother, y B.B. Wolf. 2006. Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBSLett* 580:1581-1586.
- 90 58. Garin-Chesa, P., L.J. Old, y W.J. Rettig. 1990. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7235-7239.
- 95 59. Rettig, W.J., P. Garin-Chesa, J.H. Healey, S.L. Su, H.L. Ozer, M. Schwab, A.P. Albino, y L.J. Old. 1993. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res* 53:3327-3335.
- 100 60. Rettig, W.J., P. Garin-Chesa, H.R. Beresford, H.F. Oettgen, M.R. Melamed, y L.J. Old. 1988. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3110-3114.
- 105 61. Bhowmick, N.A., E.G., Neilson, y H.L. Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332-337.
- 110 62. Orlowski, R.Z., K. Stewart, M. Vallone, y otros 2007. Safety and antitumor efficacy of the proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) dosed for five consecutive days in hematologic malignancies: phase I result [resumen 409]. *Blood* 110:127a.
- 115 63. Alsina, M., S. Trudel, M. Vallone, y otros 2007. Phase I single agent antitumor activity of twice weekly-consecutive day dosing of the proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in hematologic malignancies [resumen 411]. *Blood* 110:128a.
- 120 64. Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17:7151-7160.
- 125 65. Bachovchin, W.W., A.G. Plaut, G.R. Flentke, M. Lynch, y C.A. Kettner. 1990. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Hemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. *J Biol Chem* 265:3738-3743.

66. Connolly, B.A., D.G. Sanford, A.K. Chiluwal, S.E. Healey, D.E. Peters, M.T. Dimare, W. Wu, Y. Liu, H. Maw, Y. Zhou, Y. Li, Z. Jin, J.L. Sudmeier, J.H. Lai, y W.W. Bachovchin. 2008. Dipeptide boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: determinants of potency and in vivo efficacy and safety. *J Med Chem* 51:6005-6013.
- 5 67. Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, y D.A. Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15:3243-3248.
- 10 68. Santos, A.M., J. Jung, N. Aziz, J.L. Kissil, y E. Pure. 2009. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest* 119:3613-3625.
- 15 69. Cheng, J.D., M. Valianou, A.A. Canutescu, E.K. Jaffe, H.O. Lee, H. Wang, J.H. Lai, W.W. Bachovchin, y L.M. Weiner. 2005. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* 4:351-360.
70. Niedermeyer, J., M. Kriz, F. Hilberg, P. Garin-Chesa, U. Bamberger, M.C. Lenter, J. Park, B. Viertel, H. Puschner, M. Mauz, W.J. Rettig, y A. Schnapp. 2000. Targeted disruption of mouse fibroblast activation protein. *Mol Cell Biol* 20:1089-1094.
- 15 71. Adams, J., V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, y P.J. Elliott. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622.
- 20 72. McConkey, D.J., y K. Zhu. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Update* 11:164-179.
73. Dolznig, H., N. Schweifer, C. Puri, N. Kraut, W.J. Rettig, D. Kerjaschki, y P. Garin-Chesa. 2005. Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun* 5:10.

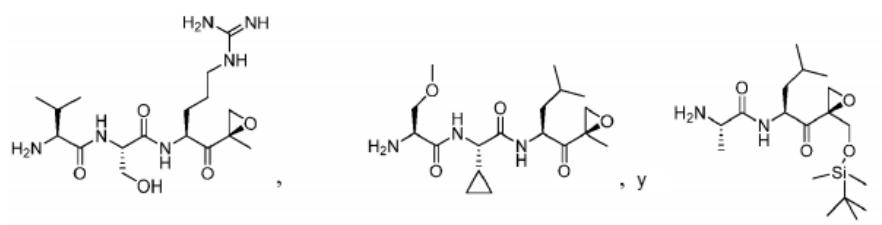
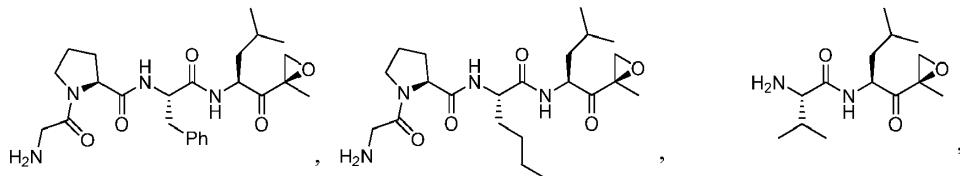
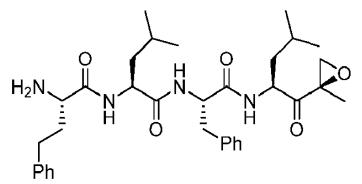
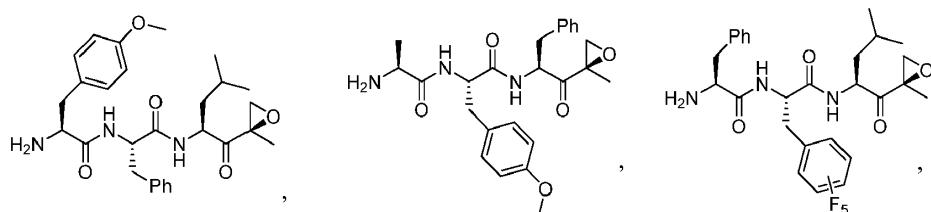
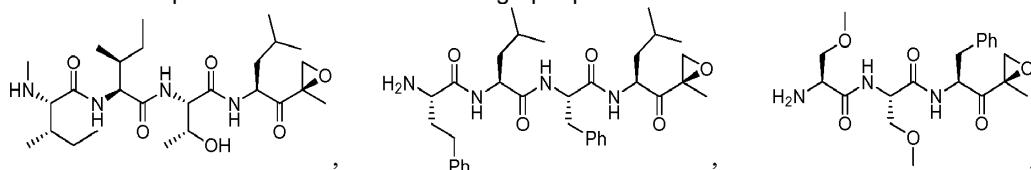
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula II:



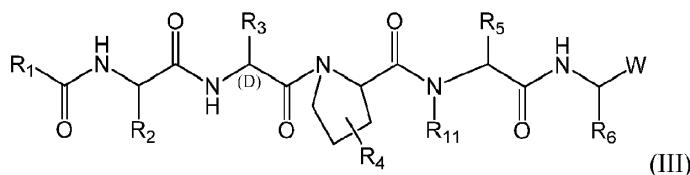
en donde

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; -C(=O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(=O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;
R₂ representa H, alquilo (C₁-C₁₀), o un alquilo (C₁-C₁₀) mono- o di-hidroxi-sustituido;
R₃ representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);
R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno; y
el compuesto se escinde por FAP para liberar un inhibidor del proteasoma, en donde:
el inhibidor del proteasoma se selecciona del grupo que consiste en:



o
un compuesto representado por la fórmula III:

5



10

en donde

15

R₁-(C=O)- representa un grupo bloqueante N-terminal de acilo seleccionado del grupo que consiste en formilo; acetilo; benzoilo; trifluoroacetilo; succinilo; metoxisuccinilo; -C(O)-(CH₂)₁₋₁₀-C(O)-OH; arilo(C₁-C₆)acilo en donde el arilo se selecciona del grupo que consiste en benceno, naftaleno, fenantreno, fenol y anilina; heteroarilo(C₁-C₆)acilo en donde el heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina; y alquilo (C₁-C₁₀)-C(O)- sustituido con uno o más grupos funcionales que se ionizan a pH fisiológico;

20

R₂ representa H, alquilo (C₁-C₁₀), o un alquilo (C₁-C₁₀) mono- o di-hidroxi-sustituido;

R₃ representa H, halógeno o alquilo (C₁-C₁₀);

R₄ está ausente o representa alquilo (C₁-C₁₀), -OH, -NH₂ o halógeno;

R₅ representa una cadena lateral grande de aminoácido hidrófobo;

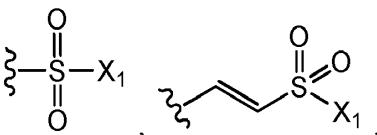
R₆ representa alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo, arilo, heterociclo o -(CH₂)_n-R₇;

R₇ representa arilo, aralquilo, cicloalquilo, alcoxi, alquilitio, -OH o -SH;

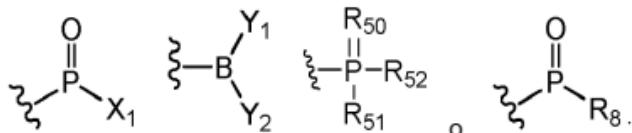
R₁₁ representa H o alquilo (C₁-C₁₀);

W representa -CN, una epoxicetona, -CH=NR₈,

30



35



40

R₈ representa H, alquilo, alquenilo, alquinilo, -C(X₁)(X₂)X₃, -(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-OH, -(CH₂)_n-O-alquilo, -(CH₂)_n-O-alquenilo, -(CH₂)_n-O-alquinilo, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₉, -(CH₂)_n-SH, -(CH₂)_n-S-alquilo, -(CH₂)_n-S-alquenilo, -(CH₂)_n-S-alquinilo, -(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₉, -C(=O)C(=O)NH₂, -C(=O)C(=O)OR₁₀;

R₉ representa, independientemente para cada ocurrencia, un arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

45

R₁₀ representa, independientemente para cada ocurrencia, hidrógeno, o un alquilo, alquenilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

Y₁ y Y₂ pueden ser juntos o independientemente OH, o un grupo capaz de hidrolizarse a un grupo hidroxilo, que incluyen los derivados cíclicos donde Y₁ y Y₂ están conectados a través de un anillo que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

50

R₅₀ representa O o S;

R₅₁ representa N₃, SH₂, NH₂, NO₂ o -OR₁₀;

R₅₂ representa hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₀), amina, -OR₁₀, o una sal farmacéuticamente aceptable, o R₅₁ y R₅₂ tomados junto con el átomo de fósforo al que están unidos, completan un anillo heterocíclico que tiene de 5 a 8 átomos en la estructura del anillo;

55

X₁ es halógeno;

cada X₂ y X₃ representa H o halógeno;

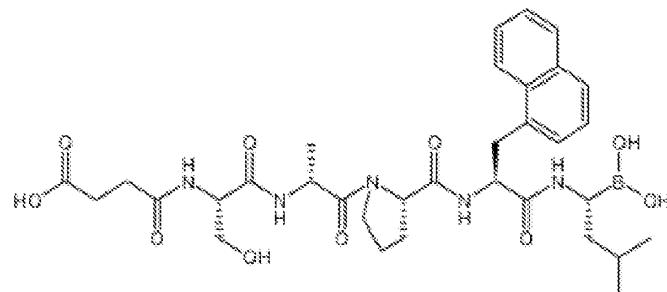
m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8; y

n es un número entero en el intervalo de 1 a 8;

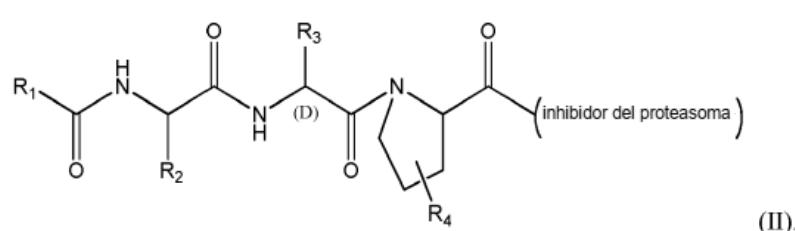
60

opcionalmente en donde el compuesto se representa por

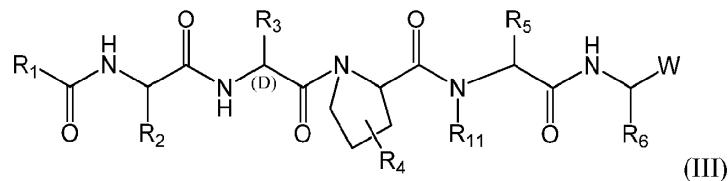
65



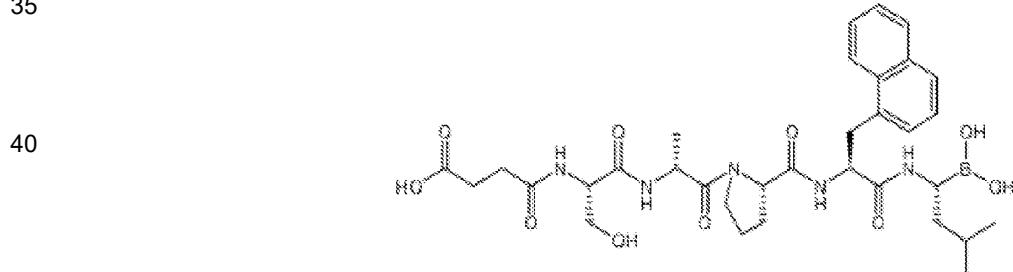
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se representa por la fórmula II:



25 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se representa por la fórmula III:



4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se representa por



5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de cáncer, psoriasis, reestenosis u otra enfermedad de proliferación celular en un mamífero.

50 6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto es para administración conjunta con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico, opcionalmente en donde el agente quimioterapéutico es:

- 55 a) docetaxel, paclitaxel, mesilato de imatinib, gemcitabina, cis-platino, carboplatino, 5-fluorouracilo, pemetrexed, metotrexato, doxorubicina, lenalidomida, dexametasona o monometil auristatina, o;
b) docetaxel, gemcitabina, carboplatino o doxorubicina, o;
c) MG-132, PSI, felutamida B, bortezomib, CEP-18770, MLN-2238, MLN-9708, epoxomicina, carfilzomib (PR-171), NC-005, YU-101, LU-005, YU-102, NC-001, LU-001, NC-022, PR-957 (LMP7), CPSI (β 5), LMP2-sp-ek, BODIPY-NC-001, azido-NC-002, ONX-0912, omuralida, PS-519, marizomib, belactosina A, 125 I-NIP-L₃VS, NC-005-VS, o MV151.

60 7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el compuesto es para su uso en el tratamiento del cáncer, opcionalmente en donde el cáncer es un tumor sólido.

65 8. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde dicho mamífero es un primate, equino, canino, felino, bovino o humano.

9. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde el compuesto es para la administración por inhalación, por vía oral, intravenosa, sublingual, ocular, transdérmica, rectal, vaginal, tópica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea, bucal o intranasal.

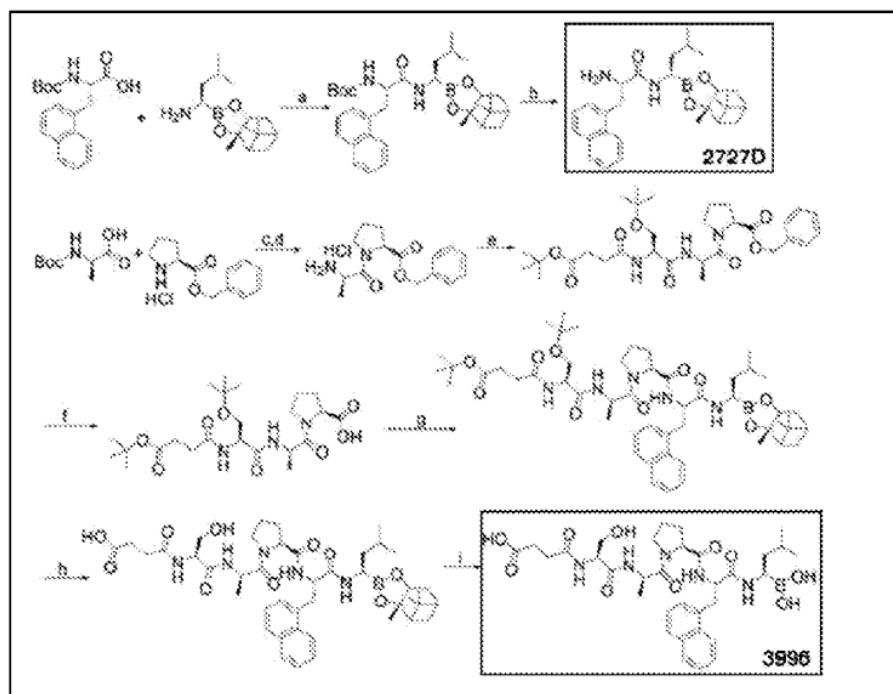
Figura 1

Figura 2

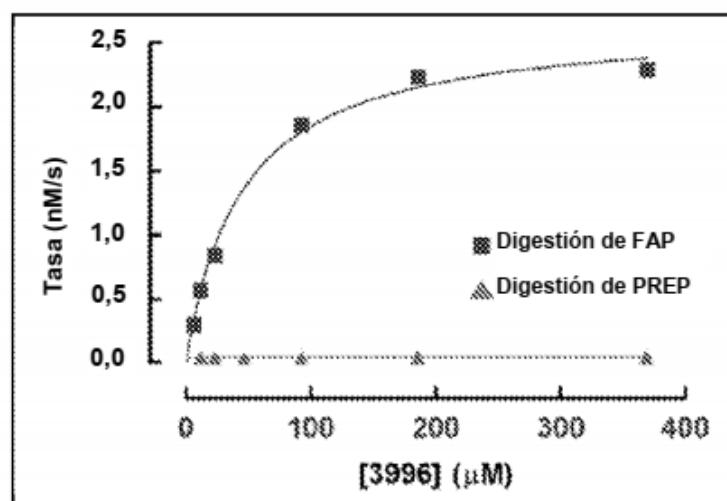


Figura 3

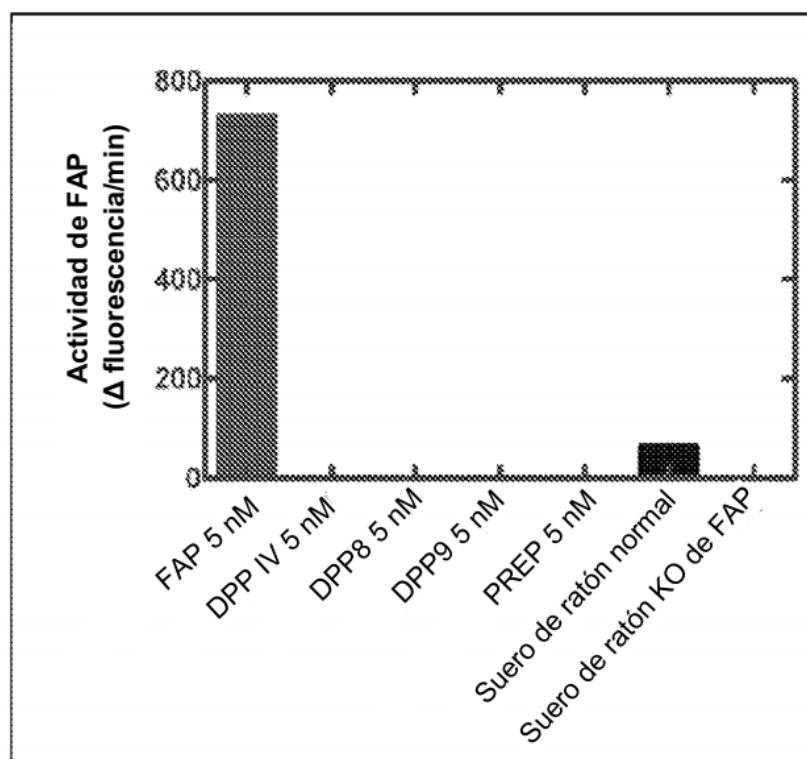


Figura 4

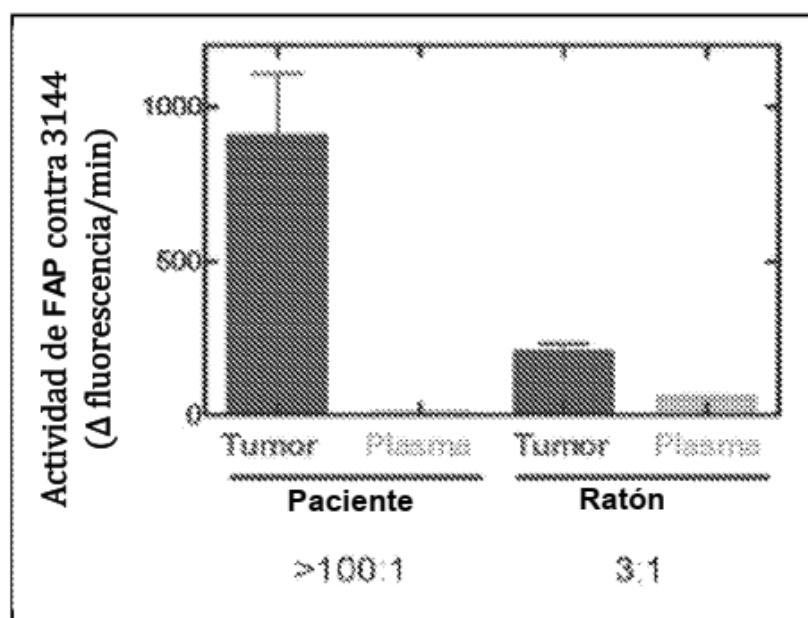
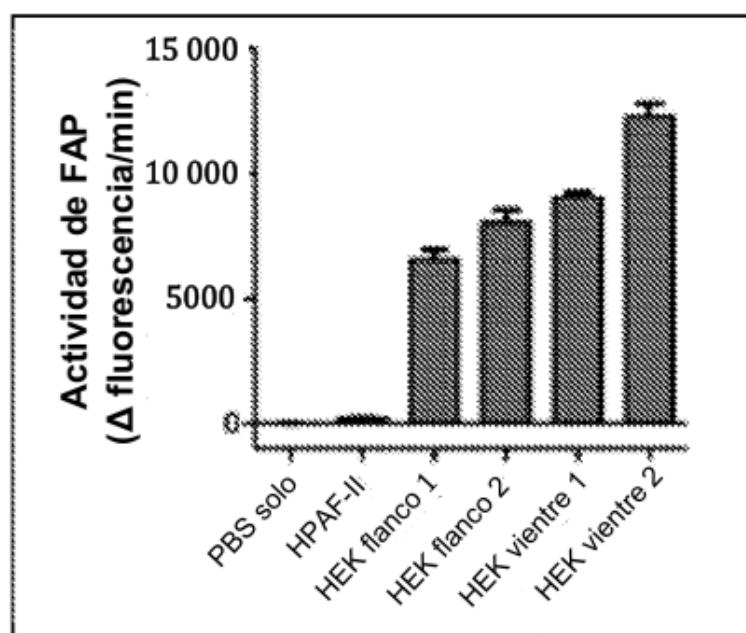


Figura 5



ES 2 929 179 T3

Figura 6

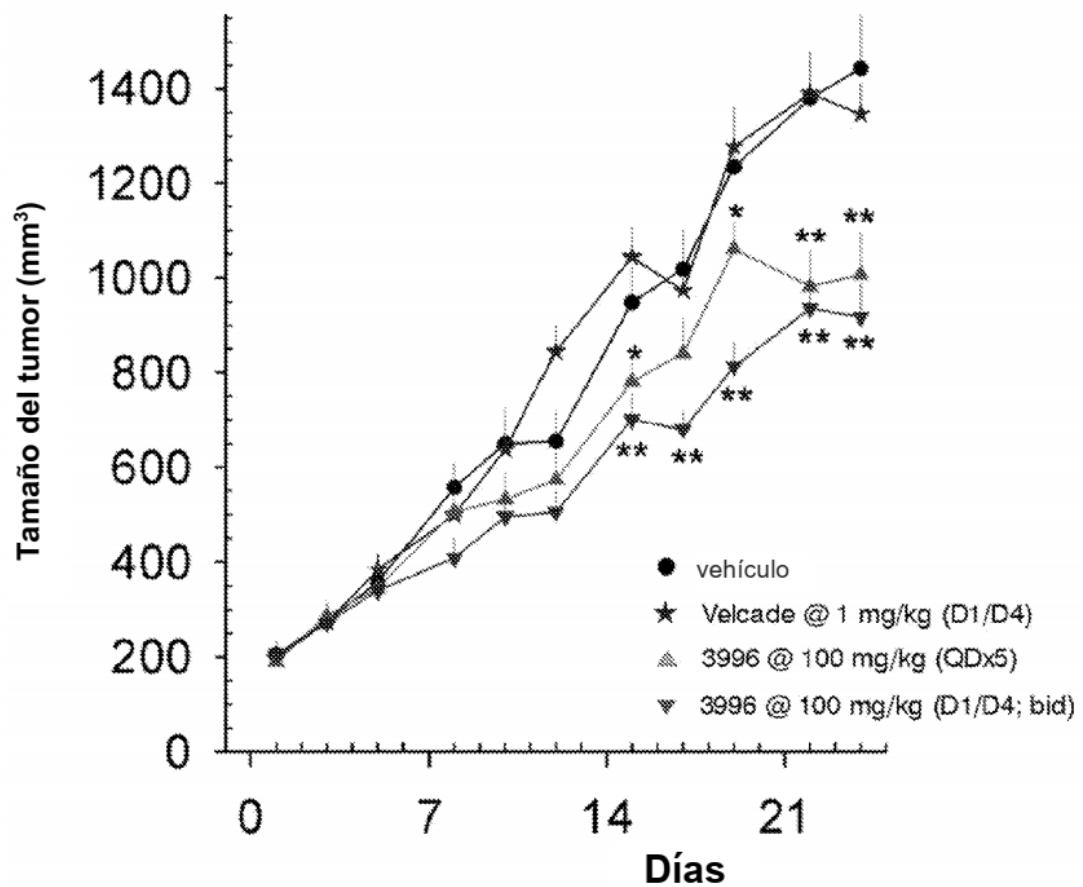


Figura 7

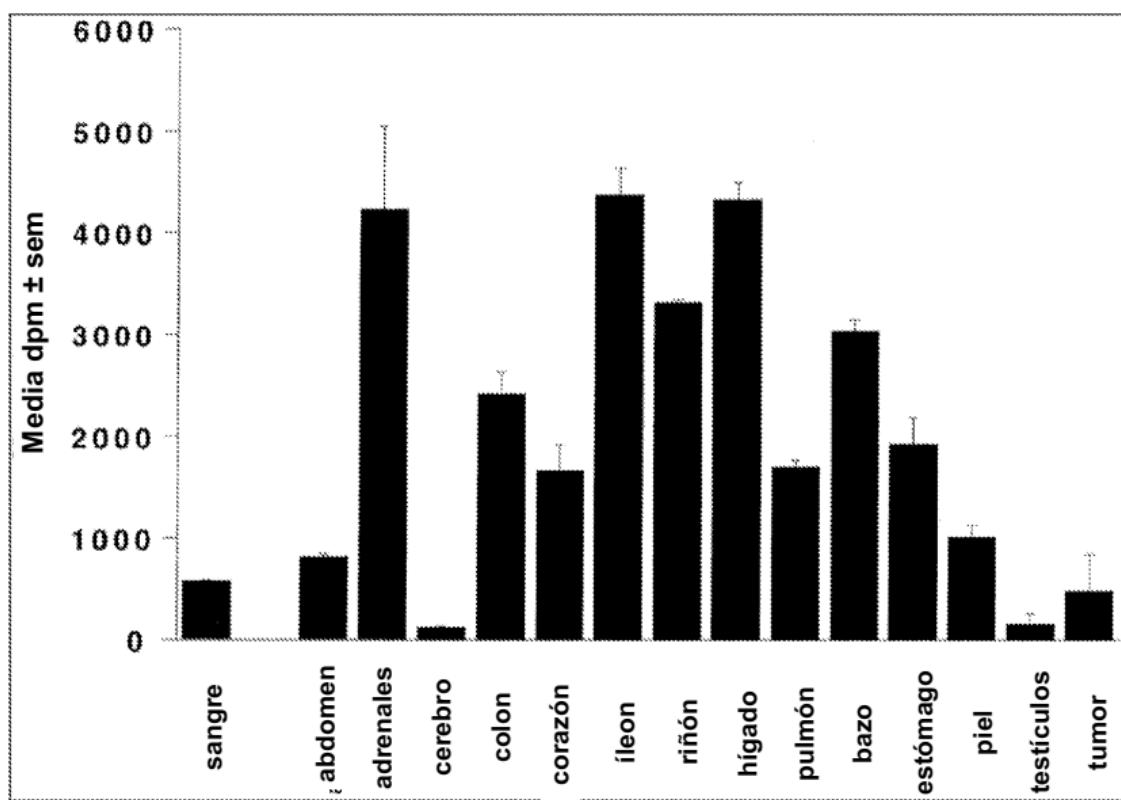


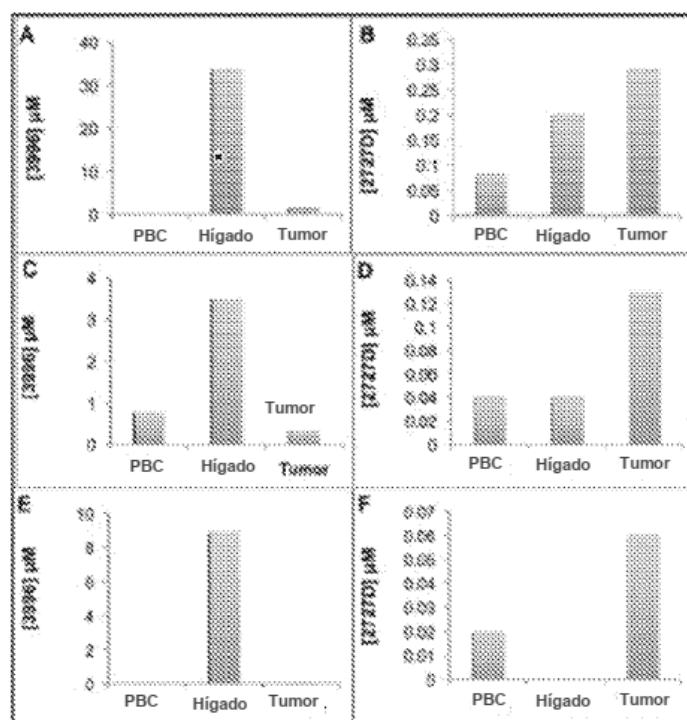
Figura 8

Figura 9

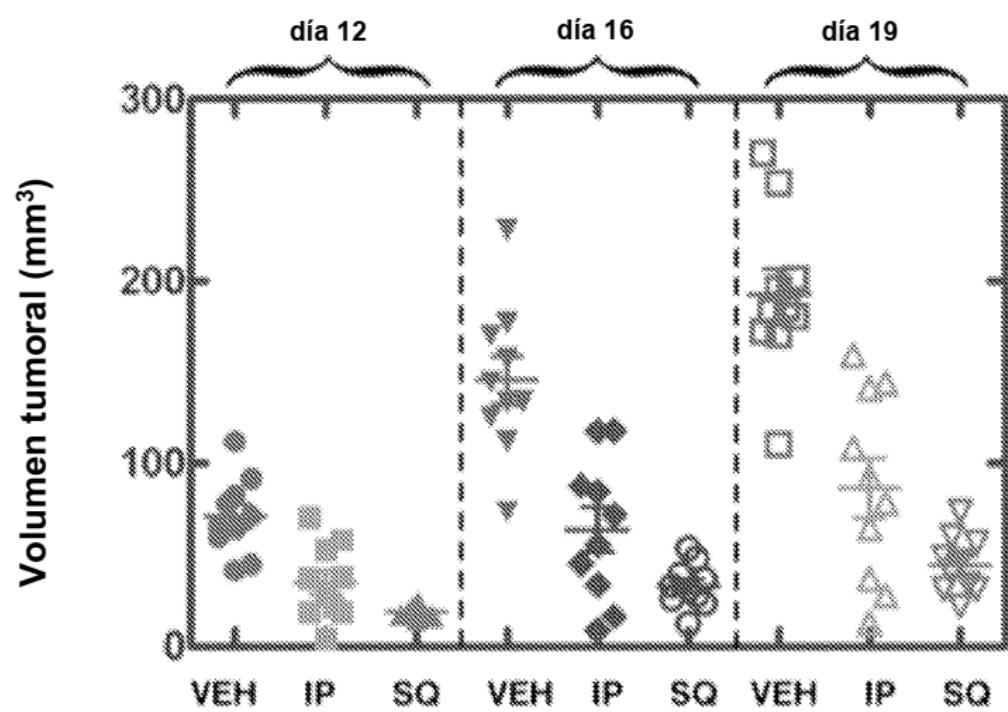
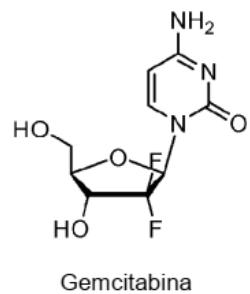


Figura 10



Gemcitabina

* La gemcitabina es el tratamiento estándar actual para el cáncer de páncreas

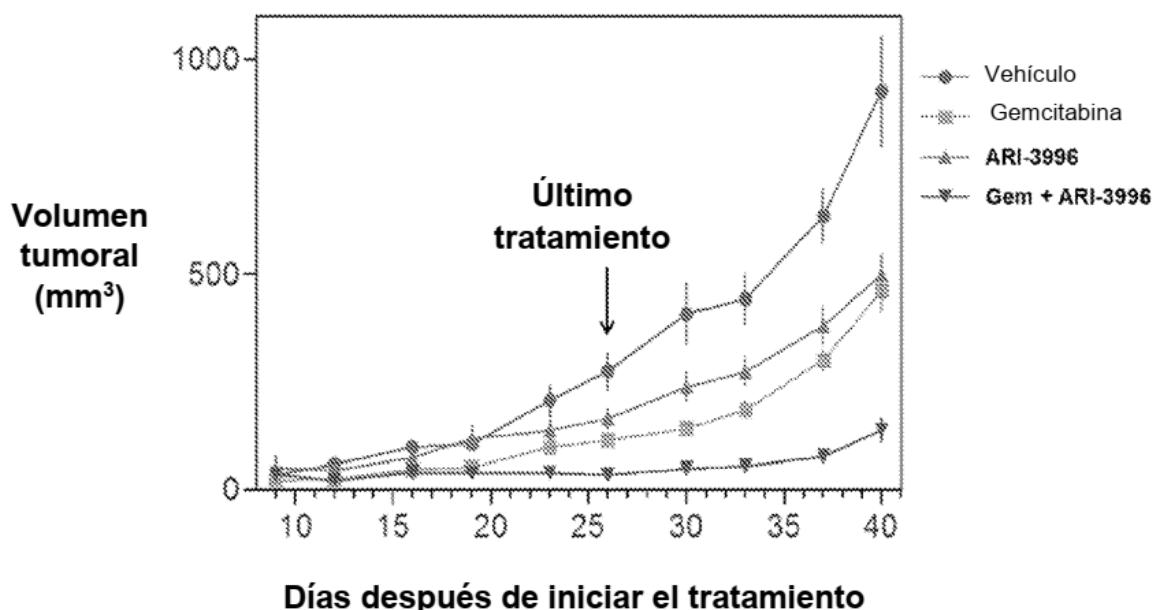


Figura 11

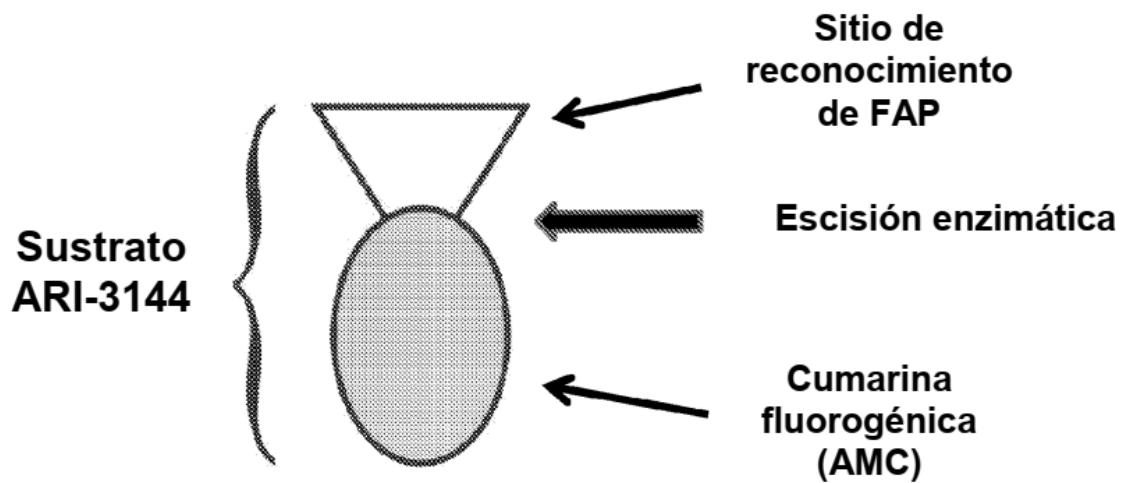
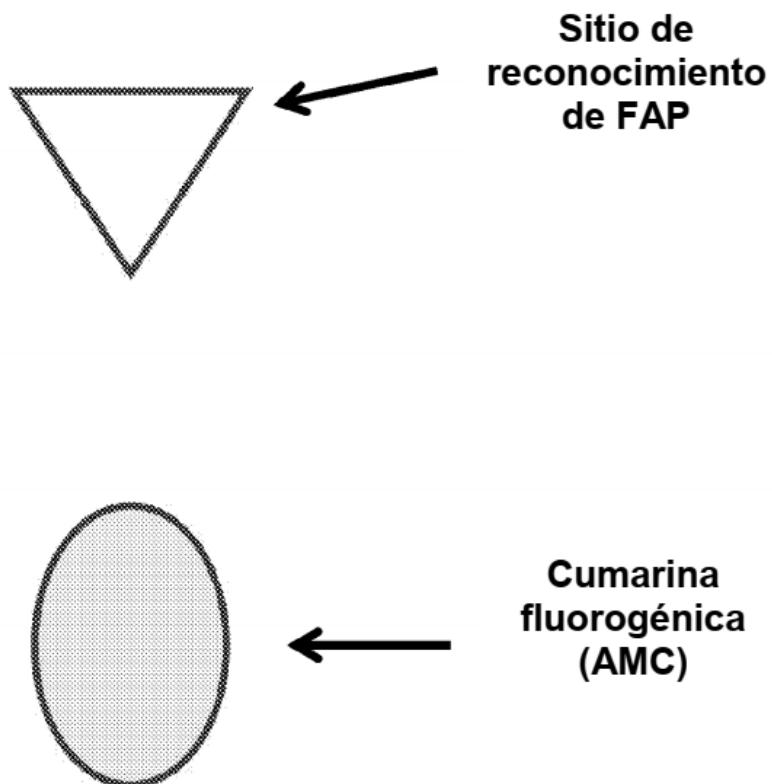


Figura 12



ES 2 929 179 T3

Figura 13

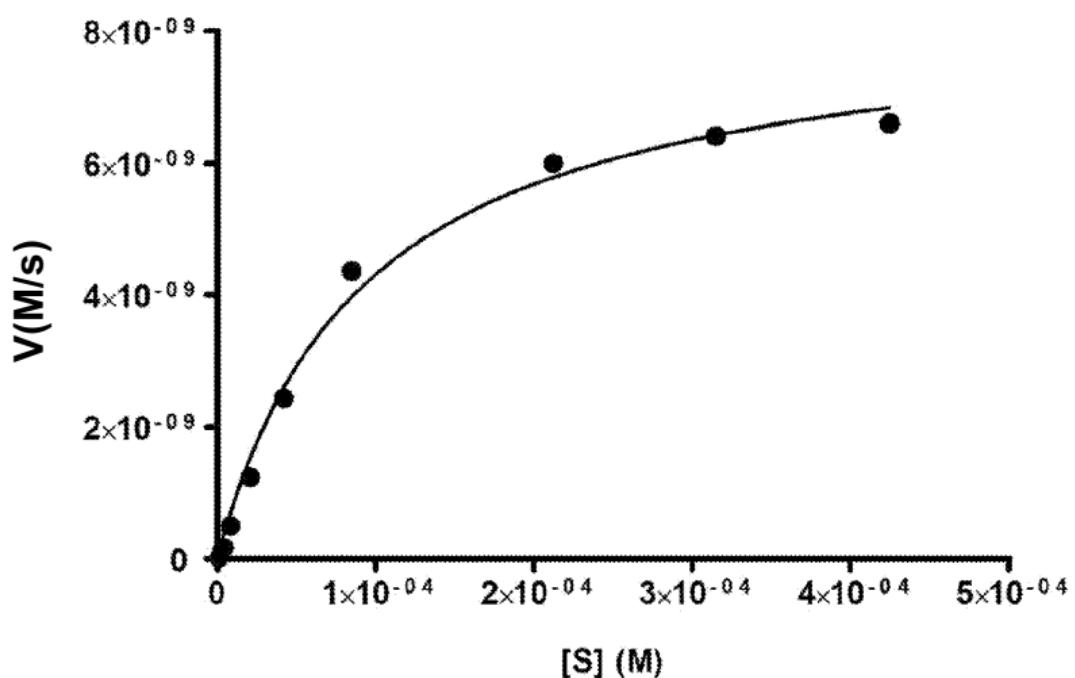


Figura 14

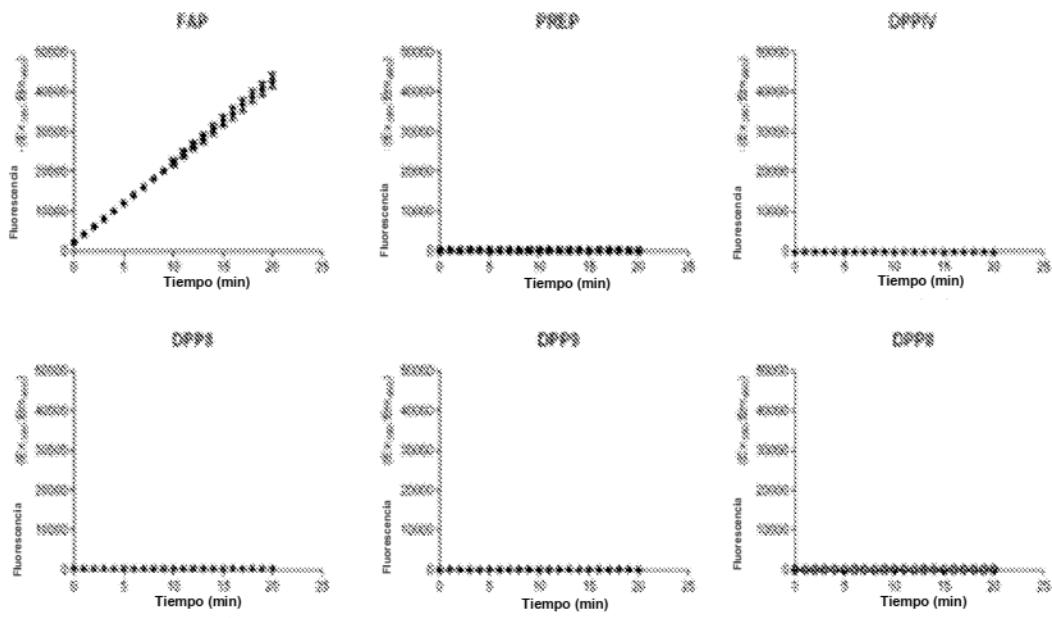


Figura 15

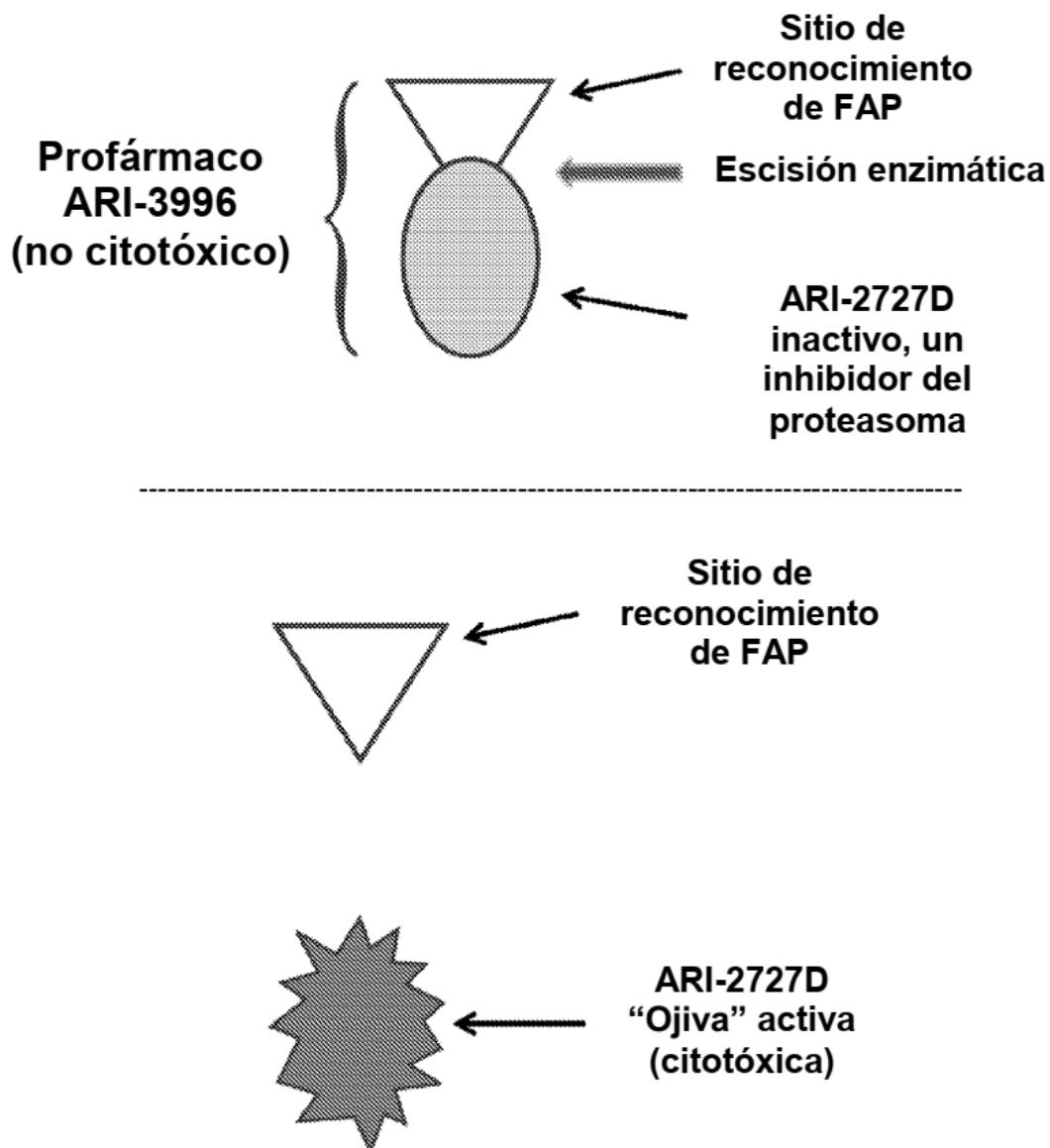


Figura 16

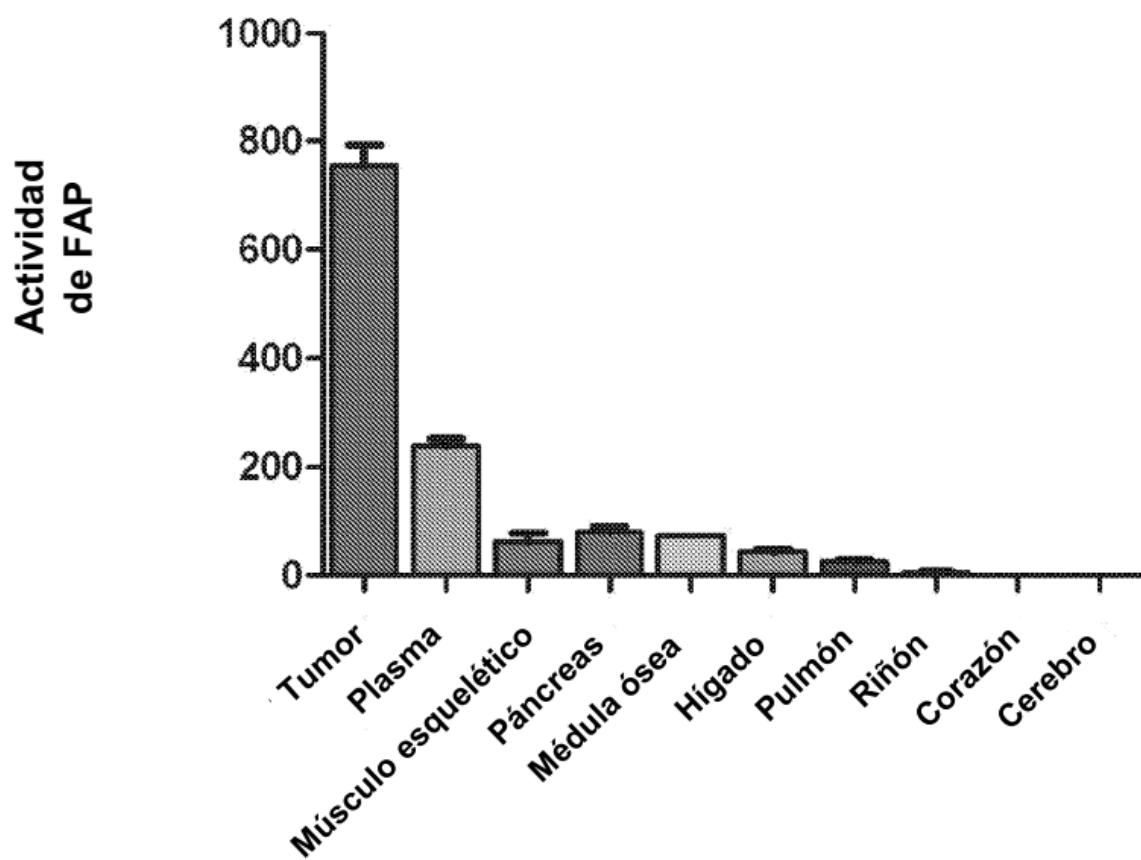


Figura 17

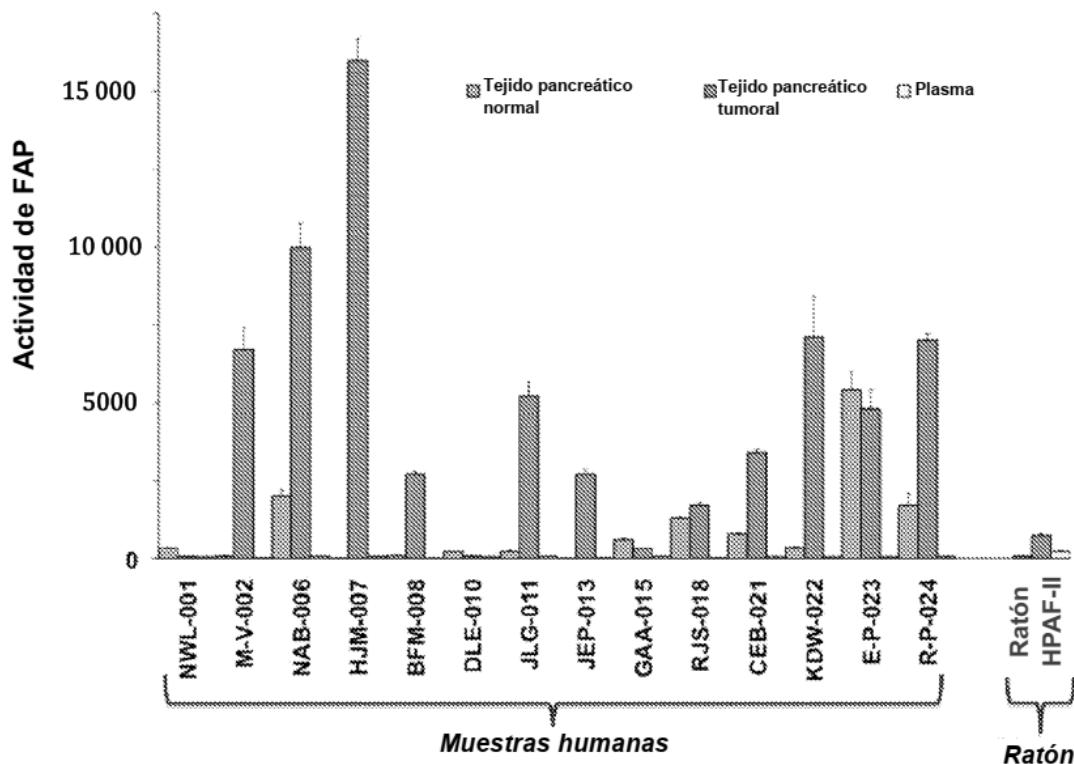


Figura 18

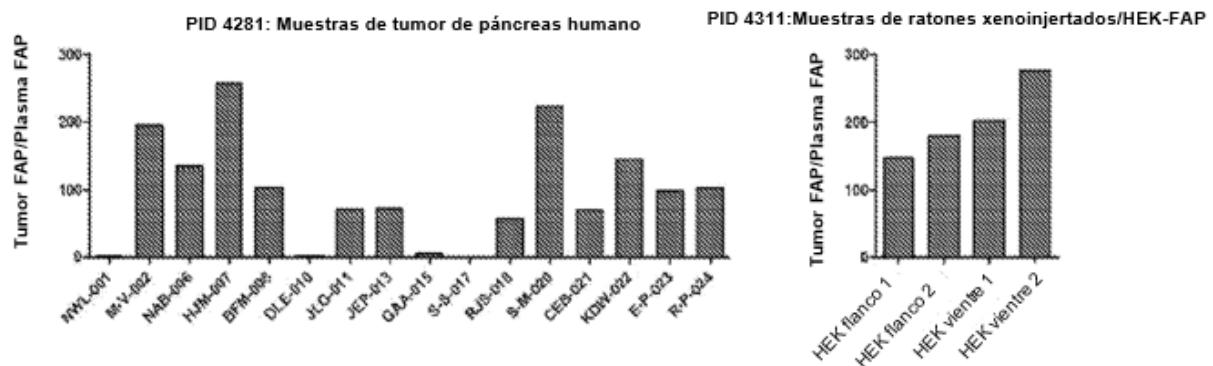
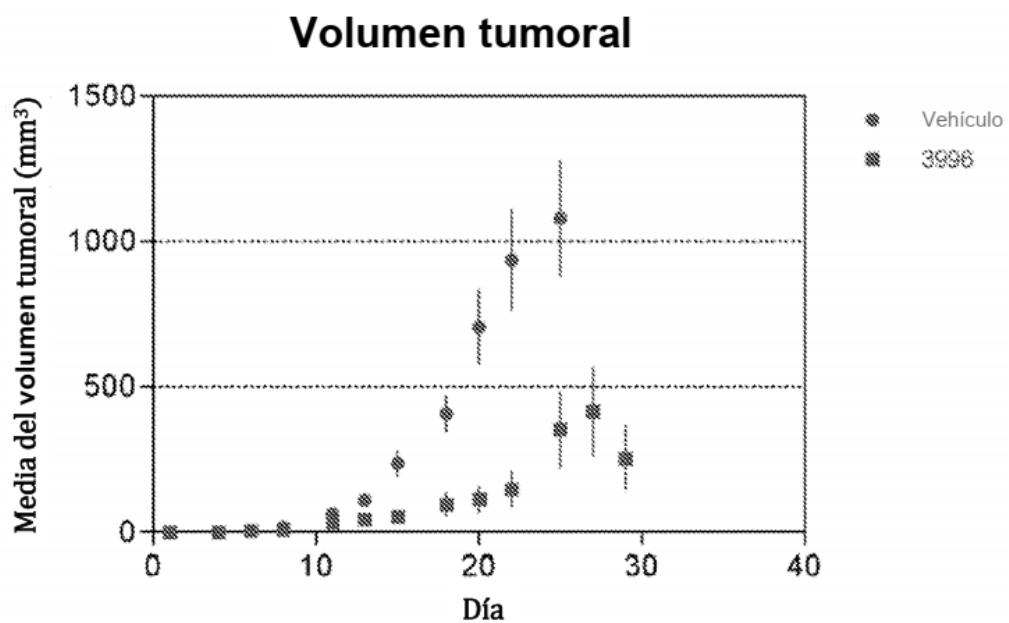


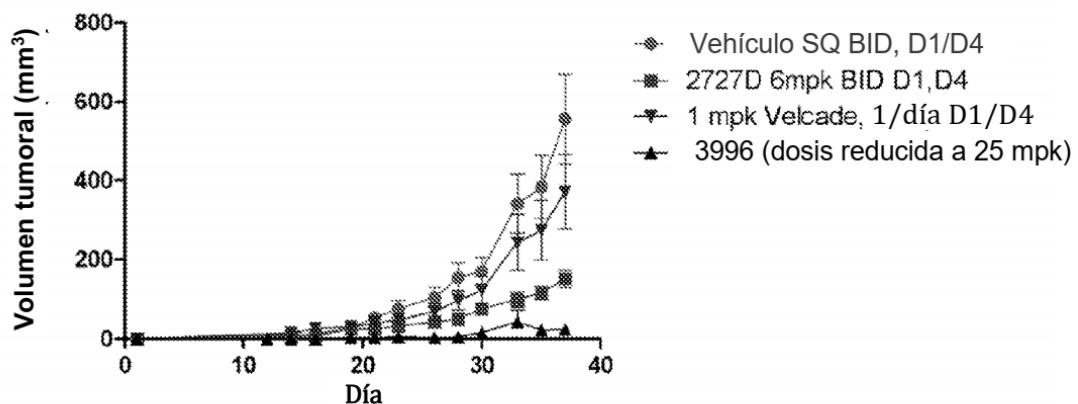
Figura 19



ES 2 929 179 T3

Figura 20

3619 - 3996 eficacia en el modelo HEK-FAP Resultados preliminares: 18/5/2012



3619 - 3996 eficacia en el modelo simulación en HEK Resultados preliminares: 17/5/2012

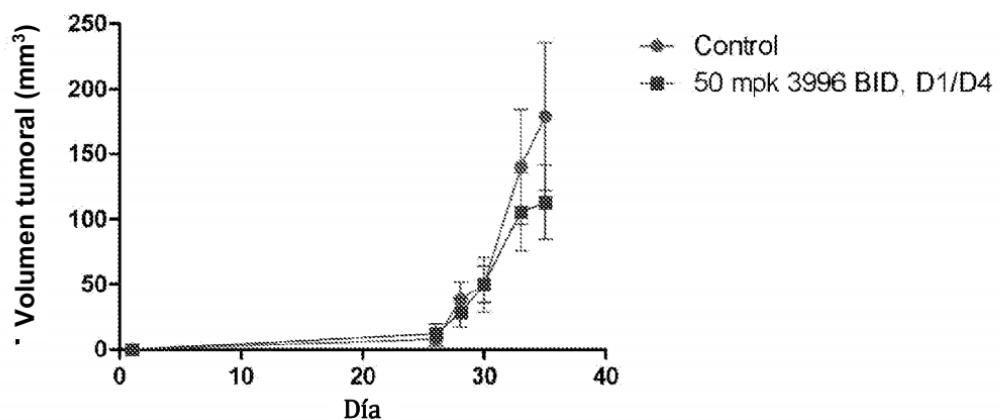


Figura 21

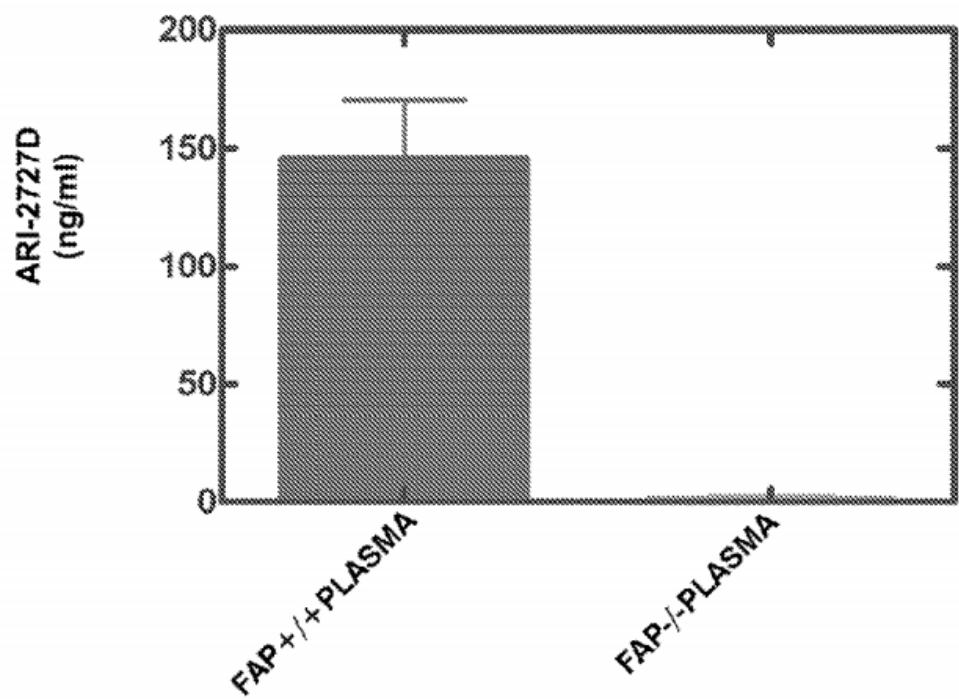


Figura 22

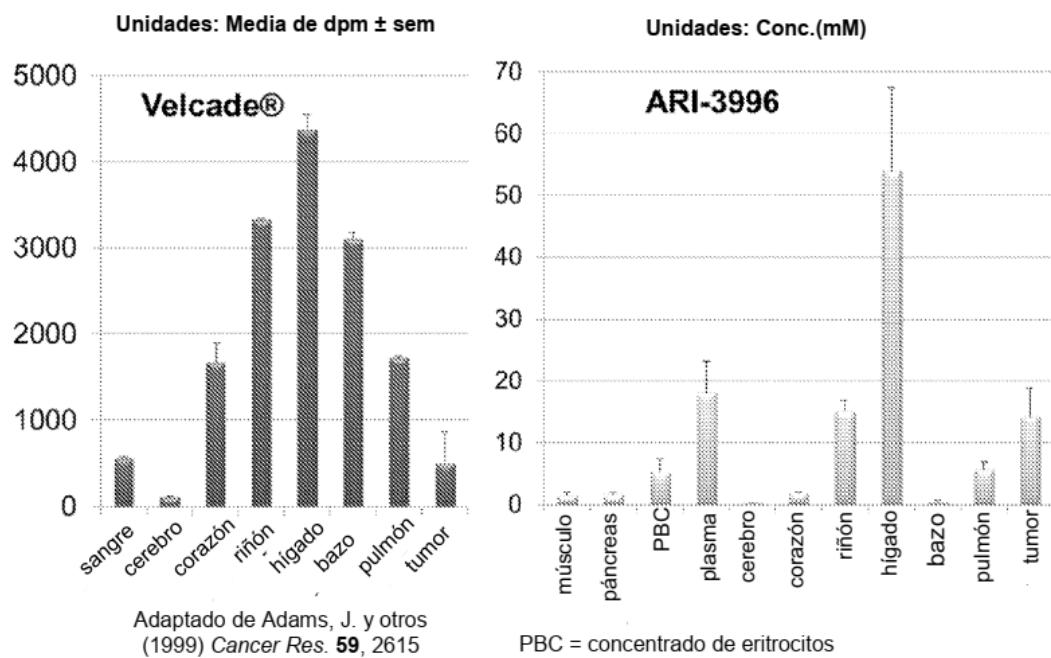


Figura 23

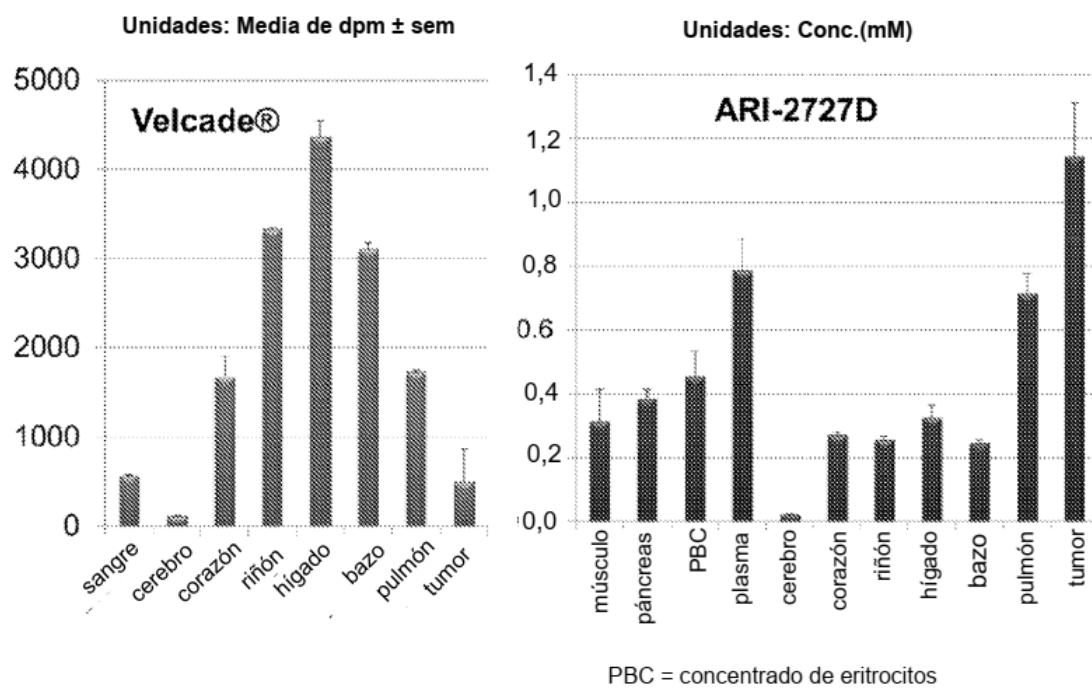
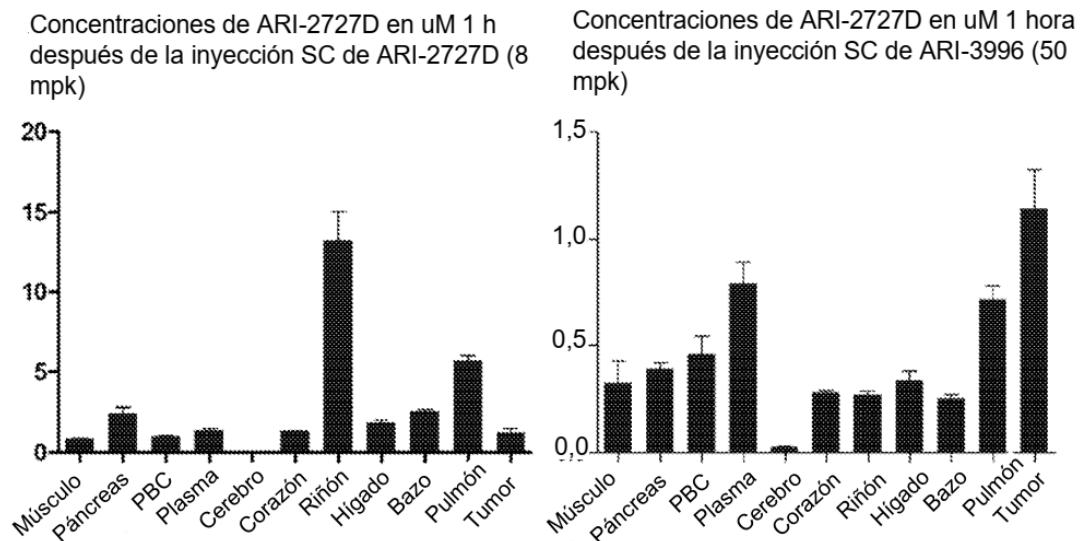


Figura 24

<u>Agente</u>	<u>Conc. en el tumor/ Conc. en el hígado</u>
Velcade®	0,11
ARI-3996	0,26
ARI-2727D	3,5

Figura 25

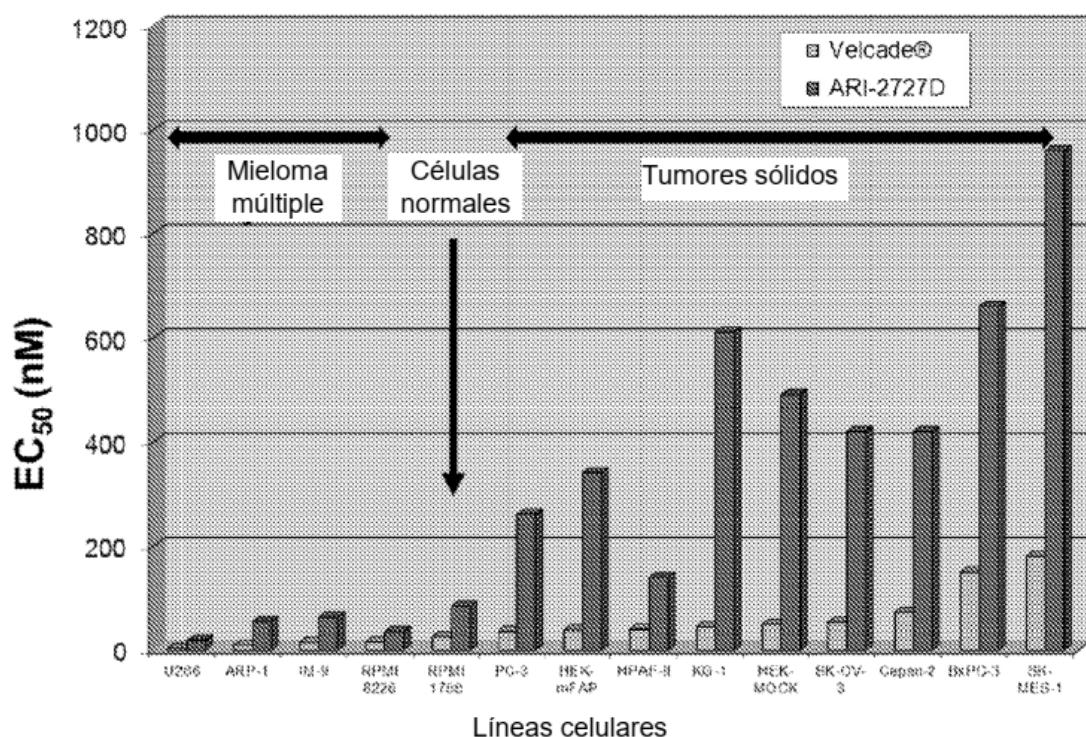


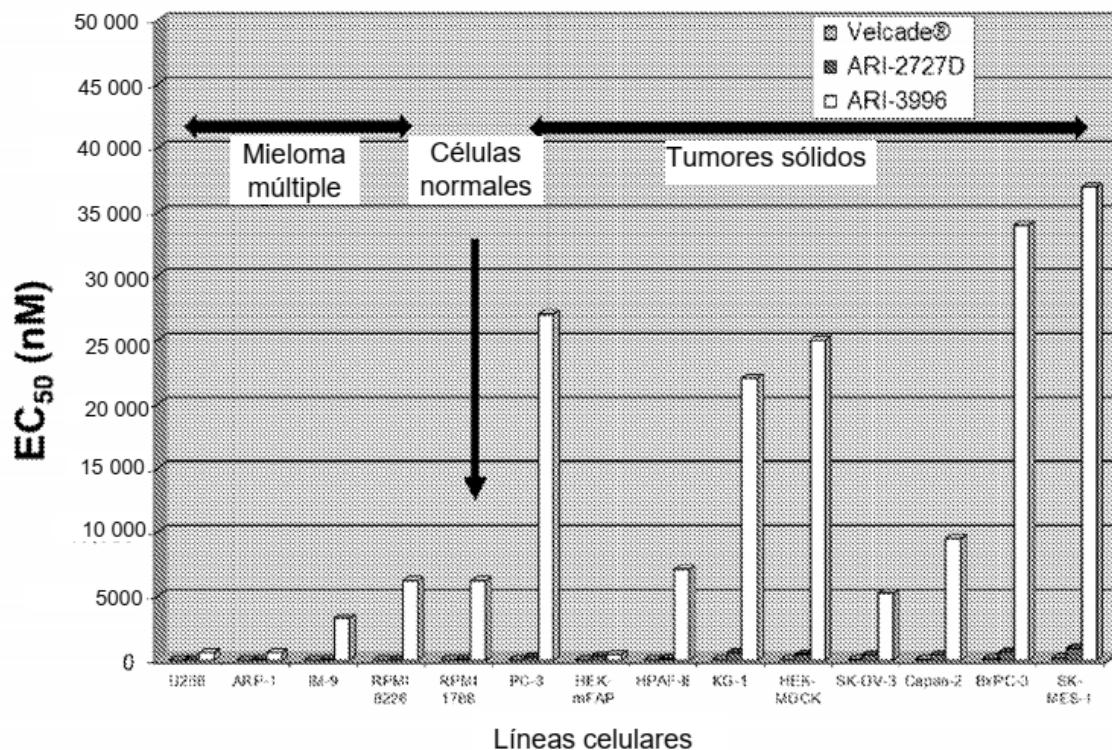
Figura 26

Figura 27

Fuente de tejido	Muestra de tejido n. ^º	Código de barras del suero	Actividad de FAP (ΔFL/min/mg de proteína)	
			Tejido	Suero
Vejiga	1007526	113388	1969	50
Vejiga	1005013	106958	1182	33
Vejiga	1005636	109017	474	42
Vejiga	1006129	110335	4104	63
Vejiga	1007027	110340	1847	87
Mama	1005395	108343	98	85
Mama	1005451	108499	1598	59
Mama	1008772	112035	1648	65
Mama	1009328	118686	1073	57
Mama	1009649	119507	360	64
Colon	1006685	111639	643	50
Colon	1006857	112000	1413	74
Colon	1006879	112112	1988	46
Colon	1007172	112837	569	45
Colon	1007407	113270	835	45
Pulmón	1009959	120228	118	56
Pulmón	1010842	122636	1374	55
Pulmón	1010756	122466	104	53
Pulmón	1009309	117908	313	58
Pulmón	1010231	120826	135	46

Figura 27 (Continuación)

Fuente de tejido	Muestra de tejido n.º	Código de barras del suero	Actividad de FAP (ΔFL/min/mg de proteína)	
			Tejido	Suero
Ovario	1005120	107660	5241	90
Ovario	1005431	108462	9	94
Ovario	1005817	109521	345	96
Ovario	1005896	109675	42	46
Ovario	1006594	111511	588	63
Renal	1005560	108834	29	56
Renal	1009391	118759	553	31
Renal	1009454	118987	471	52
Renal	1009526	119039	53	51
Renal	1009522	119183	101	35
Sarcoma	1005042	107420	309	59
Sarcoma	1005118	107612	21	117
Sarcoma	1005228	107876	1982	69
Sarcoma	1005746	109227	353	61
Sarcoma	1005744	109270	302	68
Uterino	1006279	110607	1840	46
Uterino	1010225	120790	1325	37
Uterino	1008368	116201	780	67
Uterino	1008591	116699	1606	75
Uterino	1009314	118623	230	61

Figura 27 (Continuación)

ID. de la muestra	Actividad de FAP ($\Delta\text{FL}/\text{min}/\text{mg de proteína}$)						
	Tejido pancreático		Plasma				
	Normal	Tumoral	Valor inicial	Lab. pre-op.	Precirugía	Seguimiento posterior inmediato	Seguimiento
NWL-001	333	57		48	46	40	31
M-V-002	74	6700	34		38	35	32
E-G-003			35		38	35	44
HSB-004				40	41		
L-K-005					41		
NAB-006	2181	9873	75		65	71	129
HJM-007	21	16 528	65		69	53	61
BFM-008	105	2726	29		32	21	23
JLG-009			49		43		
DLE-010	216	85	49		42	41	26
JLG-011	223	5400	71		69	71	54
JPP-012			49		50		
JEP-013	22	2713	36	30	27	18	
G-P-014			35		32	20	35
GAA-015	553	319	69		71	43	75
R-H-016			27			22	30
S-S-017	1818		56		55	41	49
RJS-018	1266	1678	32		31	21	
D-T-019			28		22		
S-M-020		7429	32		31	26	48
CEB-021	806	3430	51		50	35	52
KDW-022	340	7083	48		40	41	39
E-P-023	5289	4732	49		45	40	33
R-P-024	1773	6972	61		57	47	44

Figura 28

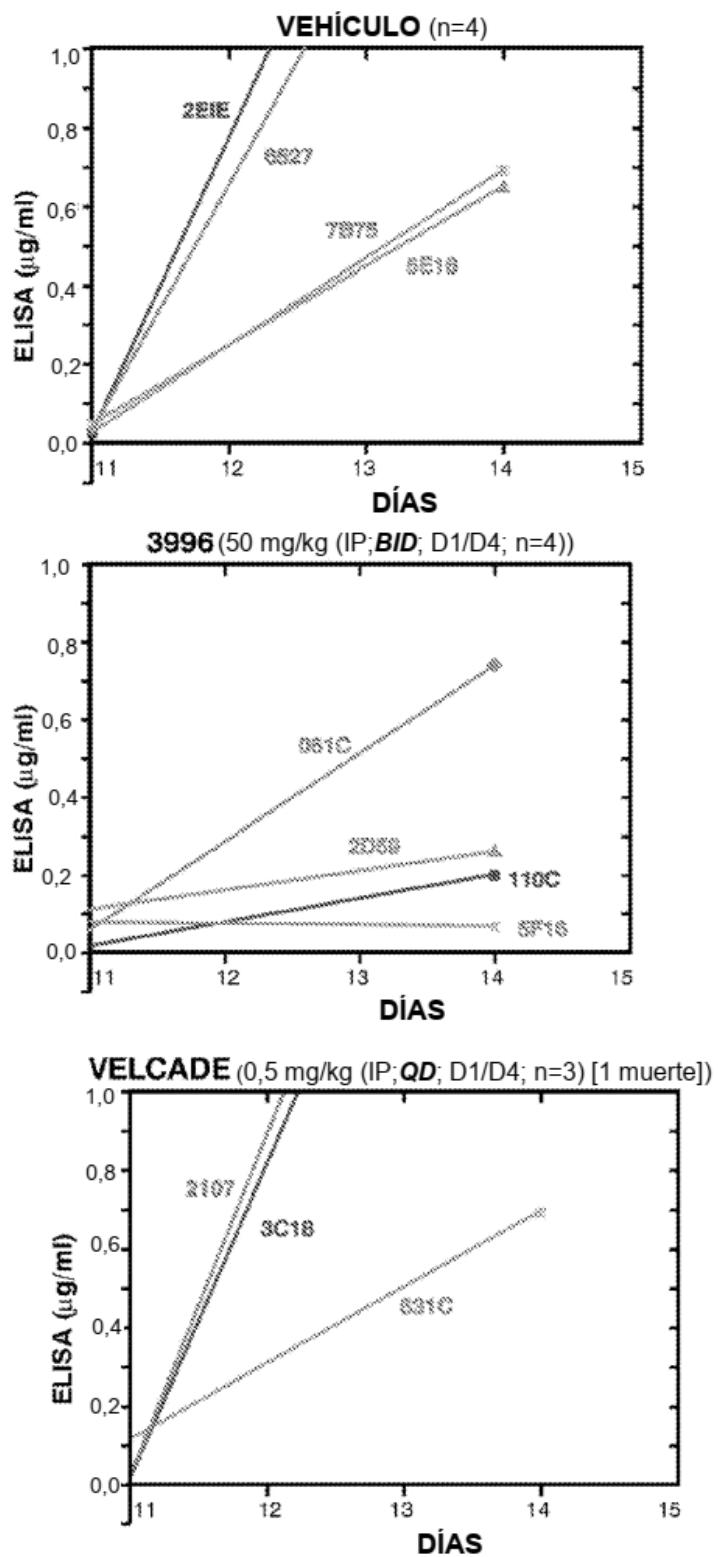


Figura 28 (Continuación)

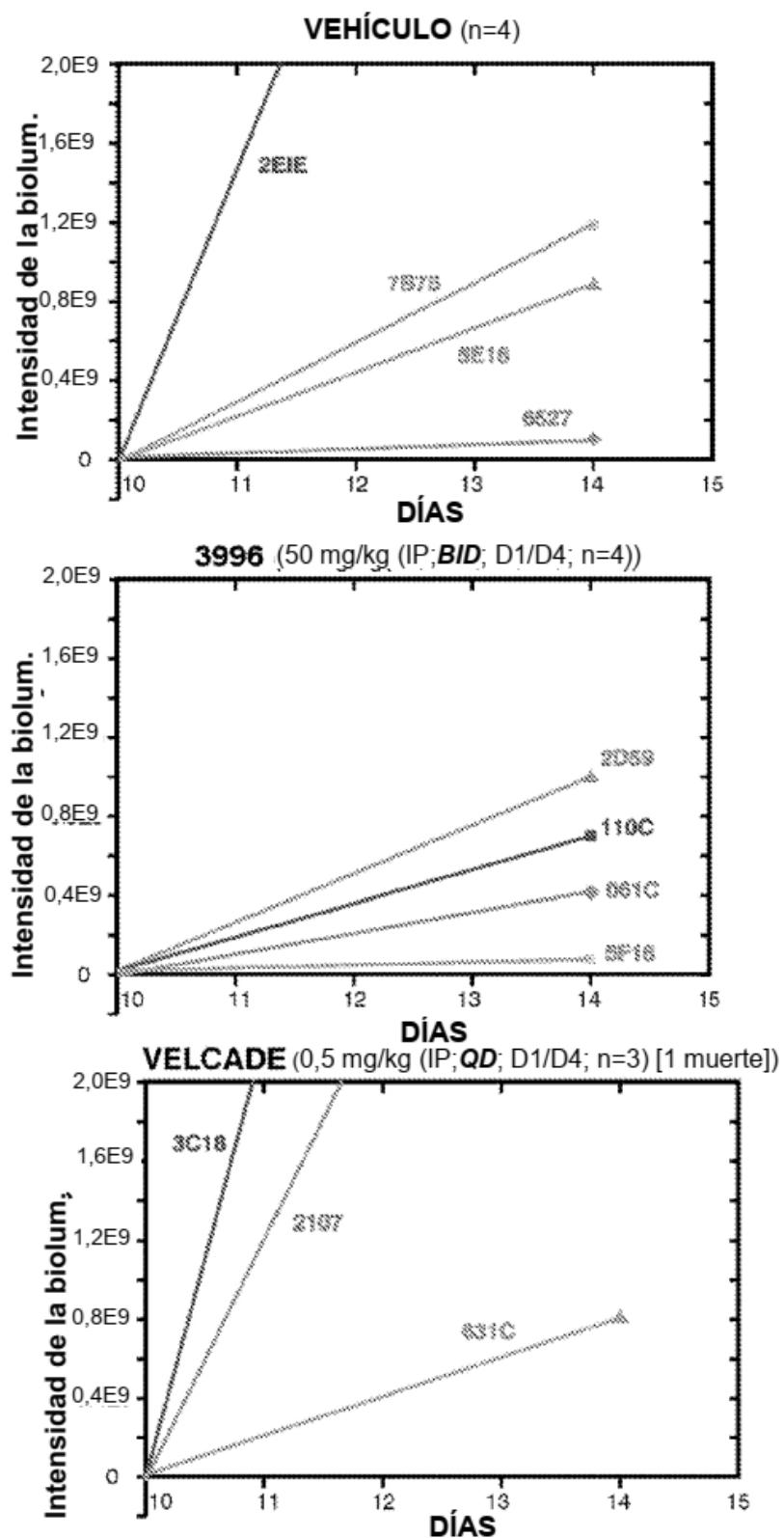


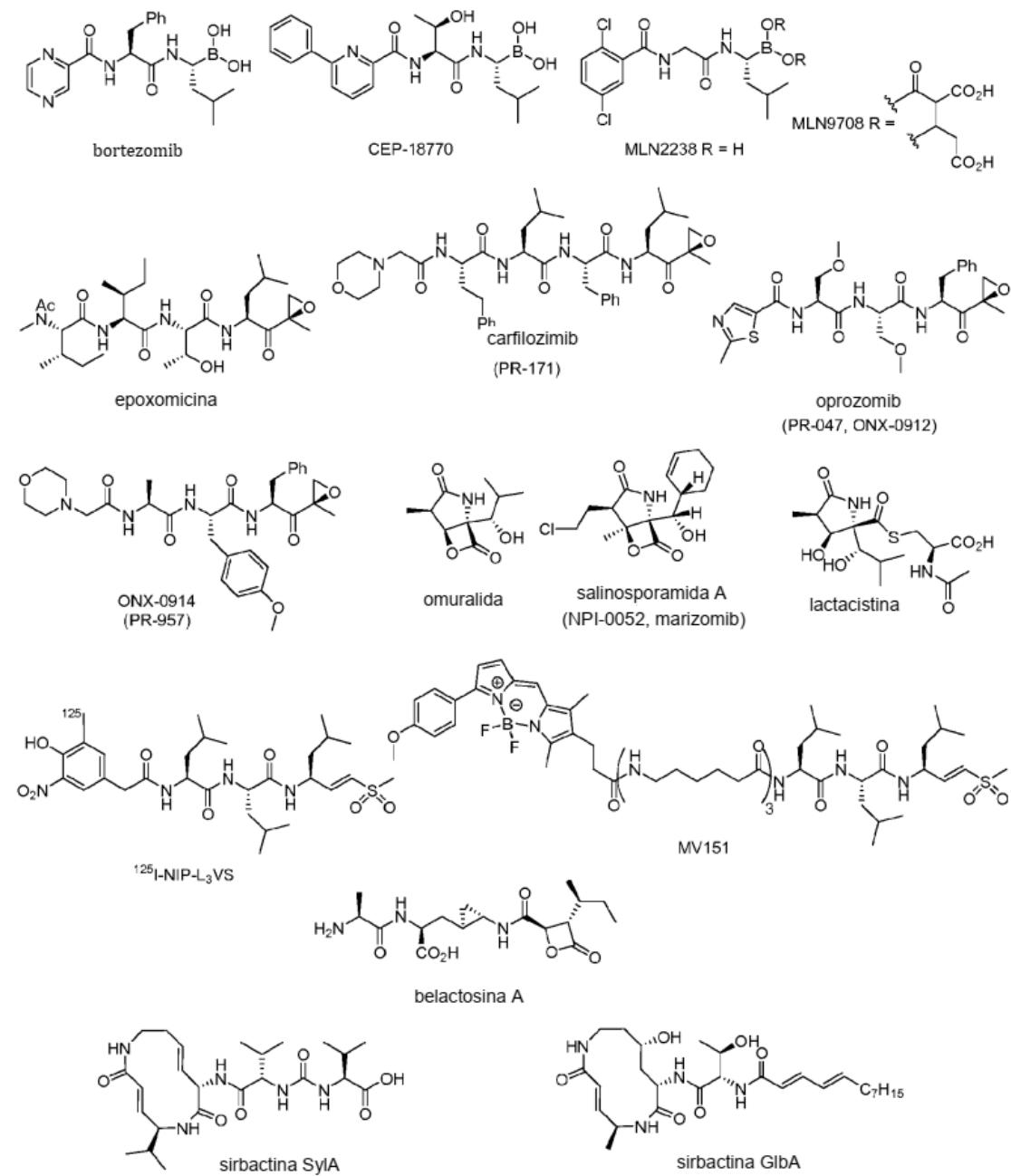
Figura 29

Figura 29 (Continuación)

