

ÖZET**MMP AKTİF VASKÜLER BOZUCU AJANLAR**

Buluş, vasküler bozucu ajanların ön ilaçları ve bu tür bileşiklerin, hedeflenen kanser tedavisinde kullanımına ilişkindir.

İSTEMLER

1. Bir matris metaloproteinaz (MMP) proteolitik bölünme bölgesi içeren bir peptid ile bağlantılı vasküler bir bozucu ajan (VDA) içeren bir bileşik ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; burada VDA'nın, bir antikanser ve tübülün bağlayıcı ajan olması ve MMP proteolitik bölünme bölgesinin, bir amino asit sekansı - Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-P2'-Leu- içermesi, burada P2' ifadesinin bir amino asit olması ve tirozin olmamasıdır.

2. İstem 1'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (I)'e sahip olması



burada

X'in, VDA olması; ve

Y'nin, bir MMP proteolitik bölünme bölgesi içeren peptit olmasıdır.

3. İstem 1 ya da 2'ye göre bir bileşik olup, özelliği; burada VDA'nın, tübülün üzerindeki kolşisin bağlanma bölgesinde tübülün ile etkileşime girmesi ve azademetilkolşisin, kolşisin, azakolşisin, N-metil desasetilkolşisin, desasetilkolşisin, N-asetilkolşisinol-O-fosfat, kolşikinoidler, combretastatinler, fenstatin, podofilotoksinler, steganasinler, amfetinil, stilbenler ya da flavonoidler arasından seçilmesi,

isteğe bağlı olarak burada VDA'nın azademetilkolşisin, kolşisin, azakolşisin, N-metil desasetilkolşisin, desasetilkolşisin arasından seçilmesi ve tercih edilen şekliyle burada VDA'nın azademetilkolşisin olmasıdır.

4. İstem 1 ya da 2'ye göre bir bileşik olup, özelliği; burada VDA'nın tübülün üzerinde, Catharanthus (Vinka) alkaloidleri ile ortak bir bağlama bölgesini paylaşıyor olması; isteğe bağlı olarak burada VDA'nın vinkristin, vinblastin, vinflunin, maytansinoidler, phomopsin A, rizoksin, auristatin, auristatin analogu ya da dolastatin arasından seçilmesidir.

5. İstem 1 ya da 2'ye göre bir bileşik olup, özelliği; burada VDA'nın paklitaksele benzer şekilde stabil mikrotübüllerin oluşumunu desteklemesidir.

6. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada MMP proteolitik bölünme bölgesinin yedi ila on amino asit arasında bir peptid sekansı olmasıdır.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada P2' ifadesinin:

a) polar, değişmemiş amino asitler ve/ veya bazik amino asitler, ya da

b) Asp, Ala, Asn, Pro, Leu ve Arg'den oluşan grup arasından seçilmesidir.

5 8. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada P2' ifadesinin metillenmiş bir amino asit olmasıdır.

9. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada bir başka antikanser ajanının bir MT-MMP proteolitik bölünme bölgesi içeren peptide bağlanmasıdır.

10 10. İstem 9'a göre bir bileşik olup, özelliği; burada antikanser ajanının bir antimetabolit, bir sitotoksik ajan, bir antiproliferatif ajan, 5-florourasil, antrasiklin, doksorubisin, vinka alkaloid, taksan, bir sitotoksik nükleotit, bir biyotoksin, bir radyoterapötik, bir hormonal ajan, kolşisin, azademetilkolşisin, N-metil desasetilkolşisin ya da desasetilkolşisinden oluşan gruptan seçilmesidir.

15 11. İstem 10'a göre bir bileşik olup, özelliği; burada antikanser ajanının doksorubisin olmasıdır.

12. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; ayrıca peptidin spesifik olmayan bir şekilde bozulmasını önleyen MMP proteolitik bölünme bölgesini içeren, peptit üzerinde bir kapatma grubu içermesidir.

20 13. İstem 2 ila 12'den herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (II)'ye sahip olması:



burada c'nin bir kapatma grubu olmasıdır.

25 14. İstem 13'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada c'nin alifatik, aromatik, polisiklik, karbonhidrat ve amino asitlerden oluşan gruptan seçilmesi, isteğe bağlı olarak burada c'nin hidrofilik bir grup olmasıdır.

15. İstem 13 ya da 14'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada c'nin formül (c)_n ile temsil edilmesi, burada n'nin 1 ila 5 arasında bir tam sayı olması, isteğe bağlı olarak burada c'nin doğal olmayan bir amino asit olması ve n'nin 3 olmasıdır.

16. İstem 2 ila 13'ten herhangi birine göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (III)'e sahip olması:



burada a'nın X ile doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili bir bağlayıcı olmasıdır.

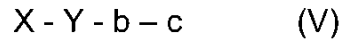
5 **17.** İstem 16'ya göre bir bileşik olup, özelliği; burada bağlayıcının bir tekli amino asit ya da amino asit sekansı olmasıdır.

18. İstem 16'ya göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (IV)'e sahip olması:



10 burada c'nin istem 13'te tanımlandığı gibi olmasıdır.

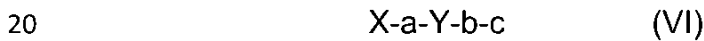
19. İstem 13'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (V)'e sahip olması:



15 burada b'nin, Y'ye doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanmış bir aralayıcı grup olmasıdır.

20. İstem 19'a göre bir bileşik olup, özelliği; burada aralayıcının bir tekli amino asit, bir amino asit sekansı ve bir süksinil grubundan oluşan gruptan seçilmesidir.

21. İstem 18'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (VI)'ya sahip olması:



burada b'nin Y'ye doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanmış bir aralayıcı grup olmasıdır.

22. İstem 2 ila 21'den herhangi birinde ileri sürüldüğü gibi bir bileşik olup, özelliği; burada bileşiğin formül (VII)'ye sahip olması:



25 burada Z'nin bir antikanser ajanı olmasıdır.

23. İstem 22'ye göre bir bileşik olup, özelliği; burada Z'nin bir vasküler bozucu ajan, bir antimetabolit, bir sitotoksik ajan, bir biyotoksin, bir radyoterapötik ve bir hormonal ajandan oluşan gruptan seçilmesi ve tercih edilen şekliyle burada Z'nin sitotoksik ajan doksorubisin olmasıdır.

24. İstem 22 ya da 23'e göre bir bileşik olup, özelliği; burada X'in azademetilkolşisin, kolşisin, azakolşisin, N-metil desasetilkolşisin, desasetilkolşisin arasından seçilmesidir.

25. İstem 22'ye göre bir bileşik olup, özelliği; burada X ve Z'nin azademetilkolşisin, kolşisin, azakolşisin, N-metil desasetilkolşisin, desasetilkolşisin arasından seçilmesidir.

26. Önceki istemlerden herhangi birine göre bir bileşik ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olup, özelliği; ilaçta kullanıma yönelik olmasıdır.

27. Bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; istem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ve en az bir ilave farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı madde, seyreltici ya da taşıyıcı içermesidir.

28. Bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; istem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ve başka bir terapötik ajan içermesi, isteğe bağlı olarak burada başka bir terapötik ajanın sisplatin, karboplatin, siklofosfamid, melfalan, karmustin, metotreksat, 5-florourasil, sitarabin, merkaptopurin, daunorubisin, doksorubisin, epirubisin, vinblastin, vinkristin, daktinomisin C, taksol, L-asparaginaz, G-CSF, etoposid, kolşisin, deferoksamin mesilat ya da kamptotesin arasından seçilmesidir.

29. İstem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ya da istem 27 ya da 28'e göre bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; kanser tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

30. İstem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ya da istem 27 ya da 28'e göre bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; bir enflamatuar bozukluğun tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

31. İstem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ya da istem 27 ya da 28'e göre bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; kalp yetmezliği tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

32. İstem 1-25'ten herhangi birine göre bir bileşik ya da istem 27 ya da 28'e göre bir farmasötik formülasyon olup, özelliği; bir yaranın tedavisinde kullanıma yönelik olmasıdır.

TARİFNAME

MMP AKTİF VASKÜLER BOZUCU AJANLAR

Buluşun Alanı

Mevcut buluş, vasküler bozucu ajanların ön ilaçları ve bu tür bileşiklerin, hedeflenen
5 kanser tedavisinde kullanımına ilişkindir.

Buluşun Arkaplanı

Tümör vaskülatürünü kanser kemoterapilerine moleküler bir yaklaşım olarak
hedeflemek en yüksek bilimsel önceliklerden biri haline gelmektedir. İki ilaç modeli
ortaya çıkmaktadır, yani biri tümörde yeni kan damarı oluşumunu engelleyen
10 (antianjiyogenez) ve biri vasküler yıkımı hedeflemektedir.

Tümör vaskülatürünün küçük bir bölümünün bile bozulmasının, çok sayıda tümör
hücresinin hayatta kalmasını desteklemek için tek bir kan damarı sorumlu olduğundan,
geniş aralıkta tümör ölümünü ve metastazın geriliğini indüklediği gösterilmiştir.
Damarların ana bileşenini oluşturan endotel hücreleri, hareketlilik, invazyon,
15 bağlanma, hizalama ve proliferasyonları için tübülün hücre iskeletine büyük ölçüde
bağımlıdır (Denekamp, J, Br J Cancer, 45, 136-139 (1982)). Endotelyal mikrotübül
ağını bozan ajanlar bu nedenle tümör kan akışında hızlı bir çökmeye ve uzun süreli
damar kapanmasına neden olacak ve böylece geniş tümör hücresi nekrozu ile
sonuçlanacaktır (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Lippert JW, Bioorg
20 Med Chem, 15, 605-615 (2007)).

En etkili kanser terapötik ilaç sınıflarından biri, karakteristik olarak iyi bir in vitro hücre
sitotoksitesine sahip olan ancak genellikle in vivo normal dokular üzerinde tümör
öldürmek için zayıf bir özgüllük sergileyen vasküler bozucu ajanlardır (VDA'lar). Ayrıca,
tübülün bağlayıcı ajanlar gibi birçok VDA suda çözünmez ve klinikte değerlendirilmeden
25 önce formülasyon gerektirmektedir. Mevcut buluş yukarıda belirtilen problemlere
değinmeyi amaçlamaktadır.

Kolşisin ve analogları, tübülünün bağlanması ve mikrotübül depolimerizasyonunun
indüklenmesinin doğrudan bir sonucu olarak (Chaudri et al., J Mol Biol, 303, 679-692
(2000)), tümörlerde hemorajiye ve ardından geniş nekroza neden olan güçlü
30 VDA'lardır (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005)). Bununla birlikte, kolşisin,
yüksek düzeyde toksisite ve bunun sonucunda çok dar terapötik indeks nedeniyle klinik

olarak uygulanabilir bir antikanser terapötik olarak gerçek bir önem göstermemiştir. (Tozer et al., Nat Rev Cancer, 5, 423-435 (2005); Quinn et al., J Med Chem, 24, 636-639 (1981)). Bu nedenle, seçici olarak bir tümöre kolşisin gibi bir VDA'yı hedefleyebilmek arzu edilecektir.

- 5 Mevcut buluş sahipleri, potansiyel kanser önleyici ajanların, özellikle de damar bozucu ajanların sistemik uygulamasının toksik etkisinin üstesinden gelmek için bir sistem geliştirmiştir.

Buluşun Açıklamaları

- 10 Mevcut buluş, en azından kısmen, tümör vaskülatüründe kolşisin gibi vasküler bir bozucu ajanın seçici olarak salınmasına izin veren bir proteolitik bölünme bölgesinin seçilmesine dayanmaktadır.

- 15 Buluşun birinci yönüne göre, bir matris metaloproteinaz (MMP) proteolitik bölünme bölgesi içeren bir peptid ile ilişkili vasküler bir bozucu ajan (VDA) içeren bir bileşik ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu sağlanmakta olup, burada VDA, bir anti-kanser ve tübülün bağlayıcı ajandır ve MMP proteolitik bölünme bölgesi, bir amino asit sekansı - Arg-Ser-Cit-Gly-Hof-P2'-Leu-içerir, burada P2', bir amino asittir ve tirozin değildir. Buluş bağlamında "ilişkili" teriminin, kimyasal çapraz bağlama ya da peptit bağı bağlantısı dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere genel olarak kovalent olan tüm doğrudan ve dolaylı bağlama araçlarını içermesi amaçlanmaktadır.

- 20 Buluşa ait bileşikler, tuz formunda olabilmektedir. Özellikle, tuzlar farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar olabilir. Mevcut tarifnamenin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları, bazik ya da asidik bir kısmı içeren ana bileşikten, geleneksel kimyasal yöntemlerle sentezlenebilmektedir. Genel olarak, bu tür tuzlar, bu bileşiklerin serbest asit ya da baz formlarının, uygun baz ya da asitin stoikiometrik bir miktarını, suda ya da organik bir çözücü içerisinde ya da ikisinin bir karışımı içerisinde reaksiyona sokulması suretiyle hazırlanabilmektedir; genellikle eter, etil asetat, etanol, izopropanol ya da asetonitril gibi sulu olmayan ortamlar tercih edilmektedir. Uygun tuzların listeleri Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, bkz. ayrıca Stahl et al, Eds, "Handbook of Pharmaceutical
- 25 Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002'da bulunmaktadır.

Bu nedenle tarifname, ana bileşiğin, bunun asit ya da baz tuzları yapılarak değiştirildiği, açıklanan bileşiklerin farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlarını içermektedir. Örnek olarak, konvansiyonel toksik olmayan tuzlar ya da örnek olarak inorganik ya da organik asitlerden ya da bazlardan oluşan kuaterner amonyum tuzları. Bu tür asit ilaveli tuzların örnekleri arasında asetat, adipat, aljinat, aspartat, benzoat, benzensülfonat, bisülfat, bütirat, sitrat, kamforat, kafur sülfonat, siklopentanepropionat, diglukonat, dodesilsülfat, etansülfonat, fumarat, glukheptanoat, gliserofosfat, hemisülfat, heptanoat, heksanoat, hidroklorür, hidrobromür, hidroiyodid, 2-hidroksietansülfonat, laktat, maleat, metansülfonat, 2-naftalensülfonat, nikotinat, oksalat, pamoat, pektinat, persülfat, 3-fenilpropionat, pikrat, pivalat, propionat, süksinat, tartrat, tosilat ve undekanoat bulunmaktadır. Baz tuzları arasında amonyum tuzları, sodyum ve potasyum tuzları gibi alkali metal tuzları, kalsiyum ve magnezyum tuzları gibi toprak alkali metal tuzları, disikloheksilamin tuzları, N-metil-D-glukamin gibi organik bazlara sahip tuzlar ve arginin, lisin ve benzeri gibi amino asitlere sahip tuzlar bulunmaktadır. Ayrıca, bazik azot içeren gruplar metil, etil, propil ve bütül klorür, bromitler ve iyodürler gibi düşük alkil halojenürler; dimetil, dietil, dibütül gibi dialkil sülfatlar; ve diamil sülfatlar, desil, loril, miristil ve stearyl klorürler gibi uzun zincirli halojenürler, bromitler ve iyodürler, benzil ve fenetil bromürler ve diğerleri gibi aralkil halojenürler gibi maddelerle kuaternize edilebilmektedir.

20 Tercih edilen bir yönüyle buluş, formülün (I) bir bileşiğini sağlamaktadır



burada

X, bir vasküler bozucu ajandır (VDA);

25 Y, bir matris metaloproteinaz (MMP) proteolitik bölünme bölgesi içeren bir peptittir; istemlerde tanımlandığı gibi.

Buluşa göre bileşikler, aşırı eksprese edilmiş MMP'ler tarafından tümör ortamı içinde aktif ve güçlü bir VDA'ya dönüştürülen ön ilaçlar sunmaktadır. Buluşa ait bir ön ilacın tümör seçici aktivasyonu, tümör seviyelerini artırır ve VDA'nın ve isteğe bağlı olarak ilave etken maddelerin sistemik seviyelerini azaltır, böylece terapötik endekslerini ve etkinliklerini büyük ölçüde artırır.

VDA'lar çok halkalı bir sistemi, örnek olarak kaynaşmış ya da kaynaşmamış bisiklik ya da trisiklik bir halka sistemini içermektedir. Bu nedenle X, tümör kan damarlarını bağlayabilen ve bozabilecek bir VDA'nın çoklu halka sistemini içermektedir.

VDA'lar üç sınıfa ayrılabilir:

- 5 (i) tübülün üzerindeki kolşisin bağlama bölgesinde tübülün ile etkileşime giren bileşikler;
- (ii) tübülün üzerinde ortak bir bağlama bölgesini Catharanthus (Vinca) alkaloidleriyle paylaşan bileşikler;

(iii) Pasifik porsuklarının kabuğundan izole edilmiş yeni bir taksan diterpenoidi olan paklitaksele benzer şekilde stabil mikrotübüllerin oluşumunu destekleyen bileşikler.

- 10 Buluşun tercih edilen bir yönünde VDA, bir tübülün bağlayıcı ajandır. Tübülün bağlama ajanı, i) kolşisin bağlama bölgesinde tübülün ile etkileşime girenleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, kolşisin (N-asetilkolşinol-O-fosfat (ZD6126) gibi kolşisin analogları ve ABT- 751 dahil), kolşikinoidler, kombinetastatinler fenstatin, podofilotoksinler, steganasinler, amfetin ve stilbenler; ve ii) tübülünün Vinca bağlanma bölgesi ile
- 15 etkileşime girenleri: bunlarla sınırlı olmamak üzere, vinkristin, vinblastin, vinflunin, maytansinoidler, phoopson A, rhizoksin, auristatin (bunların analogları dahil) ve dolastatini içeren gruptan seçilebilmektedir.

Buluşun tercih edilen bir yönünde, VDA, tübülün içindeki kolşisin bağlanma bölgesi ile etkileşime giren bir tübülün bağlama ajanıdır. Buluşun bir uygulamasında VDA, kolşisin ya da bunun bir analogu/ türevidir. Kolşisin analogları ya da türevleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, azademetilkolşisin, azakolşisin, N-metil desasetilkolşisin, desasetilkolşisini içerebilir.

- 20 Buluşun bir uygulamasında VDA, peptit olmayan bir VDA'dır. Örnek olarak, buluşa göre bir VDA, auristatin olmayan bir tübülün bağlayıcı ajan ya da bunun bir türevi
- 25 olabilir.

Alternatif olarak, VDA, bunlarla sınırlı olmamak üzere kombinetastatinler (örnek olarak, kombinetastatin A-4-3-O-fosfat), auristatin (analogları dahil), dolastatin; ve flavenoidler (örnek olarak, tümör nekroz faktör α ve 5,6-dimetil-ksantenon-4-asetik asit (DMXAA), flavon asetik asit (FAA)) olabilir. Dolayısıyla, buluşun alternatif bir uygulamasında VDA,

- 30 bir combretastatindir.

MMP ile MMP bölünme bölgesindeki proteolitik bölünme, VDA'yı ve MMP bölünme bölgesi ile bağlantılı herhangi bir etken maddeyi aktif formda serbest bırakmaktadır.

MMP ailesi sekiz yapısal gruba ayrılmıştır: beşi salgılanmış MMP'ler ve üçü membran tipi MMP'lerdir (MT-MMP'ler). MT-MMP'ler hücre yüzeyinde lokalize olmaktadır.

- 5 Buluşun tercih edilen bir yönünde, MMP zar tipidir (MT-MMP). Dolayısıyla buluş, Y'nin bir MT-MMP tarafından seçici olarak bölünen bir peptid sekansı içerdiği formüle (I) ait bir bileşik sunmaktadır.

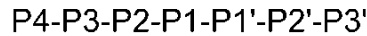
MT-MMP'ler, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilebilir

- 10 (i) tip I transmembran tip MT-MMP'ler örnek olarak MMP-14 (MT1- MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP) ve MMP-24 (MT5-MMP);
- (ii) MT-MMP'nin glikosil fosfatidilinositol (GPI)-bağlı yapısal grubu örnek olarak MMP-17 (MT4-MMP) ve MMP-25 (MT6-MMP);
- (iii) tip II transmembran sınıfı örnek olarak MMP-23.

- 15 MMP ayrılma bölgesi, bir MMP ile ayrılabilir olan bir amid bağına, tipik olarak bir peptid bağına sahip olan bir peptid sekansını içerir. Tercih edilen şekliyle Y, 7 ila yirmi amino asit içeren bir peptid sekansıdır. Amino asitler D-amino asitleri ya da L-amino asitleri olabilir.

- 20 Tercih edilen şekliyle, MMP proteolitik bölünme bölgesi, P1 ve P1' arasındaki bölünmenin seçici olarak bir MT-MMP, örnek olarak MT-MMP14 ile gerçekleşeceği şekilde bir MT-MMP spesifik bölünme bölgesidir.

MMP proteolitik bölünme bölgesi aşağıdaki sekansı içerir:



burada P1' ila P3' ve P1 ila P4, istemlerde tanımlandığı gibidir ve burada proteolitik bölünme, P1' ve P1 kalıntıları arasında meydana gelmektedir.

- 25 Tarifname, seçici olarak bir MT-MMP ile bölünen bir peptid sekansını içeren bir MMP bölünme bölgesini sağlamaktadır. Bu tarifname Y'nin P1'in hidrofobik bir amino asit olduğu bir peptid sekansını içerdiği bir formül (I) bileşiği sağlamaktadır. Burada kullanıldığı şekliyle "hidrofobik" terimi, -1,10'a eşit ya da daha büyük bir hidrofobikliğe sahip amino asitleri ve/veya Fauchere and Pliska Eur. J. Med Chem. 10:39 (1983)'de
- 30 tarif edildiği gibi 0'a eşit ya da daha büyük bir net yüke sahip amino asitleri ifade

etmektedir. Hidrofobik ya da polar olmayan bir amino asit ayrıca, fizyolojik pH'da yüklenmemiş olan bir yan zincire sahip olan bir amino asit anlamına da gelebilir, polar değildir ve genellikle sulu çözelti ile itilir. Bir hidrofobik amino asit, lösin, fenilalanin, prolin, alanin, triptofan, valin, izölösün, metiyonin, tirozin ve treonin içeren gruptan seçilebilir. P1', bir alifatik yan zincire sahip bir amino asit olabilir. Alternatif olarak P', aromatik bir yan zincire sahip bir amino asit olabilir. P1', doğal olmayan hidrofobik amino asitleri de içerebilir ve buluşun bir uygulamasında homofenilalanindir (Hof).

Bu tarifname, Y'nin, P1'in bir polar amino asit olduğu bir peptid sekansı içerdiği, örnek olarak Asparagin (N), Serin (S) ya da Glisinden (G) oluşan gruptan seçilen bir amino asit olduğu bir formül (I) bileşiği sağlamaktadır. Bölünme bölgesinde bir MT-MMP için seçiciliği arttırmak için, genellikle P1 prolin değildir. Dolayısıyla P1, prolin hariç bir amino asittir. Buluşun bir uygulamasında P1, glisindir.

Bu tarifname, Y'nin, P2' 'nin, polar, yüklenmemiş amino asitler ve/ veya örnek olarak Arginin (R), Alanin (A), Lösin (L), Aspartik Asit (D), Treonin (T), Serin (S) ve Prolin (P) de dahil olmak üzere bazik amino asitlerden oluşan gruptan seçildiği bir peptid sekansı içerdiği bir formül (I) bileşiği sağlamaktadır. Bölünme bölgesinde bir MT-MMP için seçiciliği arttırmak için, P2' bir metillenmiş amino asit olabilir.

Mevcut buluş sahipleri MT-MMP olmayan bölünmelerin, örnek olarak MMP2'nin, P2' tirozin olduğunda hem P1'-P2' hem de P2'-P3' bölgelerinde gerçekleştiğini bulmuşlardır. Dolayısıyla, buluşun bir uygulamasında P2', tirozin değildir.

Burada kullanıldığı gibi, P3' kalıntısı herhangi bir amino asidi içerebilir. Buluşun bir uygulamasında P3', Lösin (L). Mevcut olduğunda, P4' kalıntısı, nükleofilik bir yan zincire sahip bir amino asidi içerebilir; örnek olarak, Lizin (L), Sistein (C), Serin (S), Tirozin (Y), Treonin (T), Glutamik asit (E), ya da Aspartik asit (D).

Bu tarifname, Y'nin asidik (örnek olarak glutamik asit), bazik, hidrofobik ya da polar amino asitlerden oluşan gruptan seçildiği bir peptid sekansı içerdiği, formülün (I) bir bileşiğini sağlamaktadır. P2 ayrıca doğal olmayan hidrofobik amino asitleri, örnek olarak sitrülini (Cit) içerebilmektedir. Bölünme bölgesinde bir MT-MMP için seçiciliği arttırmak için, P2'nin prolin olmaması tercih edilir. Bu nedenle P2, prolin hariç bir amino asittir.

Bu tarifname, Y'nin, P3'ün örnek olarak Glisin (G), Alanin (A), Serin (S), Lösin (L), İzölösün (I) ve Treoninden (T) oluşan gruptan seçilen bir polar amino asit olduğu bir

peptid sekansı içerdiği bir formül (I) bileşiği sağlamaktadır. P3'ün prolin olmaması tercih edilir. Buluşun bir uygulamasında P3 serindir.

Bu tarifname, Y'nin, P4'ün önemli bir yan zincir içeren bir amino asit olduğu bir peptid sekansı içerdiği, örnek olarak Arginin (R) ve Lizinden (K) oluşan gruptan seçilen amino asitleri içeren yan zincirinde bazik bir gruba sahip olan bir amino asidi içeren bir formül (I) bileşiği sağlamaktadır. Bölünme bölgesinde bir MT-MMP için seçiciliği arttırmak için, P4'ün arginin olması tercih edilir. Bu nedenle, buluşun bir uygulamasında P4 arginindir.

Buluş bir formül (I) bileşiği sağlayabilir olup, burada bölünme bölgesi, Y, sekanstaki bir ya da daha fazla amino asidin hidrofilikliğini arttırmak ve bu şekilde çözünürlük artırmak için glikosile edildiği bir amino asit sekansı içermektedir. Kalıntıların glikosilasyonu aşağıdaki gibi olabilir:

Sekanstaki amino asitlerin serin, treonin, tirozin yan zincirleri boyunca O-glikosilasyonu;

Sekanstaki amino asitlerin aspartik asit, glutamik asit yan zincirleri boyunca N-glikosilasyonu,; ve/ veya

Sekanstaki amino asitlerin sistein boyunca S-glikosilasyonu.

Buluş bir formül (I) bileşiği sağlayabilir olup, burada bölünme bölgesi, Y, sekanstaki bir ya da daha fazla amino asidin hidrofilikliğini arttırmak ve bu şekilde çözünürlük artırmak için fosforlanmış bir amino asit sekansı içermektedir. Uygun amino asitler, serin, treonin, tirozindir. Buluşun bir uygulamasında, Y'nin P2' 'nin fosforlanmış bir peptid sekansını içerdiği bir formül (I) bileşiği sağlanmaktadır. Buluşun bir başka uygulamasında, bir formül (I) bileşiği sağlanmış olup, burada Y, P3 ve isteğe bağlı olarak P2' 'nin fosforlanmış amino asit olduğu bir peptid sekansını içermektedir.

Buluş ayrıca bir formül (I) bileşiği sağlamakta olup, burada bölünme bölgesi, Y, örnek olarak bir amid bağının olefinik bağlarla değiştirildiği bir peptid analogu, N α - ve/ veya C α -metillenmiş amino asitler, doğal olmayan amino asitler ve teknikte bilinen diğer yaklaşımları içermektedir. Bu gibi peptidomimetik yaklaşımlar teknikte, bölünmenin spesifikliğini arttırmak için kullanılır, böylece istenmeyen enzimatik hidrolizin azaltılmasına hizmet eder. Buluşun bir uygulamasında Y, amino asit sekansı içindeki bir ya da daha fazla amid bağının, N α ve/ veya C α - metillenmiş amino asitlerle değiştirildiği bir analog içerir.

Bir uygulamada buluş, bir formül (I) bileşiği içeriyor olup, burada Y, bir C-terminal bölgesi ve bir N-terminal bölgesi içerir ve burada adı geçen C-terminal bölgesi, doğrudan ya da dolaylı olarak X'e bağlanır ve adı geçen N-terminal bölgesi, aşağıda tarif edildiği gibi örnek olarak c ya da Z gibi başka bir kısma doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanır.

Buluşun alternatif bir uygulaması, bir formül (I) bileşiği içeriyor olup, burada Y, bir C-terminal bölgesi ve bir N-terminal bölgesi içerir ve burada adı geçen N-terminal bölgesi, doğrudan ya da dolaylı olarak X'e bağlanır ve adı geçen C-terminal bölgesi, aşağıda tarif edildiği gibi örnek olarak c ya da Z gibi başka bir kısma doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanır.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, X'in kolşisin ya da bunun bir analogu olduğu ve Y'nin burada tanımlandığı gibi amino asit sekansını içeren bir peptid olduğu bir formül (I) bileşiği sağlanmıştır.

Buluşun tercih edilen bir yönünde, formüle (II) ait bir bileşik sağlanmaktadır

X-Y-c (II)

burada X ve Y burada tanımlandığı gibidir;

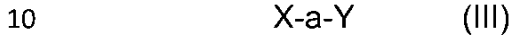
c bir uç grup ya da "kapatma grubu" dur. Kapatma grupları, örnek olarak, MMP'ler dışındaki enzimler tarafından peptidin spesifik olmayan bir şekilde bozulmasını önlemek için farmasötik kullanımdaki bir peptid zincirini kapatmak için kullanılabilir. c, bunlarla sınırlı olmamak üzere, alifatikler, aromatikler, polisiklikler, karbonhidratlar (örnek olarak basit şekerler), amino asitleri (D-amino asitler dahil) içeren gruptan seçilen bir bloke edici grup olarak görev yapan N- ya da C-terminalinde uygun herhangi bir kısmı içerebilir. Çözünürlüğü arttırmak için, c yukarıda bahsedilen taşıyıcı ilave polar fonksiyonel grupların herhangi biri (örnek olarak asitler, aminler, alkoller, fenoller) gibi bir hidrofilik grup olabilir.

c, n'nin 1 ila 5 arasında bir tam sayı olduğu formül $(c)_n$ ile temsil edilebilir. Buluşun bir uygulamasında c, $(c)_n$ 'i temsil ediyor olup, burada c, bir amino asittir (örnek olarak, doğal olmayan bir amino asit) ve n, 3'tür. Buluşun bir uygulamasında n, 3 olduğunda, c, serin değildir. Başka bir uygulamada c, serin ya da kinik asit değildir.

Mevcut buluş ayrıca bir "bağlayıcı" sağlayabilir. Bağlayıcı, Y'nin C ve / veya N terminallerinde sağlanabilir. Tercih edilen şekliyle bağlayıcı, Y'nin C terminalinde

sağlanabilir. Tercih edilen şekliyle bağlayıcı, Y'nin amino asit sekansı ile sürekliir. Bağlayıcı, Y ile ilişkili olan ve kimyasal olarak, enzimatik olarak çıkarılabilecek ya da kendiliğinden ayrışabilen herhangi bir kısmı içerebilir. Bağlayıcı, tek bir amino asitten (örnek olarak, tirozin) oluşabilir ya da bir amino asit sekansı içerebilir. Bağlayıcının bir amino asit sekansı içerdiiği durumda, sekans, Y'de bir MMP ile ayrılmayı kolaylaştırabilen bir hidrofilik bölge sağlayabilir. Uygun amino asitlerin, yani serin, treonin ve tirozin sekansındaki O-glikosilasyonu hidrofilikliğı ve bu gibi çözünürlükleri artırabilir.

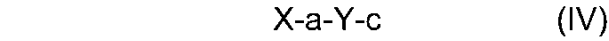
Böylece, buluşun tercih edilen bir yönünde, formüle (III) ait bir bileşik sağlanmaktadır



burada X ve Y burada tanımlandığı gibidir; ve

a, bağlayıcının doğrudan ya da dolaylı olarak X ile bağlantılı olduğu bir bağlayıcıdır.

Bir uygulamada, buluş bir formüle (IV) ait bileşiiği sağlamaktadır



burada X, a, Y ve c, burada tanımlandığı gibidir.

Buluşun daha da tercih edilen bir yönünde, burada tarif edilen bağlayıcı ile aynı ya da farklı olabilen bir "aralayıcı" bulunmaktadır. Aralayıcı, Y'nin C ve/ veya N terminalinde sağlanabilmektedir. Tercih edilen şekliyle, aralayıcı Y'nin N terminalinde bulunur ve sentez sırasında c'nin istenmeyen şekilde uzaklaştırılmasını önler. Aralayıcı, doğrudan ya da dolaylı olarak Y ile ilişkili olabilir. Aralayıcı, herhangi bir tekli amino asidi (örnek olarak β -alanin), amino asit sekansını ya da bir süksinil grubunu içerebilir. Bu nedenle buluş, tercih edilen şekliyle formüle (V) ait bir bileşiiği sağlamaktadır:



buradaki X, Y ve c, burada tanımlandığı gibidir;

25 b burada tanımlandığı gibi bir aralayıcıdır.

Başka bir uygulamada, buluş formüle (VI) ait bir bileşiiği sağlamaktadır



burada X, Y, a, b ve c burada tanımlandığı gibidir.

Buluşun bir uygulamasında, X'in kolşisin (ya da bunun bir analogu) olduğu bir formül (VI) bileşiği sağlanmış olup, Y, burada tanımlanan amino asit sekansını içeren bir peptittir, a, tirozindir ve b, alanindir.

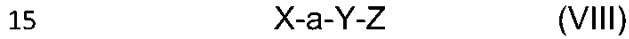
5 Buluşun ikinci bir yönünde, formüle (VII) sahip bir bileşik ya da bunun farmasötik açıdan kabul gören bir tuzu sağlanmaktadır



buradaki X ve Y, burada tanımlandığı gibidir; Z bir antikanser ajanıdır.

10 Tercih edilen şekliyle Z, X ile aynı ya da farklı olabilen, bir antimetabolit (örnek olarak 5-florourasil), bir sitotoksik ya da anti-proliferatif ajan (örnek olarak antrasiklin (örnek olarak, doksorubisin), vinka alkaloid, taksan, sitotoksik nükleotit), bir biyotoksin, bir radyoterapötik, bir hormonal ajan ya da sitotoksik, sitostatik, anti-anjiyojenik ya da vasküler bozucu bir etkiye neden olduğu bilinen herhangi bir doğal ürün ya da ajan içeren vasküler bir bozucu ajandan oluşan gruptan seçilen bir antikanser ajandır.

Buluşun tercih edilen bir yönünde, formüle (VIII) ait bir bileşik sağlanmıştır.



burada X, a, Y, b ve Z, burada tanımlandığı gibidir.

Buluşun yine tercih edilen bir yönünde, formüle (IX) ait bir bileşik sağlanmıştır.



20 burada X, a, Y, b ve Z, burada tanımlandığı gibidir. Buluşun bu yönünde b aralayıcısının amacı, Z'nin serbest bir amin taşıdığı (örnek olarak Z'nin doksorubisin olduğu) bir bileşik Z'nin bağlanmasına izin vermek için Y'nin N-terminal aminini bir karboksilik aside dönüştürmektir. Z'nin serbest bir karboksilik asit taşıdığı durumlarda, b gerekli değildir.

25 Buluşun tercih edilen bir yönünde, X'in kolşisin ya da bunun bir türevi, örnek olarak azademetilkolşisin ve Z'nin örnek olarak doksorubisin gibi bir siktotoksik madde olduğu bir formül (VII) bileşiği sağlanmaktadır. Tercih edilen şekliyle hala Y, burada tanımlandığı gibi amino asit sekansını içeren bir peptittir.

30 Buluşun tercih edilen başka bir yönünde, X ve Z'nin kolşisin ya da bunun bir analogu ya da türevi arasından seçildiği bir formül (VII) bileşiği sağlanmaktadır. Aynı zamanda, X ve Z'nin ikisinin de kolşisin olabileceği bir buluş bileşiği de sağlanmıştır. Bu açıdan, Y, burada tanımlandığı gibi amino asit sekansını içeren bir peptid olabilir.

Buluşa göre bileşikler, örnek olarak bir polimerik desteğe tutturulmuş katı faz ya da örnek olarak bir bağlayıcı ajan varlığında ya da bir yakınsak sentez kullanılarak çözelti faz sentezi ile hazırlanabilir.

Ayrıca burada açıklanan, buluşa göre bir bileşiğin hazırlanmasına yönelik bir işlem olup, şu adımları içerir

i) X'e bağlı katı bir destek sağlamak;

ii) isteğe bağlı olarak bir a bağlayıcıyı X'in C ya da N terminaline bağlamak;

iii) MMP proteolitik bölünme sekansını içeren peptid sekansını Y sağlamak için adım adım X'in C ya da N terminaline amino asit kalıntılarının ya da X'e eklenmiş olan bağlayıcının bağlanması;

iii) isteğe bağlı olarak bir formüle (II) ya da (IV) ait bileşiği sağlamak için bir kapatma grubu c'yi Y'nin ilgili C ya da N terminaline bağlamak.

Bir işlemde, katı destek, herhangi bir polistiren bazlı ya da PEG bazlı reçine gibi herhangi bir polimerik destek, örnek olarak tritil bazlı reçinelerdir. Bağlayıcı, bir süksinat ya da malonat türevi, örnek olarak süksinik anhidrit olabilir.

Buluşa göre bir bileşik hazırlamak için yine bir başka işlem olup, şu adımları içermektedir

i) peptid sekansı Y'yi hazırlamak;

ii) bir kapatma grubunu c, Y'nin C ya da N terminaline bağlamak;

iii) bir bağlayıcı ajan varlığında (ii)'de hazırlanan bir X çözeltisini ve kapatılmış peptidi hazırlamak ve istenen bileşiği izole etmek.

Bir işlemde Y, bir peptid sekansı sağlamak için amino asitlerin katı bir desteğe adım adım bağlanmasıyla hazırlanmaktadır. Alternatif olarak, Y sekansı çözeltide sentezlenebilmektedir.

Teknikte bilinen herhangi bir bağlayıcı ajan, uygun bir çözücü (örnek olarak, DMF, THF, vb.) içinde buluşun bir işleminde, örnek olarak EDAC, DCC, DIC, PyBOP, HCTU ve benzerlerinde kullanılabilir.

Alternatif bir çözelti fazı sentezinde, Y sekansının C terminalinin bir ya da daha fazla amino asidi, peptid sekansının (örnek olarak daha önce tarif edildiği gibi katı bir destek

üzerinde önceden sentezlenmiş) geri kalanının bir yakınsak sentez içinde çözeltide konjüge edilmesine izin vermek için çözeltide X'e konjüge edilebilmektedir.

Bir işlem, X'in Y'nin C terminaline bağlanmasını sağlar. Ayrıca işlem, Z'nin Y'nin N terminaline bağlanmasını içerebilir. Örnek olarak işlem aşağıdaki adımları içerebilir:

- 5 i) Y'nin C terminaline bağlanması için bir amin grubunun X'e verilmesi; ve isteğe bağlı olarak
- ii) Y'nin N terminaline bağlanması için bir karboksilik asit grubunun (ya da izotiyosiyanat ya da izosiyanat grubunun) Z'ye verilmesi.

Bir başka işlem, X'in Y'nin N terminaline bağlanmasını sağlar. Ayrıca işlem, Z'nin Y'nin C terminaline bağlanmasını içerebilir. Örnek olarak, işlem aşağıdaki adımları içerebilir:

- 10 i) Y'nin N terminaline bağlanması için bir karboksilik asit grubunun (ya da izotiyosiyanat ya da izosiyanat grubunun) X'e verilmesi; ve isteğe bağlı olarak
- ii) Y'nin C terminaline bağlanması için bir amin grubunun Z'ye verilmesi.

Bir işlemde X, kolşisin ya da bunun bir analogu ya da türevidir, örnek olarak

15 azademiltikolşisin ve Z, örnek olarak doksorubisin gibi bir sitotoksik ajandır.

Başka bir yönüyle buluş, bir VDA'nın bölge spesifik aktivasyonunda bir MMP proteolitik bölünme bölgesinin, özellikle de burada tanımlandığı gibi MT-MMP'ye özgü bir bölünme bölgesinin kullanılmasını sağlamaktadır. Bu tarifnamede kullanıldığı şekliyle, "bölge spesifik aktivasyon" terimi, genel olarak, bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir

20 VDA'nın, MMP proteolitik bölünme sahasındaki bölgeye spesifik bölünme yoluyla aktivasyonunu ifade etmektedir. Proteolitik bölünme bölgesindeki bölgeye özgü bölünmenin VDA'nın serbest bırakılması ve dolayısıyla aktivasyonu ile birlikte gerçekleşmesi beklenmektedir.

Farmasötik Kompozisyonlar ve Kullanımlar

25 Başka yönlerde buluş, daha önce tıpta kullanım için tarif edildiği gibi bir bileşik ya da bunun farmasötik açıdan kabul gören bir tuzunu sağlamaktadır. Başka yönlerde, daha önce tarif edildiği gibi bir bileşik içeren farmasötik bir formülasyon sağlanmaktadır. Formülasyon, en az bir ilave farmasötik olarak kabul edilebilir bileşen örnek olarak bir yardımcı madde, seyreltici ya da taşıyıcı içerebilmektedir. Tercih edilen şekliyle,

30 formülasyon parenteral uygulama için tasarlanmıştır.

Buluş, buluşa göre bir bileşik içeren farmasötik bir formülasyon sağlamaktadır. Tercih edilen bir uygulamada bileşik, formüle (VII) aittir.

Buluşun tercih edilen bir yönünde, bahsedilen kompozisyon farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ya da seyreltici içermektedir.

- 5 Buluşun kompozisyonları tipik olarak etkili miktarlarda uygulanmaktadır. "Etkili bir miktar", tek başına ya da başka dozlarla birlikte istenen cevabı üreten bir kompozisyonun miktarıdır. Uygulandığında, bu buluşun farmasötik kompozisyonları, farmasötik olarak kabul edilebilir preparasyonlarla uygulanmaktadır. Bu tür preparatlar rutin olarak farmasötik olarak kabul edilebilir konsantrasyonlarda tuz, tamponlama maddeleri, koruyucular, uyumlu taşıyıcılar ve isteğe bağlı olarak diğer terapötik maddeleri (örnek olarak, sisplatin; karboplatin; siklofosfamid; melphalan; karbomisin; metotreksat; 5-florourasil; sitarabin; merkaptopurin; daunorubisin, doksorubisin; epirubisin; vinblastin; vinkristin; daktinomisin; mitomisin C; taksol; L-asparaginaz; G-CSF; etoposid; kolşisin; derferoksamin mezilat; ve kamptotesin) içerebilir.
- 15 Buluşun kompozisyonları, enjeksiyon ya da zaman içinde kademeli infüzyon dahil herhangi bir geleneksel yolla uygulanabilir. Uygulama, örnek olarak, oral, intravenöz, intraperitoneal, intramüsküler, intrakavite, deri altı ya da transdermal olabilir. Kanseri gibi belirli bir hastalığın tedavisi durumunda, istenen cevap hastalığın ilerlemesini inhibe eder. Bu, sadece hastalığın ilerlemesini geçici olarak yavaşlatmayı içerebilir,
- 20 ancak daha çok tercih edilmekle birlikte, hastalığın ilerlemesini kalıcı olarak durdurmayı içerir. Bu, teknikte bilinen rutin yöntemlerle izlenebilir.

- 25 Kompozisyonların insanlar dışındaki memelilere (örnek olarak test amaçlı ya da veterinerlik amaçlı terapötik amaçlar için) uygulanması, yukarıda açıklandığı gibi aynı koşullar altında gerçekleştirilir. Burada kullanılan bir denek, bir memeli, tercih edilen şekliyle bir insandır ve insan dışı bir primat, inek, at, domuz, koyun, keçi, köpek, kedi ya da kemirgendir.

- 30 Uygulandığında, buluşun farmasötik preparasyonları farmasötik olarak kabul edilebilir miktarlarda ve farmasötik olarak kabul edilebilir kompozisyonlarda uygulanır. "Farmasötik olarak kabul edilebilir" terimi, etken maddelerin biyolojik aktivitesinin etkinliğini etkilemeyen toksik olmayan bir materyal anlamına gelmektedir.

Farmasötik preparasyonlar istenirse farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ile kombine edilebilmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle "farmasötik olarak kabul edilebilir

taşıyıcı" terimi, bir insana uygulanmaya uygun bir ya da daha fazla uyumlu katı ya da sıvı dolgu maddesi, seyreltici ya da kapsülleyici madde anlamına gelmektedir. "Taşıyıcı" terimi, uygulamayı kolaylaştırmak için etken maddenin birlikte kullanıldığı, doğal ya da sentetik bir organik ya da inorganik bileşeni ifade etmektedir.

- 5 Farmasötik kompozisyonlar, aşağıdakileri içeren uygun tampon ajanları içerebilir: bir tuzdaki asetik asit; bir tuzdaki sitrik asit; bir tuzdaki borik asit; ve bir tuz içindeki fosforik asit.

Farmasötik kompozisyonlar ayrıca isteğe bağlı olarak aşağıdakiler gibi uygun koruyucular da içerebilir: benzalkonyum klorür; klorobutanol; parabenler ve timerosal.

- 10 Oral uygulamaya uygun kompozisyonlar, her biri önceden belirlenmiş bir miktarda etken madde içeren kapsüller, tabletler, pastiller gibi ayrı birimler halinde sunulabilir. Diğer kompozisyonlar sulu sıvılar ya da şurup, eliksir ya da bir emülsiyon gibi sulu olmayan sıvılardaki süspansiyonları içermektedir.

- Parenteral uygulamaya uygun kompozisyonlar uygun şekilde, tercih edilen şekliyle 15 alıcının kanıyla izotonik olan steril bir sulu ya da sulu olmayan bileşik preparasyonunu içermektedir. Bu preparasyon, uygun dağıtıcı ya da ıslatma ajanı ve süspanse edici ajanlar kullanılarak bilinen yöntemlere göre formüle edilebilmektedir. Steril enjekte edilebilir preparasyon ayrıca toksik olmayan parenteral olarak kabul edilebilir bir seyreltici ya da çözücü içinde, örnek olarak 1, 3-bütan diol içindeki bir çözelti halinde 20 steril enjekte edilebilir bir çözelti ya da süspansiyon olabilir. Kullanılabilecek kabul edilebilir araçlar ve çözücüler arasında su, Ringer çözeltisi ve izotonik sodyum klorür çözeltisi bulunur. Ek olarak, steril, sabit yağlar geleneksel olarak bir çözücü ya da süspanse edici ortam olarak kullanılır. Bu amaç için, sentetik mono ya da di-gliseritler de dahil olmak üzere herhangi bir yumuşak sabit yağ kullanılabilir. Ek olarak, oleik asit 25 gibi yağ asitleri enjekte edilebilir maddelerin hazırlanmasında kullanılabilir. Oral, deri altı, damar içi, kas içi ve benzeri uygulamalar için uygun taşıyıcı formülasyonu, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA'da bulunabilir.

- 30 Buluşa göre bileşikler, bir MMP'yi, özellikle bir MT-MMP'yi aşırı eksprese eden doku ile ilişkili bir hastalığı ya da rahatsızlığı tedavi etmek için kullanılabilir. Bu nedenle buluş, bir denekteki kanseri tedavi etmek için, buluşa göre etkili bir miktarda bileşik

verilmesini içeren bir yöntem sağlar. Buluşun tercih edilen bir yönteminde adı geçen denek insandır.

Burada kullanıldığı haliyle, "kanser" terimi, otonom büyüme kapasitesine sahip olan hücreleri, yani, hızlı çoğalan hücre büyümesi ile karakterize edilen anormal bir durumu ya da rahatsızlığı ifade etmektedir. Bu terim, her türlü kanser büyümesini ya da onkojenik süreçleri, metastatik dokuları ya da malign olarak transforme edilmiş hücreleri, dokuları ya da organları, histopatolojik tip ya da invazivlik evresinden bağımsız olarak içermediği anlamındadır. 'Kanser' terimi, solunum sistemini etkileyenler (ağız, burun, trakea, akciğer), gastrointestinal sistem (dil, yemek borusu, mide, ince bağırsaklar, kolon, karaciğer, pankreas, safra kesesi, rektum), endokrin sistem (tiroid, hipofiz, adrenal bezler), genital-üriner yol (idrar kesesi, böbrek), üreme sistemi (meme, yumurtalıklar, uterus, serviks, prostat, penis, skrotum, testis), cilt (melanositler, epidermis, endodermis), sinir sistemi (beyin, omurilik, glial hücreler, nöronlar) ve lenfoid sistem gibi epitelyal, endodermal ve mezenkimal orijinli maligniteleri, özellikle karsinom ve sarkomları içermektedir.

'Karsinoma' terimi, teknikte bilinmektedir ve solunum sistemi karsinomları, gastrointestinal sistem karsinomları, endokrin sistem karsinomları, genital üriner sistem karsinomları, cilt karsinomları ve üreme sisteminin karsinomları dahil olmak üzere epitelyal menşeli maligniteleri ifade etmektedir. "Karsinoma" terimi ayrıca, glandüler dokudan türetilen karsinomlara atıfta bulunan "adenokarsinomları" içermektedir, "skuamöz karsinomlar" skuamöz kökenli karsinomları ifade eder, ve "karsinosarkomlar", karsinom ve sarkomatöz dokudan oluşan tümörleri ifade etmektedir. Örnek karsinomlar, serviks epitelinden, prostat, meme, burun, baş ve boyun, ağız boşluğu, yemek borusu, mide, karaciğer, pankreas, kolon, yumurtalık, idrar kesesi ve akciğer, özellikle küçük olmayan akciğer karsinomu oluşturanları kapsamaktadır.

'Sarkoma' terimi, teknikte tanınan ve kemik, kıkırdak, yağ dokusu, düz kas, iskelet kası, sinir kılıfı, kan damarları, mezotel ve gastrointestinal stroma dahil olmak üzere yumuşak dokuların ya da bağ ya da destek dokuların malignitelerini ifade etmektedir. Diğer kanser türleri arasında beyaz kan hücrelerinden türetilen tümörleri ifade eden "lösemiler" ve lenfoid sisteminin tümörleri için "lenfomalar" bulunmaktadır.

Buluşa göre bir bileşik içeren farmasötik bir formülasyon, bunlarla sınırlı olmamak üzere bir antimetabolit (örnek olarak 5-floroürasil), bir sitotoksik ya da anti-proliferatif ajan (örnek olarak, antrasiklin, vinka alkaloid, taksan, sitotoksik nükleotit), bir biyotoksin, bir radyoterapötik, bir hormonal ajan ya da sitotoksik, sitostatik, anti-anjiyojenik ya da vasküler rahatsız edici bir etki yarattığı bilinen herhangi bir doğal ürün ya da ajan içeren, bir antikanser ajanı (kemoterapötik ajan) olarak, sırayla ya da esas olarak benzer bir zamanda kombinasyon halinde uygulanabilmektedir.

Burada kullanıldığı şekliyle "tedavi", tedavi edilen bireyin ya da hücrenin doğal seyrini değiştirme denemesi olarak klinik müdahaleyi ifade etmektedir ve profilaksi için ya da klinik patoloji seyri sırasında gerçekleştirilebilmektedir.

Başka bir yönden buluş, buluşa göre bir bileşiğin, kanseri tedavi etmek için bir ilacın imalatında kullanılmasını sağlamaktadır.

Mevcut buluşun bir yönünde, buluşa ait bileşikler ya da kompozisyonlar, enflamatuvar bir bozukluğu ve/ veya enflamatuvar bir yanıtı tedavi etmek için kullanılabilir. Bu nedenle, buluşun bir diğer yönüne göre, bir denekte inflamatuvar bir bozukluğu tedavi etmek için, buluşa göre etkili bir miktarda bir bileşik verilmesini içeren bir yöntem sağlanmaktadır.

Enflamatuvar bozukluk, ateroskleroz, romatoid artrit, osteoartrit, gut, lupus eritematosus, skleroderma, Sjorgen sendromu, poli ve dermatomiyozit, vaskülit, tendinit, sinovit, bakteriyel endokardit, periodontit, osteomiyelit, sedef hastalığı, zatürree, fibrozan alveolit, kronik bronşit, bronşektazi, amfizem, silikoz, pnömokonyoz, tüberküloz, ülseratif kolit, Crohn hastalığı, kronik enflamatuvar demiyelinizan poliradikülonöropati, kronik enflamatuvar demiyelinizan polinöropati, multipl skleroz, Guillan-Barre Sendromu ve myasthenia gravis. mastitis, laminit, larenjit, kronik kolesistit, Hashimoto tiroiditi ve enflamatuvar meme hastalığından oluşan gruptan seçilebilmektedir. Bir uygulamada enflamatuvar bozukluk, nakil sonrası doku ya da organ reddinin sonucu olabilmektedir. Özel uygulamalarda enflamatuvar bozukluk, ateroskleroz, romatoid artrit, osteoartrit, sepsis ve poliartritten oluşan gruptan seçilmektedir.

Buluşun bileşikleri, kalp yetmezliğini tedavi etmek için kullanılabilir. Aynı zamanda, kalp yetmezliğini tedavi etmek için bir ilacın imalatı için burada tarif edilen bir bileşiğin kullanılmasıdır.

Bu buluşun bir uygulamasında, buluşa ait bileşikler, bir yaranın (örnek olarak ülserler, kütanöz kesikler ya da yanıklar içeren lezyonlar) tedavisinde yararlı olabilir. Dolayısıyla buluş, bir denekte bir yarayı tedavi etmek için, buluşa göre etkili bir miktarda bir bileşik verilmesini içeren bir yöntem sağlamaktadır. Buluşun tercih edilen bir yönteminde adı geçen denek insandır.

Buluşun bileşikleri, menstrüasyonla ilişkili bozukluk ve rahatsızlıkları tedavi etmek için de kullanılabilir.

Ayrıca aşağıdakileri içeren bir paket ya da parça seti sağlanmıştır:

(1) burada tarif edilen bir bileşik ya da kompozisyon; birlikte

(2) bileşiği bir yöntemde kullanmak ya da burada tarif edildiği gibi kullanmak için talimatlar.

Burada tanımlanan paket, tekrar dozajlamayı sağlamak için birden fazla dozaj ünitesi içerebilir. Birden fazla dozaj ünitesi mevcutsa, bu birimler aynı olabilir ya da bileşik kompozisyonun dozu ve/ veya fiziksel form açısından farklı olabilir.

Korumanın kapsamı, gerçekten de böyle bir bileşik içerip içermediklerine bakılmaksızın ve bu tür bir bileşiğin terapötik olarak etkili bir miktarda bulunup bulunmadığına bakılmaksızın, buluşun bir bileşiğini içermesi ya da içermesini gerektiren sahte ya da hileli ürünleri içermektedir.

Koruma kapsamında, paketin, buluşun bir türünü ya da farmasötik formülasyonunu ve bu tür bir formülasyon ya da türleri içeren ya da içerdiği ya da içerdiğini iddia eden bir ürün ve farmasötik bir formülasyon içerdiğini gösteren bir açıklama ya da talimat içeren ambalajlar bulunur. Bu tür paketler sahte ya da hileli olabilir ama zorunlu değildir.

Bu şartnamenin açıklaması ve talepleri boyunca "içerir" ve "kapsamak" kelimeleri ve örnek olarak "içeren" ve "kapsayan", "dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere" anlamına gelen kelimelerin varyasyonları ve diğer kısımları, katkı maddelerini, bileşenleri, tam sayıları ya da adımları dışlama amacı taşımamaktadır.

Bu tarifnamenin açıklaması ve istemleri boyunca, tekil, bağlam aksini gerektirmedikçe çoğulları kapsamaktadır. Özellikle, sınırsız maddenin kullanıldığı durumlarda, şartname, aksi belirtilmedikçe, çoğulluğu olduğu kadar, tekilliği de kapsayacak şekilde anlaşılmalıdır.

Buluşun özel bir yönü, uygulaması ya da örneği ile birlikte açıklanan özellikler, tam sayılar, karakteristikler, bileşikler, kimyasal kısımlar ya da gruplar, bunlarla uyumlu olmadıkça, burada açıklanan herhangi bir başka yön, uygulama ya da örnekte uygulanabilir olduğu anlaşılmalıdır.

- 5 Buluş şimdi sadece aşağıdaki Şekillere referansla örnek yoluyla açıklanacaktır:

Şekil 1, ön ilaç-1'in, tümör içinde ve tümör dışı dokularda ex vivo, zamana karşı metabolizmasını gösteren bir grafiktir;

Şekil 2, tümör taşıyan farelerde periton içi uygulamayı takiben ön ilaç-1 birikimini ve seviyelerini gösteren bir grafiktir;

- 10 Şekil 3, ön ilaç-1'in tümör taşıyan farelere intraperitoneal uygulamasını takiben biriken VDA seviyelerini gösteren bir grafiktir;

Şekil 4, düşük MT1-MMP seviyelerini (MCF-7) ifade eden tümör homojenatlarına karşı yüksek MT1-MMP seviyelerini (HT1080) ifade eden tümör homojenatlarında ön ilaç-2'nin farklı metabolizmasını gösteren bir grafiktir;

- 15 Şekil 5, HT1080 tümör taşıyan farelerde periton içi uygulamayı takiben ön ilaç-2 birikimini ve seviyelerini gösteren bir grafiktir;

Şekil 6, HT1080 tümör taşıyan farelerde ön ilaç-2 periton içi uygulamasını takiben biriken VDA seviyelerini gösteren bir grafiktir.

Şekil 7: Doz arttırma çalışması sırasında bağıl fare vücut ağırlıkları

- 20 Şekil 8: ICT-2522 (başlık) ile tedavi sırasında tümör büyümesi

Şekil 9: ICT-2588 (ön ilaç) ile tedavi sırasında tümör büyümesi

Şekil 10: Molar eşdeğer dozda uygulanan başlığa (ICT-2552) kıyasla ön ilaç (ICT-2588) ile tedavi edilen fareler için tümör büyüme eğrileri a) ICT-2588, 37.5mg/kg & ICT-2552, 7.5mg/kg; b) ICT-2588, 50.0mg/kg & ICT-2552, 10.0mg/kg; c) ICT-2588, 62.5mg/kg & ICT-2552, 12.5mg/kg; ve d) ICT-2588, 75.0mg/kg & ICT-2552, 15.0mg/kg;

- 25

Şekil 11: Fosforile edilmiş amino asit kalıntıları, uç başlıkları, başlığı ve P2' alternatiflerini içeren modifikasyonlar gösteren ön ilaç, ICT-2588;

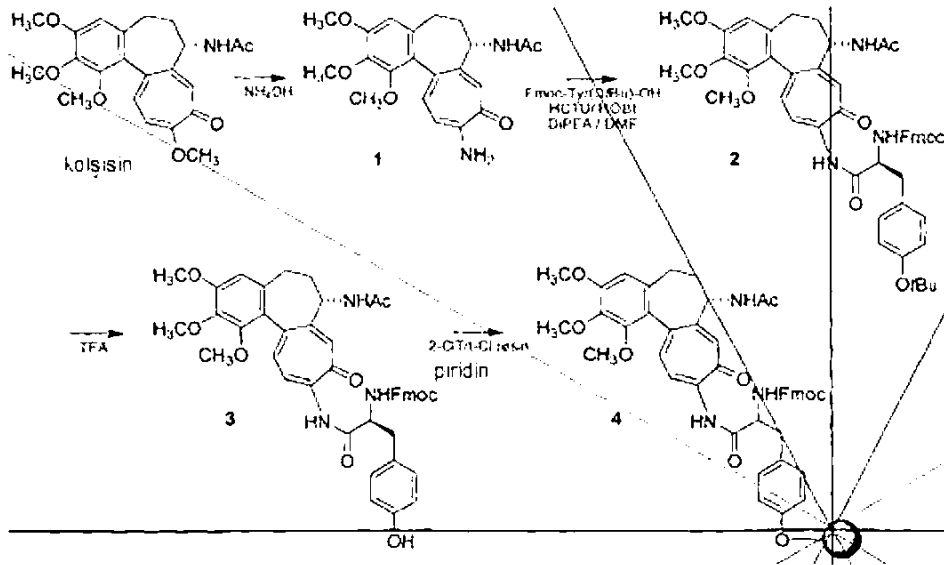
Şekil 12: Hem tümör (HT1080) hem de karaciğer (murin) homojenatlarında ICT 3053'ün (P2' = Ala) stabilitesini gösteren bir grafik. Bu, bu molekül dizisi için elde edilen verilere bir örnektir ve verinin bir özeti tablo 1'de verilmiştir; ve

Şekil 13: Serin (ICT3047) tiroisine (ICT 3048) ve hem serin hem de tiroisine (ICT3028) bağlı fosfatlı moleküller için stabilite verileri. Veriler, belirtilen süre boyunca tümör (HT1080, kapalı semboller) ve fare karaciğeri (açık semboller) homojenatında inkübasyonlar sonrasında kalan ana molekül yüzdesini göstermektedir. Bu, çoklu deneylerden elde edilen temsili verilerdir. Her molekülün fosforilasyonunu izlemek için kromatografik ayırmalar yapıldı.

10 Materyal ve Metotlar

ORNEK 1

İmmobilize edilmiş kolşisin türevi, azademetilkolşisinin sentezi



1'in sentezi:

- 15 Amonyak çözeltisi (% 35, 15 mL), kolşisine (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 eşdeğer) ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı, gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ham ürün, KHSO_4 (1M, sulu) ile yıkanmış, MgSO_4 ile kurutulmuş, filtre edilmiş ve azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir. Daha sonra, sarı bir katı halinde (427 mg, 1.11 mmol, % 59) 1'i elde edecek şekilde silika jel üzerinde (gradyent elüsyonu: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 95: 5 ila 10: 1) flaş kromatografisi ile saflaştırılmıştır.
- 20

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$), 7.99 (1 H, broad s, NH), 7.56 (1 H, d, J 2.1, C8-H), 7.32 (1H, d, J 10.7, C11-H), 6.88 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 6.52 (1 H, s, C4-H), 6.03 (2 H, broad s, NH₂), 4.68 (1 H, ddd, J 12.6, 6.5 ve 6.5, C7-H), 3.93 (3 H, s, OCH₃), 3.88 (3 H, s, OCH₃), 3.60 (3 H, s, OCH₃), 2.47 (1 H, dd, J 13.4 ve 6.2, C5-CH₂), 2.35 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 ve 6.9, C5-CH₂), 2.29-2.23 (1 H, m, C6-CH₂), 1.98 (3 H, s, CH₃), 1.90-1.88 (1 H, m, C6-CH₂); ES m/z (%) 385 [M^+H] (100).

2'nin sentezi:

HCTU (642 mg, 1.55 mmol, 1.50 eşdeğer) ve diizopropiletilamin (DiPEA, 516 μ L, 404 mg, 3.11 mmol, 3.00 eşdeğer), DMF (10 mL) içindeki bir Fmoc-tyr(tBu)-OH (714 mg, 1.55 mmol, 1.50 eşdeğer) çözeltisine ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, 1 (398 mg, 1.04 mmol, 1.00 eşd.) çözeltiye ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, 22 saat boyunca 50 °C'de karıştırılmıştır. DMF, vakum altında uzaklaştırılmış ve elde edilen yağ CH_2Cl_2 (20 mL) içinde çözülmüştür. Organik faz, $KHSO_4$ (sulu, 2 x 20 mL) ile yıkanmış, $MgSO_4$ ile kurutulmuş ve azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir. Ham ürün, sarı bir katı halinde (530 mg, 642 μ mol, % 67) 2'yi elde edecek şekilde flaş kromatografisi ile (gradiyent elüsyonu: CH_2Cl_2 / metanol 100: 0 ila 99: 1 ila 98: 2) saflaştırılmıştır.

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$), 10.42 (1 H, broad s, NH), 9.02 (1 H, d J 10.7, C11-H), 7.75 (2 H, d, J 7.2, C23-H, C24-H), 7.54 (2 H, d, J 7.2, C20-H, C27-H), 7.45 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 7.39 (2 H, dd, J 7.2 ve 7.2, C22-H, C25-H), 7.29 (2 H, dd, J 6.6 ve 6.6, C21-H, C26-H), 7.19 (1 H, broad s, C8-H), 7.03 (2 H, d, J 7.9, C14-H, C17-H), 6.81 (2 H, d, J 7.9, C15-H, C16-H), 6.50 (1 H, s, C4-H), 5.88 (1 H, broad s, NH), 5.25 (1 H, broad s, C12-H), 4.73-4.67 (1 H, m, C7-H), 4.43 (1 H, dd, J 10.0 ve 7.6, C18-CH₂), 4.28 (1 H, dd, J 10.0 ve 7.2, C18-CH₂), 4.16 (1 H, dd, J 7.2 ve 6.19, C19-H), 3.93 (3 H, s, OCH₃), 3.88 (3 H, s, OCH₃), 3.62 (3 H, s, OCH₃), 3.21 (1 H, dd, J 13.1 ve 4.8, C13-CH₂), 3.11 (1 H, dd, J 13.1 ve 5.5, C13-CH₂), 2.53 (1 H, dd, J 13.4 ve 6.2, C5-CH₂), 2.40 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 ve 6.9, C5-CH₂), 2.22-2.15 (1 H, m, C6-CH₂), 1.88 (3 H, s, CH₃), 1.80 (1 H, ddd, J 11.5, 11.3 ve 6.9, C6-CH₂), 1.22 (9 H, s, C(CH₃)₃); ES m/z (%) 826 [M^+] (100).

3'ün sentezi:

TFA (2 mL), 2'nin çözeltisine (486 mg, 589 μ mol, 1.00 eşdeğer) ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. TLC, ürüne kantitatif dönüşüm

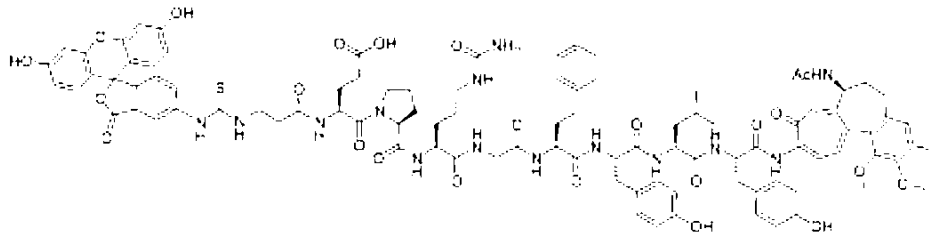
olduğunu belirtti. Ürün, kantitatif verimde **3** elde etmek üzere, toluen ile birlikte buharlaştırılarak azaltılmış basınç altında konsantre edilmiştir.

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$), 10.08 (1 H, broad s, NH), 8.99 (1 H, d J 10.7, C11-H), 7.71 (2 H, d, J 6.2, C23-H, C24-H), 7.55 (1 H, s, C8-H), 7.49 (2 H, dd, J 6.5 ve 6.5, C20-H, C27-H), 7.41 (1 H, d, J 10.2, C10-H), 7.33 (2 H, dd, J 6.2 ve 6.2, C22-H, C25-H), 7.26-7.21 (2 H, m, C21-H, C26-H), 6.91 (2 H, d, J 8.3, C14-H, C17-H), 6.56 (2 H, d, J 7.2, C15-H, C16-H), 6.45 (1 H, s, C4-H), 5.93 (1 H, broad s, NH), 5.28 (1 H, s, NH), 4.95-4.90 (1 H, m, C12-H), 4.60 (1 H, ddd, J 11.7, 5.8 ve 6.9, C7-H), 4.39 (1 H, dd, J 8.9 ve 8.6, C18-CH₂), 4.29-4.24 (1 H, m, C18-CH₂), 4.12 (1 H, dd, J 6.9 ve 6.9, C19-H), 3.90 (3 H, s, OCH₃), 3.84 (3 H, s, OCH₃), 3.54 (3 H, s, OCH₃), 3.08 (2 H, d, J 5.2, C13-CH₂), 2.44 (1 H, dd, J 13.4 ve 6.2, C5-CH₂), 2.33-2.26 (1 H, m, C5-CH₂), 2.15-2.09 (1 H, m, C6-CH₂), 1.82 (3 H, s, CH₃), 1.75-1.69 (1 H, m, C6-CH₂); ES m/z (%) 770 [M⁺] (100).

4'ün hazırlanması:

2-Klorotritil klorür reçinesi (Novabiochem, 100-200 gözlü, substitüsyon 1.4 mmol g⁻¹, 589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eşdeğer), THF (10 mL) içerisindeki **3**'ün bir çözeltisi (589 mg, 0.765 mmol, 1.00 eşdeğer), dimetilaminopiridin (10 mg, 76.5 μ mol, 0.01 eşdeğer), DiPEA (247 mg, 1.913 mmol, 333 μ L, 2.50 eşdeğer) ve piridin (241 mg, 3.061 mmol, 248 μ L, 4.00 eşd.) içinde süspansiyon haline getirilmiş ve 50 °C'de 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Reçine daha sonra filtre edilmiş ve THF ile iyice yıkanmıştır. Reçine daha sonra reçineyi dikkatli bir şekilde metanol (CH_2Cl_2 : MeOH: DiPEA 17: 2: 1, 100 mL) ile yıkayarak kapatılmıştır. Reçine **4**, P₂O₅ üzerinde gece boyunca kurutulmuştur. Kuru reçine ağırlığı: 593 mg (% 56 yükleme).

Endopeptidaz ile aktive edilmiş ön ilaçların sentezi için genel prosedür



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

Bir örnek olarak, peptid konjugatı **5**, bir Fmoc bazlı strateji kullanılarak, immobilize edilmiş kolşisin türevinden **4** geleneksel katı faz peptid sentezi kullanılarak sentezlenmiştir.

N α -Fmoc strateji sentezi, 2-hlorotritil türevli reçine kullanılarak manuel olarak elde edilmiştir. Reçine DMF içinde iyice şişirilmiştir, bunu NFmoc koruma grubunun, DMF (3 x 3 dakika) içinde % 20 h/ h piperidin ile muamele edilerek uzaklaştırılması takip etmiştir. Tüm bağlayıcılar, 2.5 kat molar N α -Fmoc korumalı amino asitin (uygun yan zincir koruma grupları ile) fazlalığı kullanılarak DMF içinde gerçekleştirilmiş ve HCTU/ HOBt/ DiPEA kullanılarak aktive edilmiştir. N α -Fmoc korumasının kaldırılması, DMF içinde (3 x 3 dakika) % 20 piperidin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bağlayıcıların ve koruma kaldırma işlemlerinin başarısı, ninhidrin bazlı Kaiser testi kullanılarak izlenmiştir. Başarısız bağlayıcılar tekrarlanmıştır. Nihai N α -Fmoc korumasının kaldırılmasından sonra, peptid zinciri, floresan izotiyosiyanat (2.50 eşdeğer, DiPEA varlığında, 1.50 eşd.) ile kapatılmıştır. Bu reaksiyonun başarısı, Kaiser testi ile de izlenmiştir.

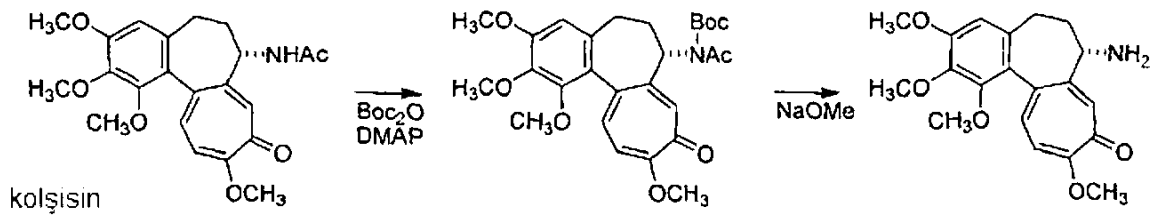
Ek bir β -alanin kalıntısı, tiyoüre bağlantısının ve bölünmenin asidik koşullarının uyumsuzluğunun üstesinden gelmek için sekansa dahil edilmiştir (tiyoüre yeniden düzenlenebilir ve önceki amid bağının karbonil karbonu, bu şekilde oluşturulan sülfidril benzeri bir fonksiyon ile nükleofilik bir saldırıya maruz kalabilir. Bu, siklik bir tiyazolinonun eş zamanlı oluşumu ile birlikte, amid bağının bölünmesine yol açmaktadır. Tiyazolinon, bir tiyohidantoin oluşturmak üzere sulu asit varlığında yeniden düzenlenebilir).

Sekansın tamamlanması üzerine, reçine yıkanmış (DMF, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂ / MeOH) ve sabit ağırlığa kadar KOH üzerinde vakum altında kurutulmuştur. Peptitler, eşzamanlı yan zincir korumasının kaldırılması ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca TFA-H₂O-triizopropilsilan 95: 2.5: 2.5 kullanılarak hafif asidoliz ile reçineden ayrılmıştır. Ayrılmanın ardından, TFA, azaltılmış basınç altında çıkarılmıştır. Ham ürün, % 95 sulu asetik asit içine ekstrakte edilmiş ve liyofilize edilmiştir. Ham peptit, daha sonra ters faz HPLC kullanılarak analiz edilmiş ve hazırlayıcı HPLC (saflık >% 97) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saf fraksiyonlar birleştirilmiş ve liyofilize edilmiştir. Peptit konjugat saflaştırması için bir C18 hazırlayıcı kolon (Zorbax Eclipse, 21.2 x 150mm XDB-C18, Agilent) kullanılmıştır. Mobil fazlar aşağıdaki gibiydi; Mobil Faz A: HPLC kalitesinde su ve % 0.045 TFA. Mobil Faz B, % 10 HPLC kalitesinde su, % 90 asetonitril ve % 0,045 TFA'dan oluşuyordu. Mobil faz, 0.45 μ m'lik bir gözenekli selüloz nitrat filtresi (Sartolon, Sartorius, UK) içinden vakum filtrasyonu ile gazı giderilmiştir. Kromatografi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve akış hızı 21.2 ml/ dak'da tutulmuştur. Mobil faz

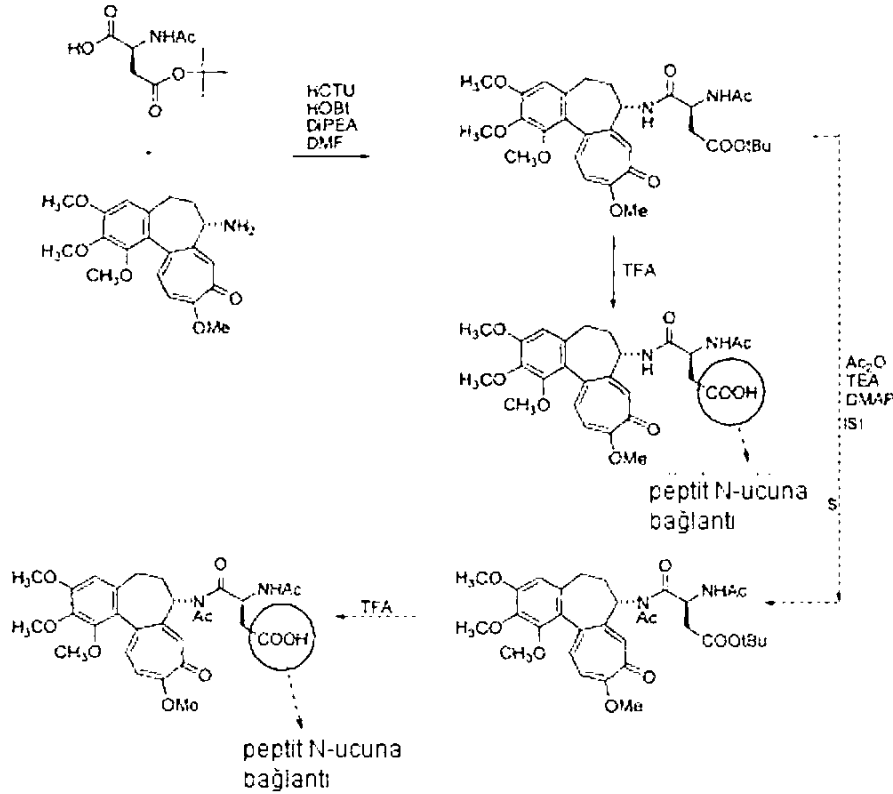
gradiyentleri, yapısal olarak benzer bileşikler için daha önce şirket içinde tasarlanan bir gradiyentten optimize edilmiş ve ölçeklenmiştir. UV absorbands tespiti 255 nm'de optimaldi. ES m / z (%) 951.8 [M + H] 2+ (100). RP-HPLC (Gradiyent: 0 dakika % 30 B; 5 dakika % 35 B; 25 dakika % 80 B; 26 dakika % 100 B; 27 dakika % 100 B; 30 dakika % 30 B) Rt = 11.98 dakika.

Kolşisinin, B halkası yoluyla bir peptid sekansına, peptid N-terminaline bağlanması

Bir kolşisin parçasının, N-terminal peptidi boyunca bağlanmasını sağlamak için, aşağıdaki strateji kullanılacaktır. B halkası amini, yayınlanmış yöntemler kullanılarak demaske edilebilir. Aspartik asit ile asilasyon, moleküle (amino asit yan zincirinden) bir karboksilik asit verecektir, böylece peptid N-terminalinde serbest amine konjugasyon sağlanacaktır (aşağıya bakınız).

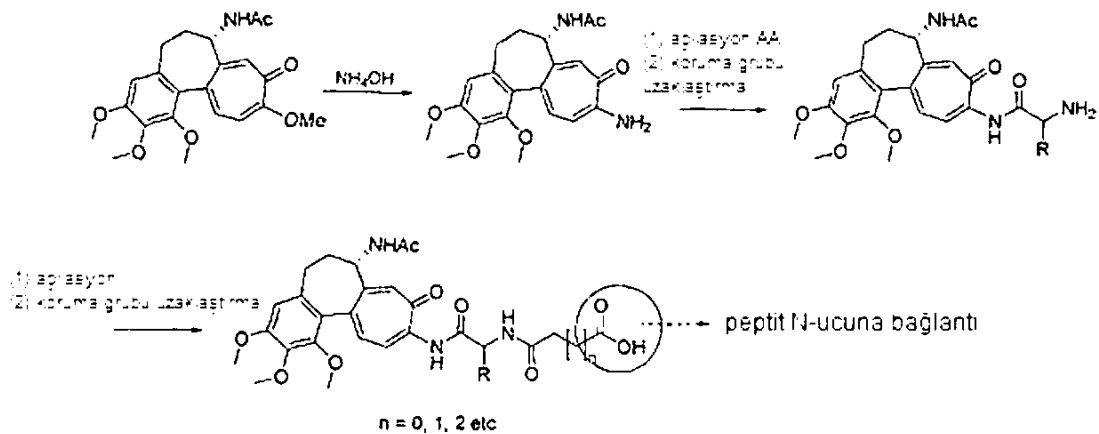


Amid bağının asetilasyonu, ana kolşisinin MMP aktivasyonu ve ardından eksopeptidaz bozulmasından sonra serbest bırakılıp bırakılmadığını değerlendirmek için de incelenecektir.



Kolşisin analogunun bir C-halkası aracılığıyla bir peptid sekansına, peptit N-terminaline bağlanması

5 Kolşisin analogunun N-terminali ile bağlanmasını sağlamak için aşağıdaki strateji kullanılacaktır. Azademetilkolşisinin asilasyonu, daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirilebilir. Boc-koruma grubunun demaske edilmesi üzerine, süksinik anhidrid (ya da bir mono-korunmalı süksinat ya da malonat (ya da benzeri) türevi) ile asilasyonu takip etmektedir. Korumanın kaldırılması daha sonra peptit N-terminaline bağlanma için uygun bir karboksilik asit işlevselliği sağlayacaktır.

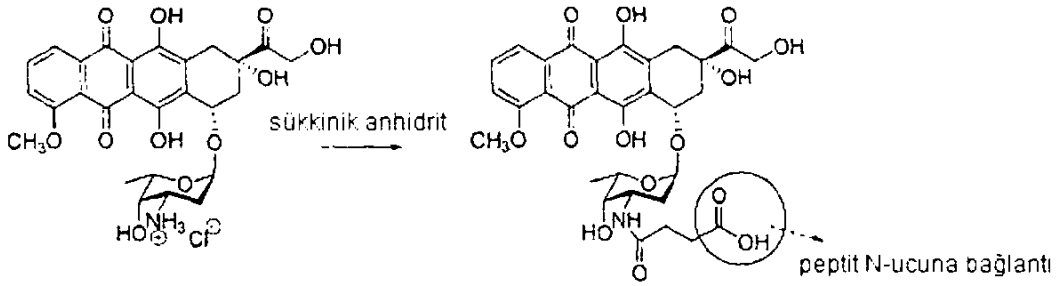


Doksorubisinin bir peptid sekansına bağlanması için stratejiler:

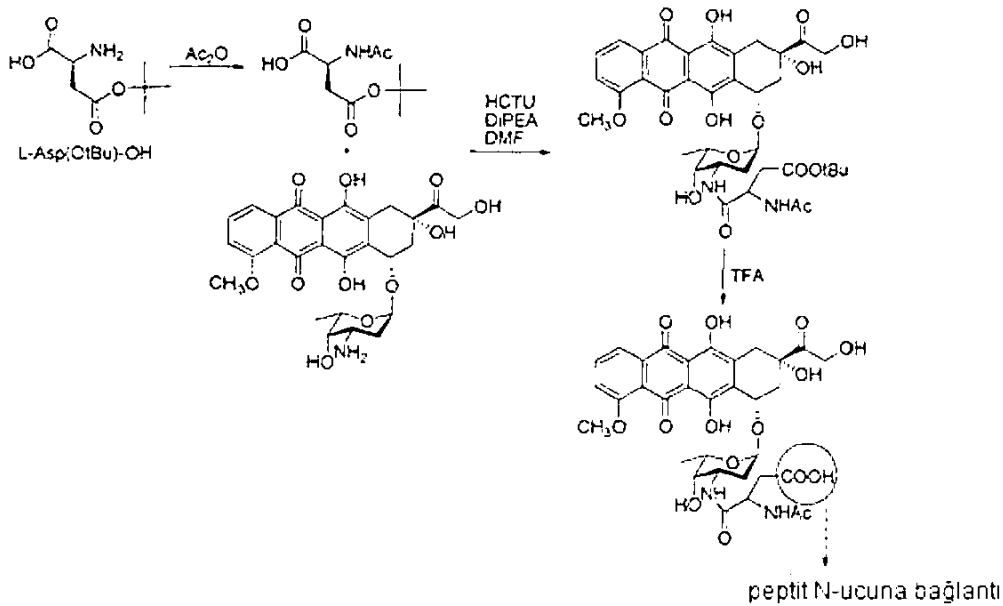
1) N-terminal doksorubisin bağlantısı

Doksorubisin peptid N-terminaline (daha önce tarif edilen immobilize edilmiş kolşisin türevli reçinesi kullanılarak peptit sentezinin ardından) bağlanmasını sağlamak için, ilk önce bir karboksilik asit vermek için modifiye edilmesi gerekir. Örnekler süksinik anhidrit ile reaksiyonu içermektedir (aşağıdaki strateji 1). Bununla birlikte, aspartik asidin yan zincirini kullanarak (her ikisi de doğal amino asit), aşağıda gösterildiği gibi (strateji 2), metabolizmada doğal bir amino asit (yabancı bir kimyasal maddenin aksine) serbest bırakılmaktadır:

10 Strateji 1: (süksinil aralayıcı)

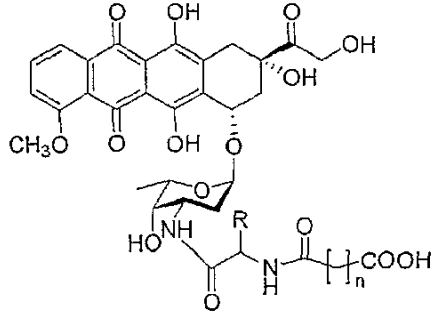


Strateji 2: (amino asit aralayıcı)



Strateji 3

Stratejiler 1 ve 2'de tarif edilene benzer bir şekilde, doksorubisin şekeri amin, amino asit ile asillenebilir; bu, korumanın kaldırılması durumunda, peptid N-terminaline bağlanabilecek bir türev üretmek için bir süksinat (ya da başka bir şekilde) aralayıcı ile türevlenebilir.



5

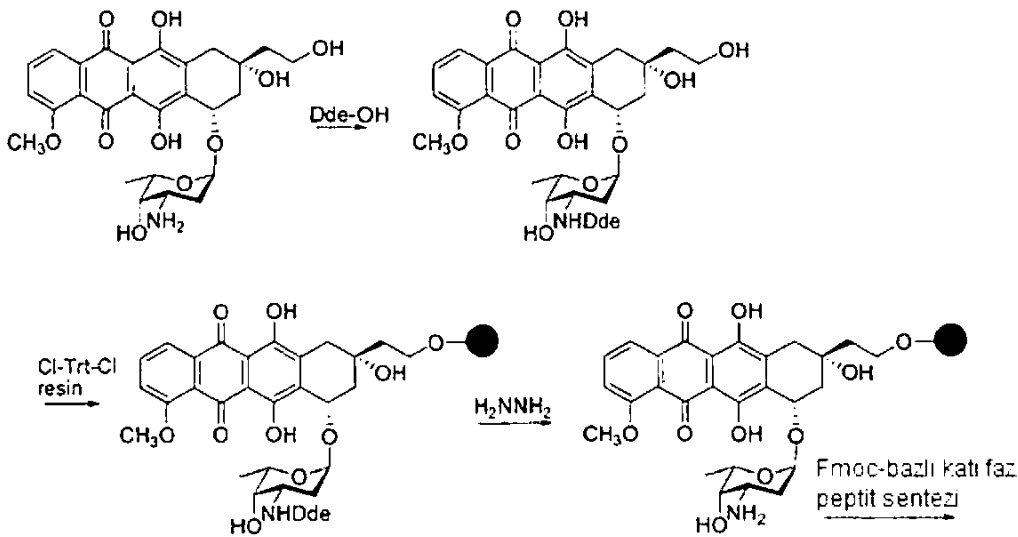
n=1, n=2

2) C-terminal doksorubisin bağlantısı

Doksorubisin amin grubunun Dde (peptid kimyasında ve grubumuz tarafından yaygın olarak kullanılan koruyucu bir grup) ile korunması, maddenin tritil bazlı (veya başka şekilde) bir reçine üzerinde immobilizasyonuna izin vermektedir. Dde grubunun daha sonra çıkarılması, bir peptid sekansının bu noktadan (yani C-terminalinden) oluşturulmasına izin vererek amini demaske edecektir. Standart Fmoc bazlı katı faz sentezi bir peptid sekansı üretecektir.

10

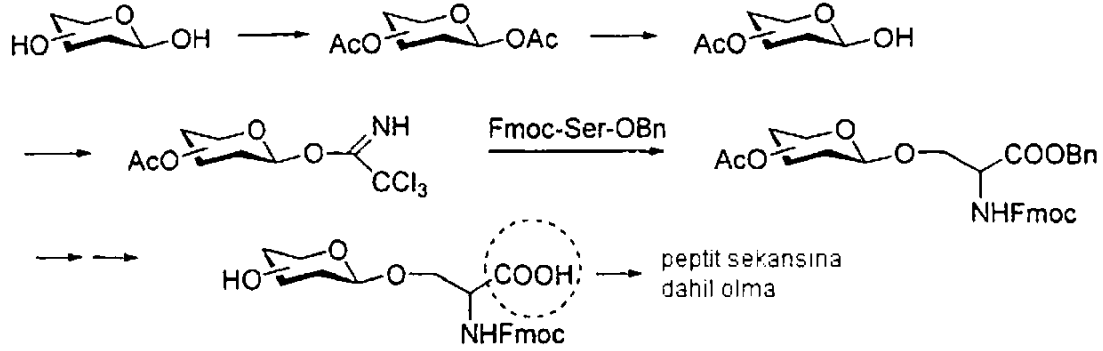
Uygun bir şekilde türetilmiş bir VDA, daha sonra N-terminal aracılığıyla konjüge edilebilir. Reçine ayrılması ve saflaştırması, daha önce tarif edildiği gibi olacaktır.



15

Glikosile edilmiş amino asitlerin dahil edilmesi

Uygun yan zincir işlevselliğine sahip amino asitler (örnek olarak, serin, tirozin, treonin), arttırılmış sulu çözünürlüğe sahip peptidler üretmek için glikosile edilebilir (mono-, di- ya da trisakaritler ile). Bu tür bir karbonhidrat türevli parça, serin yerine kullanılabilir, örnek olarak (aşağıdaki şemaya bakınız).

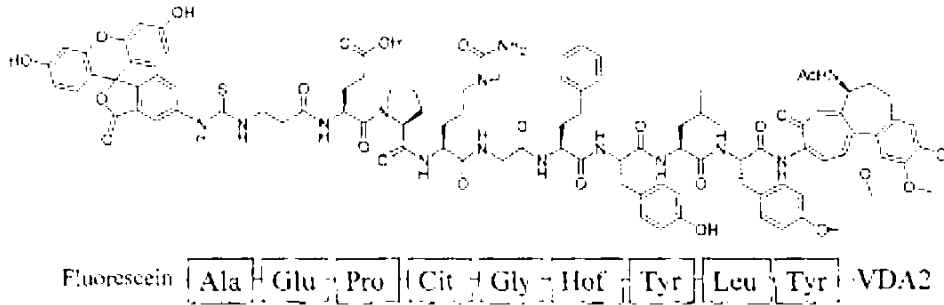


5

Sonuçlar

1) MMP ile aktive edilmiş ön ilaç - pan MMP hedefli

Yapı:



10 (Hof = homofenilalanin; Cit = sitrülün; VDA-2 = azademetilkolşisin)

a) Ön ilaç-1 normal fare plazması, normal fare karaciğer homojenatı ve deneysel insan tümör modeli homojenatı (HTP80 ksenograft; MMP'lerin çoğunu eksprese ettiği bilinmektedir) ex vivo kullanılarak taranmıştır. Ön ilaç bölünmesi ve metabolizması, LC/MS/MS kullanılarak tespit edilmiştir.

15 a. Ön ilaç-1, bu terapötiklerin sistemik stabilitesini destekleyen, plazma ve karaciğerde stabildi (Şekil 1).

b. Ön ilaç-1, MMP'leri eksprese eden tümörlerde bu terapötiklerin aktivasyonunu destekleyen tümör homojenatında metabolize edilmiştir (Şekil 1).

b) Ön ilaç-1, en azından rekombinant MMP-2, MMP-9, MMP-10 ve MMP-14 ile Glisin-Homofenilalanin'de (Gly-Hof) hızlı bir şekilde ayrılmaktadır. LC/ MS/ MS ve kütle spektrometresi ile gösterilmiştir (veriler gösterilmemiştir).

c) Ön ilaç-1, deri altı HT1080 tümör modelini taşıyan farelere intraperitoneal yol ile in vivo olarak uygulanmıştır (MMP'lerin çoğunun ekspresyonu). Plazma, doku ve tümörler, doz sonrası düzenli aralıklar ile toplanmıştır. Ön ilaç ve VDA2 seviyeleri, LC/ MS/ MS ile değerlendirilmiştir.

a. Ön ilaç-1 birikmiş ve analiz edilen tüm dokularda tespit edilmiştir (Şekil 2).

b. Tümörde en yüksek ön ilaç-1 seviyeleri gözlenmiştir (Şekil 2).

c. Ön ilaç-1, doz sonrası 24 saat sonra tespit edilemez. (Şekil 2)

d. VDA2, ön ilaç-1 uygulamasının ardından normal dokularda düşük seviyelerde tespit edilmiştir (Şekil 3)

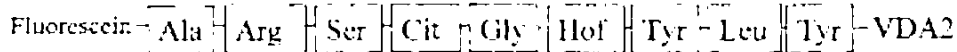
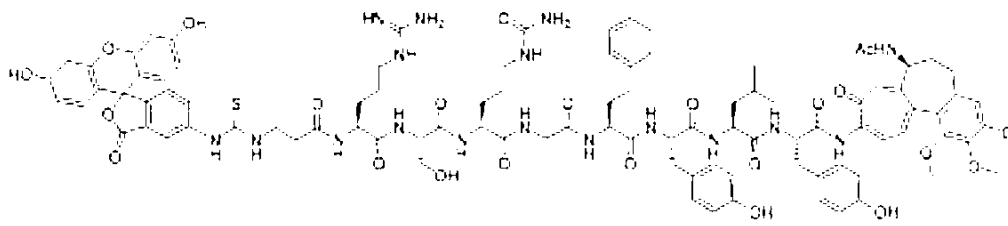
e. VDA2 seviyeleri, ön ilaç-1 uygulamasının ardından tümör dokusunda yüksek seviyelerde tespit edilmiştir (Şekil 3)

f. VDA2, tümörde hala yüksek seviyelerde tespit edilmiş ve ön ilaç-1 ile doz sonrası 24 saat sonra normal dokularda tespit edilememiştir (Şekil 3)

2) MMP ile aktive edilmiş ön ilaç (ICT-2588)

- membran tip MMP'lere (MT-MMP'ler) hedeflenmiş

Yapı:



d) Bileşik 1, bileşiğin MMP hedeflemesini pan-MMP'den MT-MMP seçiciye (Prodrug-2) değiştirmek için modifiye edilmiştir

a. Arginin, Glutamik asidin yerine P4 pozisyonuna dahil edildi

b. Prolin çıkarıldı ve P3 konumundaki Serine ile değiştirildi

- e) Ön ilaç-2, normal fare plazması, normal fare karaciğer homojenatı ve yüksek MT1-MMP (MMP-14) ekspresyonu ve aktivitesi (HT1080) ve düşük MT1-MMP ekspresyonu ve aktivitesi (MCF-7) ex vivo sergileyen deneysel insan tümör modeli homojenatları kullanılarak taranmıştır. Ön ilaç-2 bölünme ve metabolizma LC/MS/MS kullanılarak
- 5 tespit edildi.
- a. Ön ilaç-2, bu terapötüğün sistemik stabilitesini destekleyen plazmada bozulmadan kaldı.
- b. Ön ilaç-2, murin karaciğer homojenatlarında kararlı kaldı
- c. Ön ilaç-2, düşük MT-MMP seviyelerini ifade eden (MCF7) tümör homojenatına göre
- 10 yüksek MT-MMP seviyelerini ifade eden (HT1080) tümör homojenatında hızlı bir şekilde metabolize oldu (Şekil 4).
- d. Bu veriler bu ön ilacın sistemik stabilitesini ve MT-MMP'ler tarafından aktivasyonun seçiciliğini destekler.
- f) Ön ilaç-2, LC/MS/MS ve kütle spektrometrisi ile gösterildiği gibi MMP'ler ile
- 15 diferansiyel olarak bölünür (veriler gösterilmemiştir):
- a. Glisin-Homofenilalaninde (Gly-Hof) rekombinant MMP-14 ile hızla bölünmüştür.
- b. Rekombinant MMP-2 ile Homofenylalanin-Tirosinde (Hof-Tyr) yavaşça bölünmüştür. Ön ilaç-1 ile gözlemlenenlere farklı bölünme gösterilmesi.
- c. Ön ilaç-2, ön ilaç-1'in aksine, rekombinant MMP-9 ile bölünmez
- 20 d. Bu veriler MMP'nin ön ilaç-2 seçici bölünmesini desteklemektedir
- g) Ön ilaç-2, deri altı HT1080 tümör modelini (MT1-MMP pozitif) taşıyan farelere intraperitoneal yoldan in vivo olarak uygulandı. Dozlama sonrası düzenli aralıklarla plazma, doku ve tümörler toplandı. Ön ilaç-2 ve VDA2 seviyeleri LC/MS/MS ile değerlendirildi.
- 25 a. Ön ilaç-2 birikmiştir ve analiz edilen tüm dokularda tespit edilmiştir (Şekil 5).
- b. Tümörde en yüksek ön ilaç-2 seviyeleri gözlemlendi (Şekil 5).
- c. Karaciğer analiz edilen tüm normal dokuları temsil ediyordu (Şekil 5).
- d. Ön ilaç-2 uygulamasının ardından VDA2 plazmada tespit edilememiştir (Şekil 6).

e. On ilaç-2 uygulamasının ardından tümörde yüksek VDA2 konsantrasyonları tespit edildi (Şekil 6).

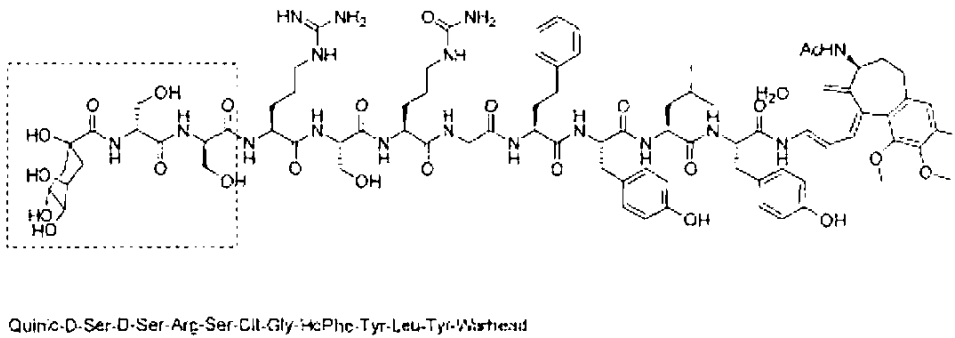
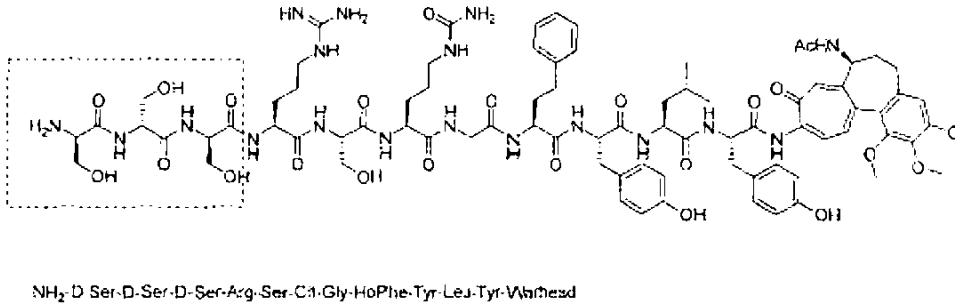
f. Tümördeki VDA2 seviyeleri, ön ilaç-2'nin uygulanmasını takiben normal dokularda tespit edilenden 10 kat daha yüksekti (Şekil 6).

5 g. Uygulamadan 48 saat sonra tümörde yüksek ön-ilac-2 ve VDA2 seviyeleri tespit edildi.

3. Sentezlenmiş konjugatlar (MT-MMP ön ilacına dayalı olarak) başarısız olmuşlardır. Aşağıdaki kapakları içeren ön ilaçlar, plazma ve/ veya karaciğerde yetersiz bir şekilde stabildi.

10 (1) 3 x D-Serin

(2) kinik asit + 2 x D-Serin



15 **ORNEK 2**

Doz Yanıtı Antitümör Çalışması

Materyal ve Metotlar

ICT-2588'nin sentezi – bakınız Örnek 1

ICT-2552'nin sentezi: Kolşisine (750 mg, 1.88 mmol, 1.00 eşdeğer) amonyak çözeltisi

20 (% 35, 15 mL) ilave edildi ve reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında gece boyunca

kariştirildi. Ham ürün, KHSO₄ (1M, sulu) ile yıkandı, MgSO₄ ile kurutuldu, süzöldü ve indirgenmiş basınç altında konsantre edildi Daha sonra sarı bir katı olarak ICT-2552 verecek şekilde silis jel üzerinde flaş kromatografisiyle (gradyan elüsyonu: CH₂Cl₂ / metanol 95: 5 ila 10: 1) arıtıldı. (427 mg, 1.11 mmol, 59%). ¹H (600 MHz, CDCl₃), 7.99 (1 H, broad s, NH), 7.56 (1 H, d, J 2.1, C8-H), 7.32 (1H, d, J 10.7, C11-H), 6.88 (1 H, d, J 11.0, C10-H), 6.52 (1 H, s, C4-H), 6.03 (2 H, broad s, NH₂), 4.68 (1 H, ddd, J 12.6, 6.5 ve 6.5, C7-H), 3.93 (3 H, s, OCH₃), 3.88 (3 H, s, OCH₃), 3.60 (3 H, s, OCH₃), 2.47 (1 H, dd, J 13.4 ve 6.2, C5-CH₂), 2.35 (1 H, ddd, J 13.4, 12.7 ve 6.9, C5-CH₂), 2.29-2.23 (1 H, m, C6-CH₂), 1.98 (3 H, s, CH₃), 1.90-1.88 (1 H, m, C6-CH₂); ES m/z (%) 385 [M+H]⁺ (100).

ICT-2552 ve ICT-2588 ('ön ilaç'), deri altı HT1080 ksenograftlarını taşıyan Balb/C farelerine intraperitoneal yolla tek bir doz halinde uygulandı. Dokuz dozaj grubunun her biri 8 fareden oluşuyordu. Bileşiklerin anti-tümör etkileri, tümör hacminin belirlenmesiyle değerlendirildi ve hedef dışı toksisitenin varlığı, fare vücut ağırlığının izlenmesi yoluyla belirlendi.

Dozlama grupları, ICT-2588'in (başlık) molar eşdeğer doza göre ICT-2588'i (ön ilaç) değerlendirdi ve:

- 10% DMSO/ yağ (solvent kontrol)
- 37.5 mg/kg; 50.0 mg/kg; 62.5 mg/kg; 75.0 mg/kg ICT-2588
- 7.5 mg/kg; 10.0 mg/kg; 12.5 mg/kg; 15 mg/kg'de ICT-2552

Sonuçlar

Çalışma boyunca vücut ağırlığında önemli bir kayıp gözlenmedi (Şekil 7).

Tüm farelerin ağırlığı, tolere edilen % 15'lik vücut ağırlık kaybı dahilindeydi, bu nedenle bileşikler, tüm vücut sistemine toksik olarak sınıflandırılmamaktadır.

ORNEK 3

Tümör yanıt çalışması

Sonuçlar

Çalışmanın sonuçları, Şekil 8 ila 10'da ve aşağıdaki Tablolarda gösterilmektedir. Tümör yanıtları, test edilen tüm ICT-2522 ve ICT-2588 doz seviyelerinde gözlenmiştir.

Tablo 1: Tedavi edilmemiş kontrol grubuna göre bileşiklerin antitümör etkinliği

Bileşik	Doz (mg/kg)	RTV2'ye ortalama süre (gün)	Median zaman RTV2 (gün)	Büyüme gecikmesi (gün)	Önem ^a	Maksimum % kilo kaybı (gün) ^b
Kontrol	-	2.3	2.2	-	-	5 (6)
ICT-2588	37.5	4.4	4.2	2.0	p<0.01	3 (3)
ICT-2588	50.0	5.5	6.0	3.8	p<0.01	5 (3)
ICT-2588	62.5 ^c	7.7	7.8	5.6	p<0.01	4 (3)
ICT-2588	75.0	6.8	6.6	4.4	p<0.01	5 (3)
ICT-2552	7.5	4.0	3.8	1.6	p<0.01	3(4)
ICT-2552	10.0	4.4	4.2	2.0	p<0.01	6 (6)
ICT-2552	12.5	4.5	4.7	2.5	p<0.01	6 (1)
ICT-2552	15.0	4.1	4.1	1.9	p<0.01	5 (1)
^a İstatistikler, tümörün 0 günden itibaren ikiye katlanması için geçen süreye dayanarak hesaplandı. ^b Maksimum kilo kaybı % 15 kabul edilen seviyelerde kabul edildi. ^c Bir hayvan tam tümör remisyonu gösterdi (son ölçüm günü 21).						

Tüm tümör büyümesinde önemli bir gecikme, değerlendirilen tüm ICT-2552 (başlık) ve ICT-2588 (ön ilaç) dozlarında gözlemlendi.

Her iki bileşik ile de bileşik dozu ile tümör büyüme gecikmesi derecesi arasında bir ilişki gözlemlenmiştir. Etkileri ICT-2588 (ön ilaç) ile daha iyidir.

Bir hayvan, ICT-2588 ile 62.5 mg/kg'lık bir dozda tam tümör remisyonunu gösterdi.

Tablo 2: Molar eşdeğer dozda uygulanan ICT-2588 (ön ilaç) ve ICT-2552 (başlık) dozu arasındaki antitümör etkinliğinin karşılaştırılması

ICT-2588 (mg/kg) dozu	ICT-2552 (mg/kg) dozu	On ilaçla büyüme gecikmesi (Günl)	Başlıkla büyüme gecikmesi (Gün)	ICT-2588 ve ICT-2552 ekimolar dozları arasındaki farkın önemi ^a
37.5	7.5	2.0	1.6	p>0.05
50.0	10.0	3.8	2.0	p<0.05
62.5 ^c	12.5	5.6	2.5	p<0.05
75.0	15.0	4.4	1.9	p<0.01

^a İstatistikler, tümörün 0 günden itibaren ikiye katlanması için geçen süreye dayanarak hesaplandı.

^c Bir hayvan tam tümör remisyonu gösterdi (son ölçüm günü 21). ICT-2588 (ön ilaç), eşmolar dozlarda uygulandığında, ICT-2522'den (başlık) önemli ölçüde daha yüksek bir antitümör yanıtı indüklemiştir.

ÖRNEK 4

ICT-2588'de yapılan modifikasyonlar

5 i) Fosforile edilmiş amino asit yan zincirlerinin uygulanması yoluyla ön ilaç çözünürlüğünün artırılması

On ilaç çözünürlüğünü arttırmak için, fosforile edilmiş amino asit tarafı, ICT-2588'in peptit sekansı zincirlerine (plazma fosfatazlar tarafından hidrolize edilebilir) sokulur. Fosfat türevli amino asitler, benzil korumalı kısımlar olarak ticari olarak temin edilebilmekte ve sentetik metodolojimizi kullanarak peptitlere dahil edilmektedir. Peptit sekansı içindeki iki bölgenin fosforilasyon modifikasyonunu sentezliyor ve değerlendiriyoruz; P2' (Tyr), P3 (Ser), ve her iki P2' ve P3 (bkz. Şekil 11). Ek olarak, P2' (Tyr) fosforilasyonunun MT-MMP'ler (P1-P1' de bölünme) ve MMP-2 (P1'-P2' de

bölünme) ile ön ilaç aktivasyonu üzerine etkisinin, MMP seçiciliğinin daha da artırılması potansiyeline değinmesini ele alıyoruz.

ii) Ön ilaç kapatma grubunun modifikasyonu yoluyla çözünürlüğün artırılması

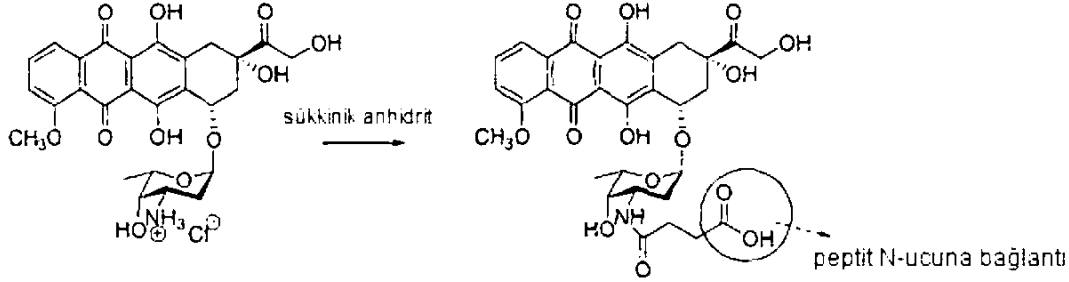
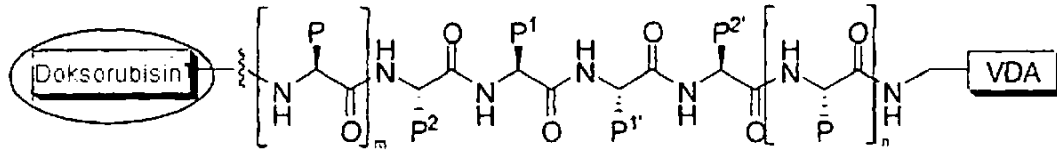
Floresan grubunun, geliştirilmiş çözünürlüğe sahip alternatif ön ilaçlar olarak daha
5 hidrofilik bir grupta değiştirilmesini araştırıyoruz (bkz. Şekil 11). Amacımız MT-MMP
seçiciliği, tümör seçici aktivasyonu ve antitümör aktivitesini muhafaza ederken ön ilaç
çözünürlüğünü arttırmaktır. Bu alternatif uçları ICT2588'e dahil eden ön ilaçlar, HT1080
tümör modelinde ana ön ilaca, ön ilaç stabilitesine ve aktivasyonu, fare plazması ve
karaciğer homojenatı ex vivo, MT-MMP seçiciliğinin korunması ve potansiyel
10 gelişimine göre bileşik çözünürlük açısından değerlendirilmektedir.

iii) Ön ilaçta P2' bölgesinin modifikasyonu

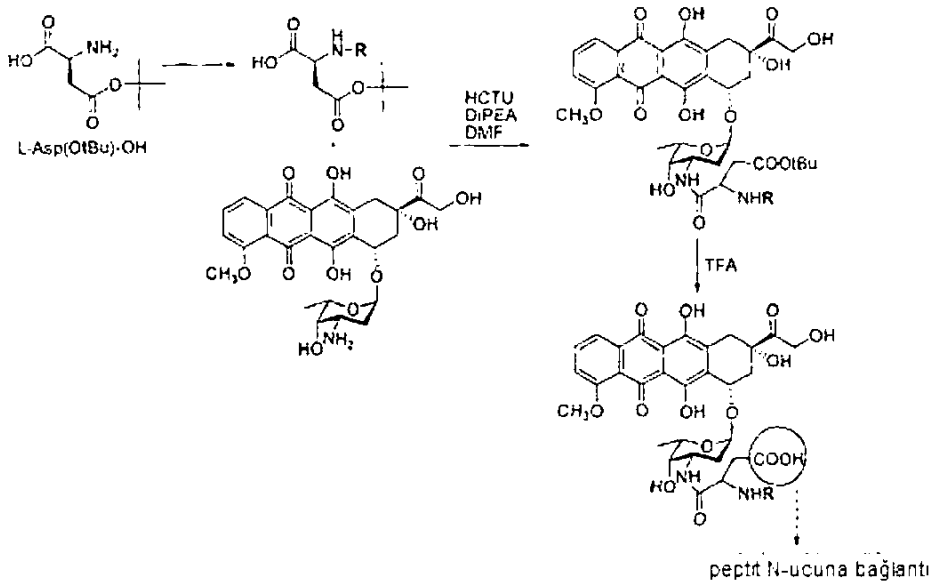
On ilacın P2' bölgesinin (Tyr) modifikasyonunun doku stabilitesi, tümör ayrılması ve
MMP aktivasyonu ex vivo, referans alınarak etkileri değerlendirilmektedir. Odak, hem
15 P1'-P2' hem de P2'-P3' bölgelerinde diğer MT-MMP olmayanlar tarafından
bölündüğünü gösterdiğimiz üzere, P2' ön ilacının bulunduğu bölgedir. Ana amino asit
yan zincir tiplerini (Ala, Asp, Asn, Leu, Ser, Pro) içeren ön ilaç varyantları kullanıyoruz.

iv) Doksorubisin içeren çift başlı ön ilacın geliştirilmesi

ICT2588 ile muameleden sonra, tümör çevresinde ince bir canlı hücre tümör çerçevesi
20 gözlemlendi. Tümör vaskülarizasyonunun mevcut anlayışı, canlı çevrenin, hemen
çevreleyen normal dokuların vaskülatürü ile korunduğunu göstermektedir. Bunun bir
sonucu, VDA salgılayan bir ön ilacın standart kemoterapi ile kombinasyon halinde
uygulanmasının, gözlenen antitümör etkisini daha da artırması gerektiğidir.
Azademetilkolşisin başlığını (ICT2552) ve bir doksorubisin başlığını (uç başlığı yerine)
25 (yukarı bakınız) içeren çift başlı bir ön ilaç geliştiriyoruz. Bu çift başlı ön ilacı HT1080
tümör modelinde, fare plazması ve karaciğer homojenatında ex vivo, ön ilaç stabilitesi
ve aktivasyonu açısından değerlendiriyoruz.

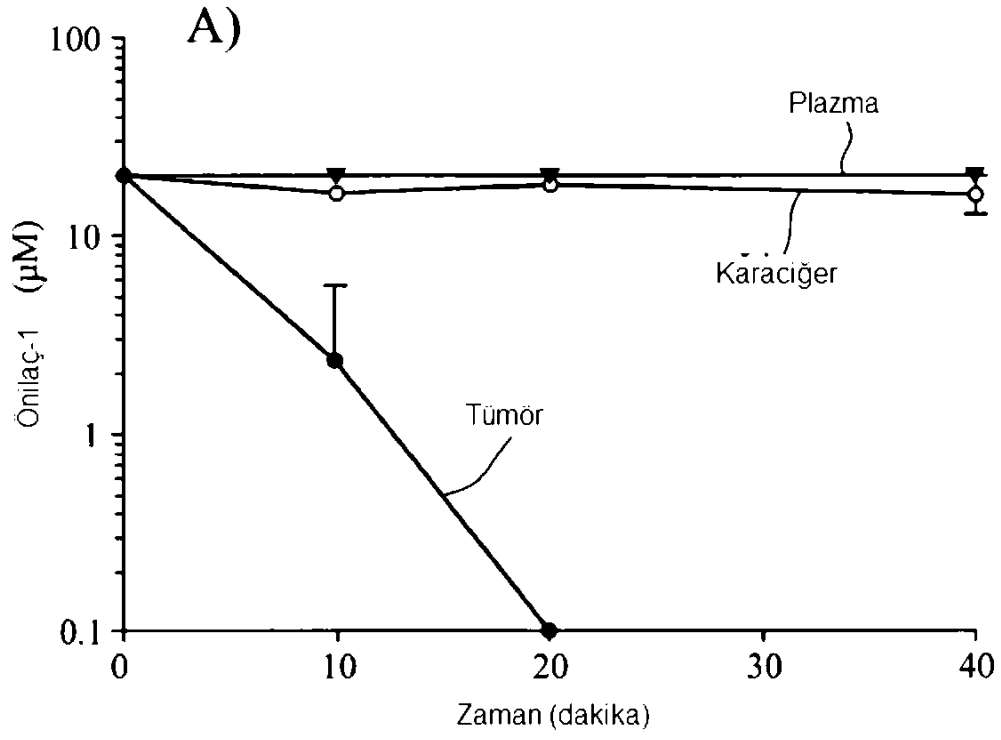


5 Aminde türevlendirme gereklidir, çünkü peptide bağlama N terminal boyunca gerçekleşir. Mevcut strateji, süksinik anhidrid ile asilat yapmaktır; bu, bir amid bağı vasıtasıyla peptide bağlanabilen serbest bir karboksilik asit içeren bir süksinat türevi vermektedir. Değerlendirilecek alternatif strateji, aspartik asidin yan zincirini alkil/ aril bloke edici grup R ile kullanmaktır.

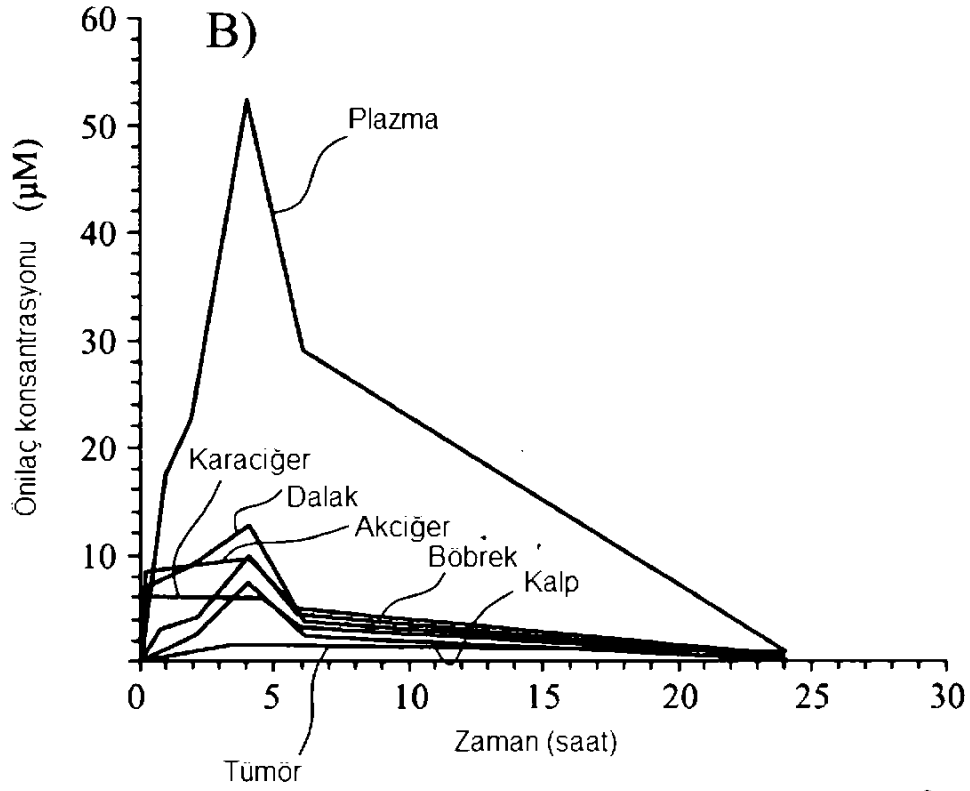


10 Tablo 3, P2' 'nin pozisyonunda değişiklik gösteren bir dizi molekül için stabilite verilerinin bir özetidir. Yarı ömür, dört bağımsız deneyden alınan ortalamadır. Karaciğer, murin karaciğer homojenatını ve tümör, HT1080'i temsil etmektedir.

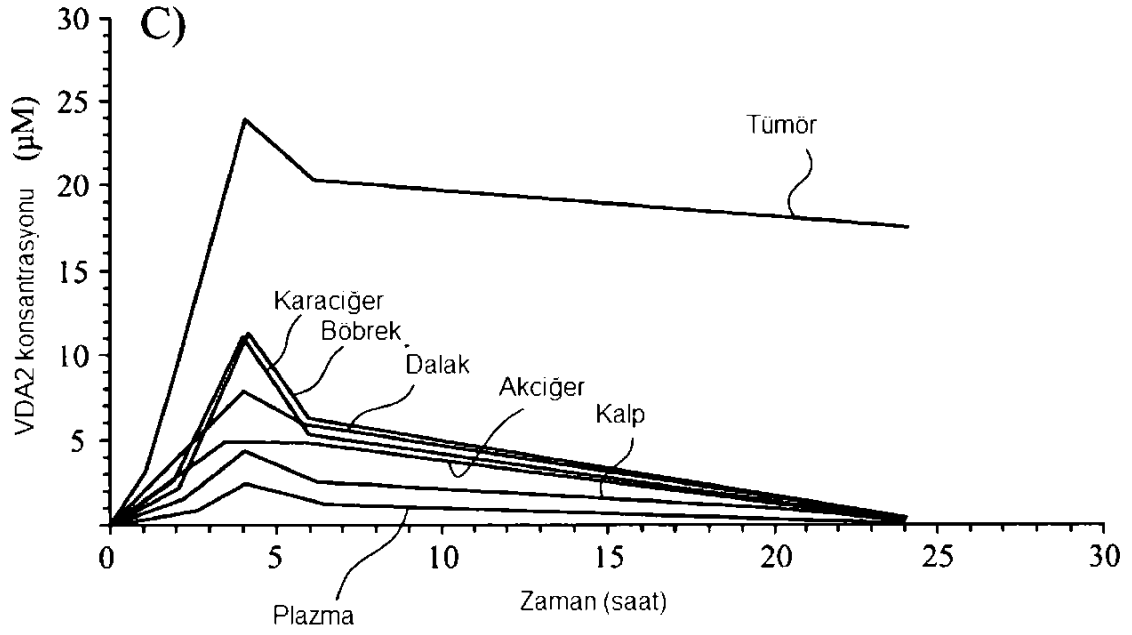
	P2'AA	Karaciğer	Tümör
		t1/2 (dak)	t1/2 (dak)
ICT2588	Tyr	149	33
ICT3055	Asp	67	7
ICT3053	Ala	76	17
ICT3054	Ser	66	9
ICT3078	Asn	76	11
ICT3097	Pro	110	24
ICT3080	Leu	134	48



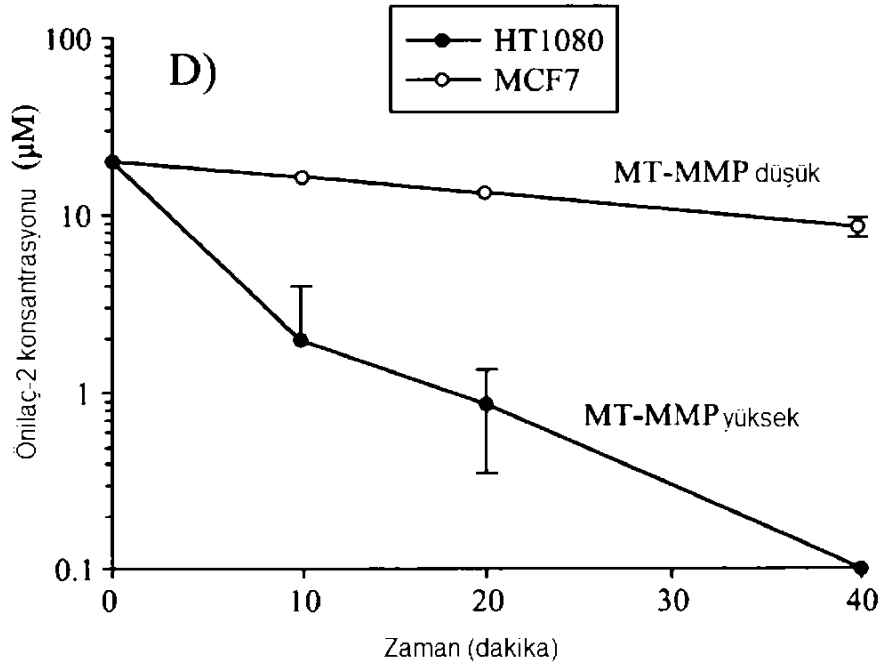
ŞEKİL 1



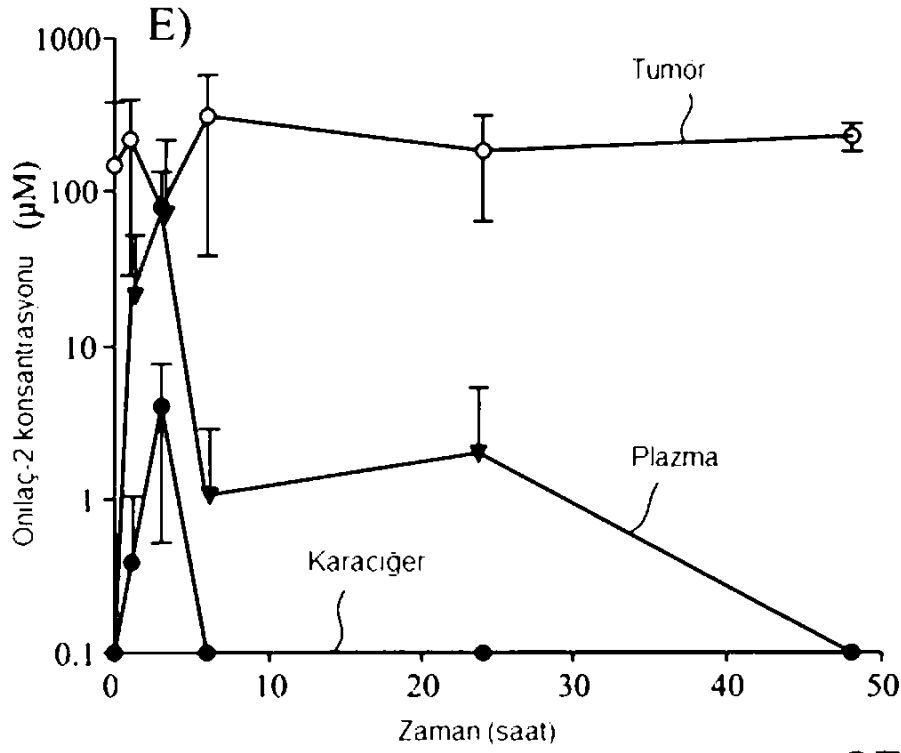
ŞEKİL 2



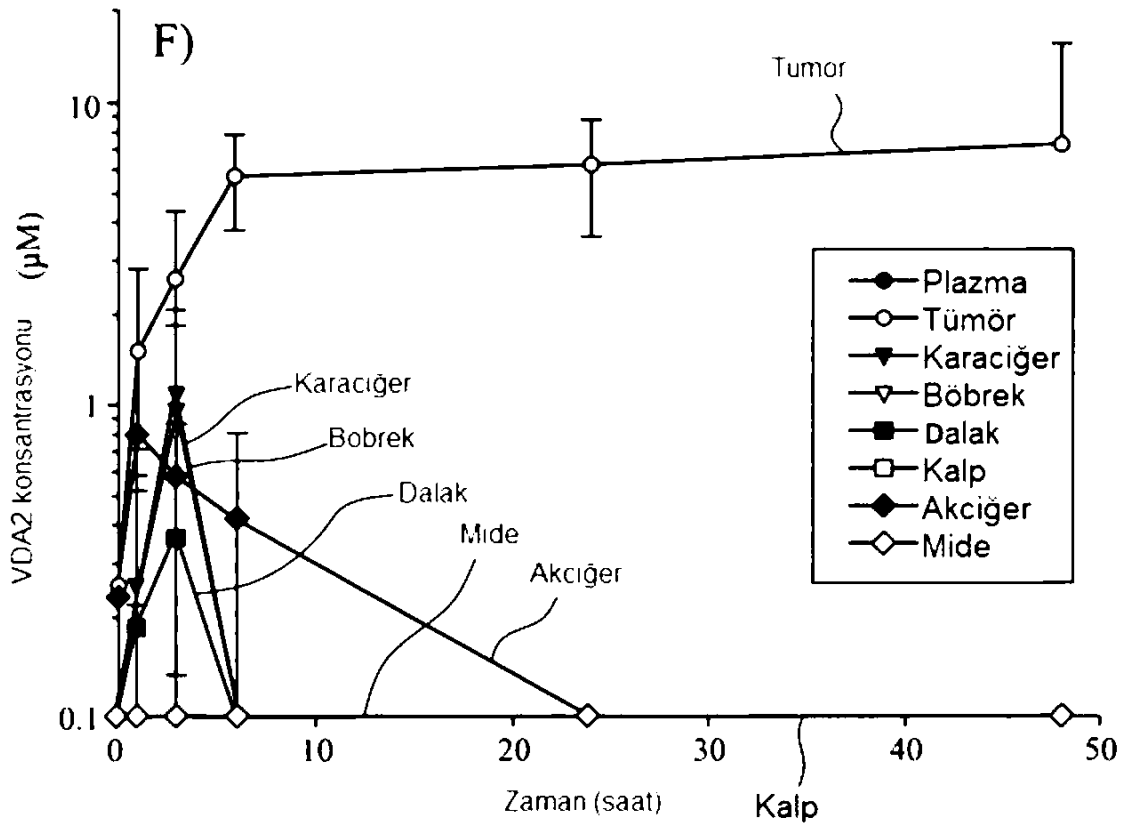
ŞEKİL 3



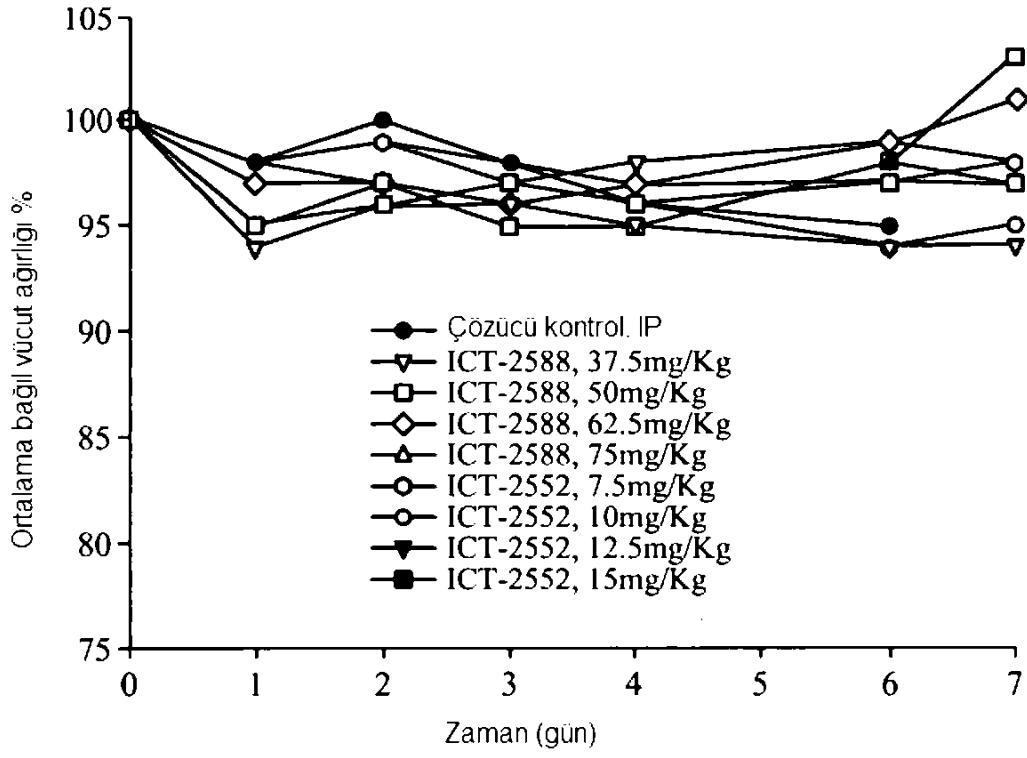
ŞEKİL 4



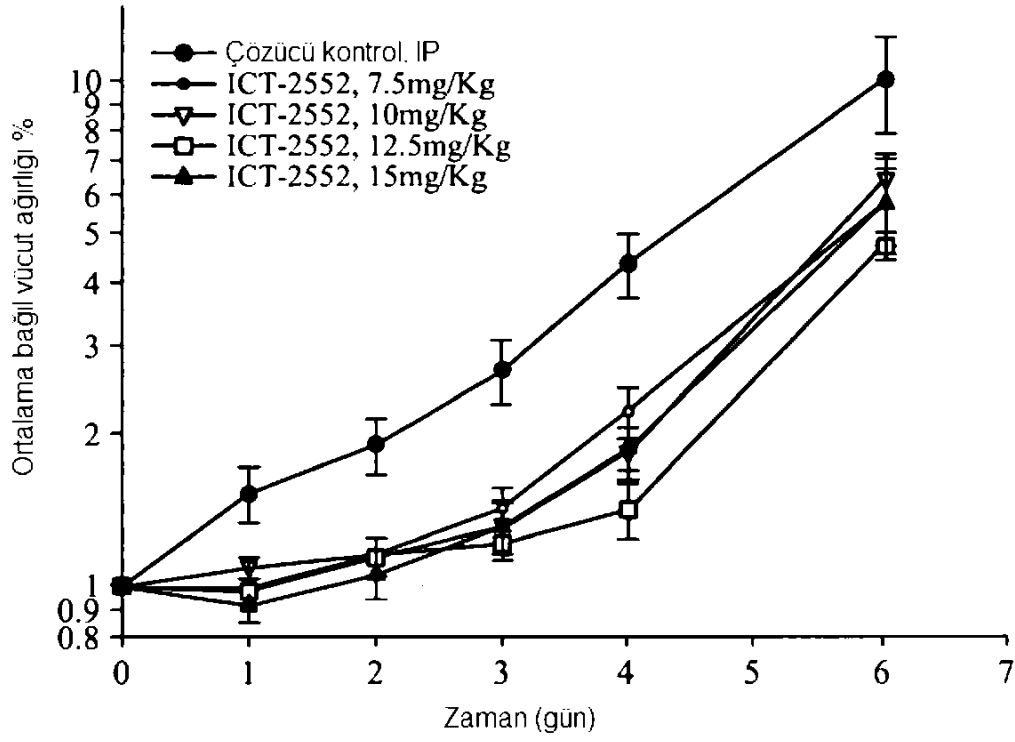
ŞEKİL 5



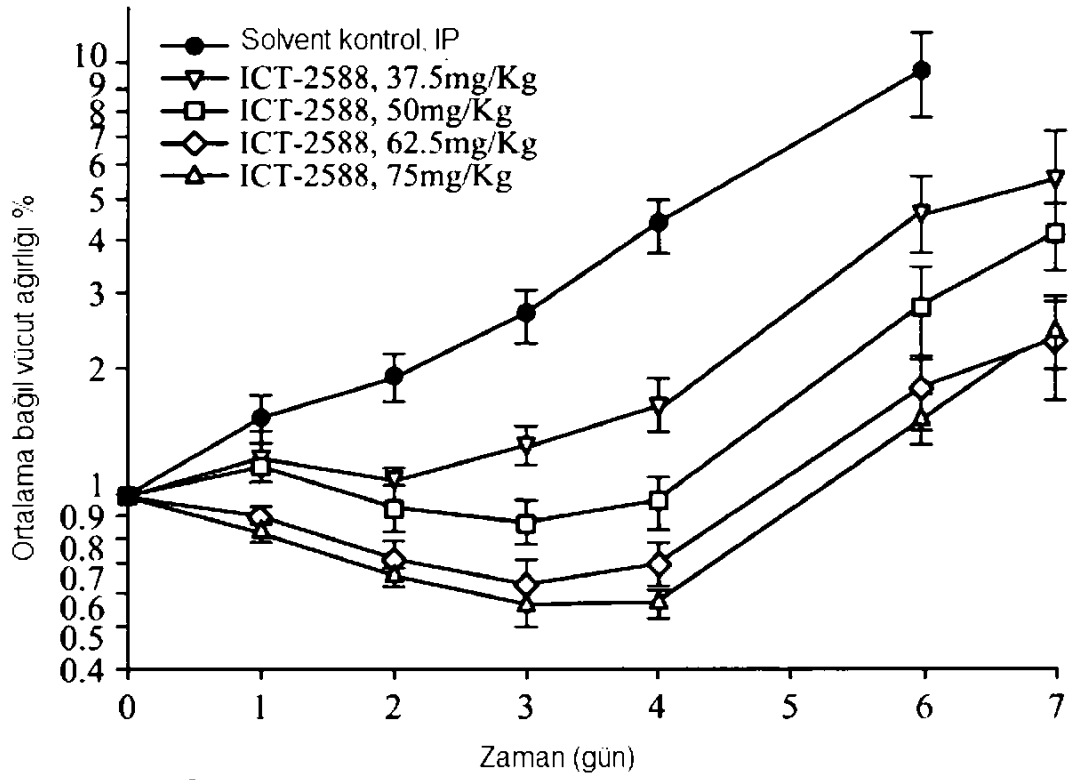
ŞEKİL 6



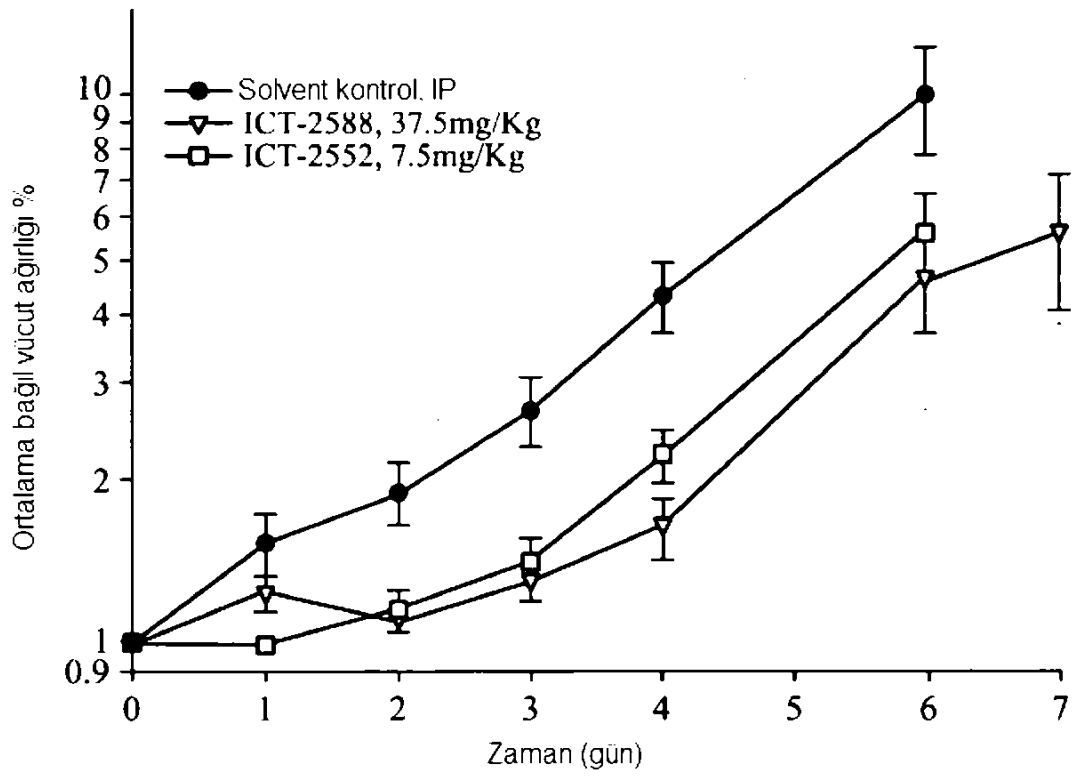
ŞEKİL 7



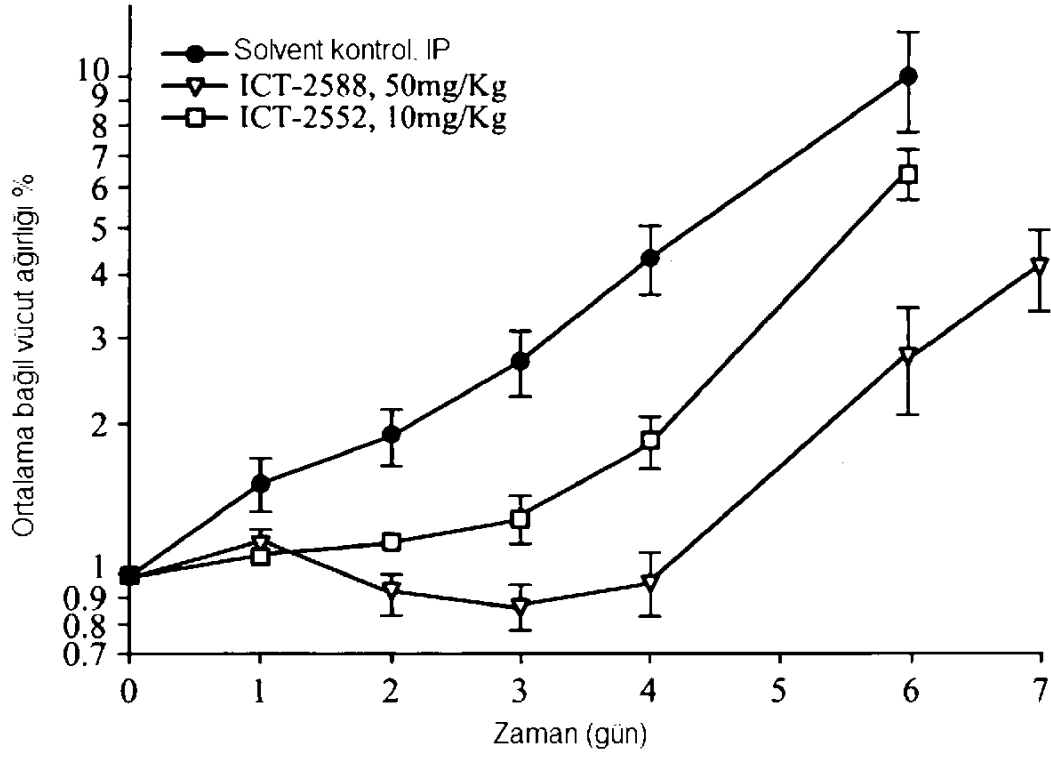
ŞEKİL 8



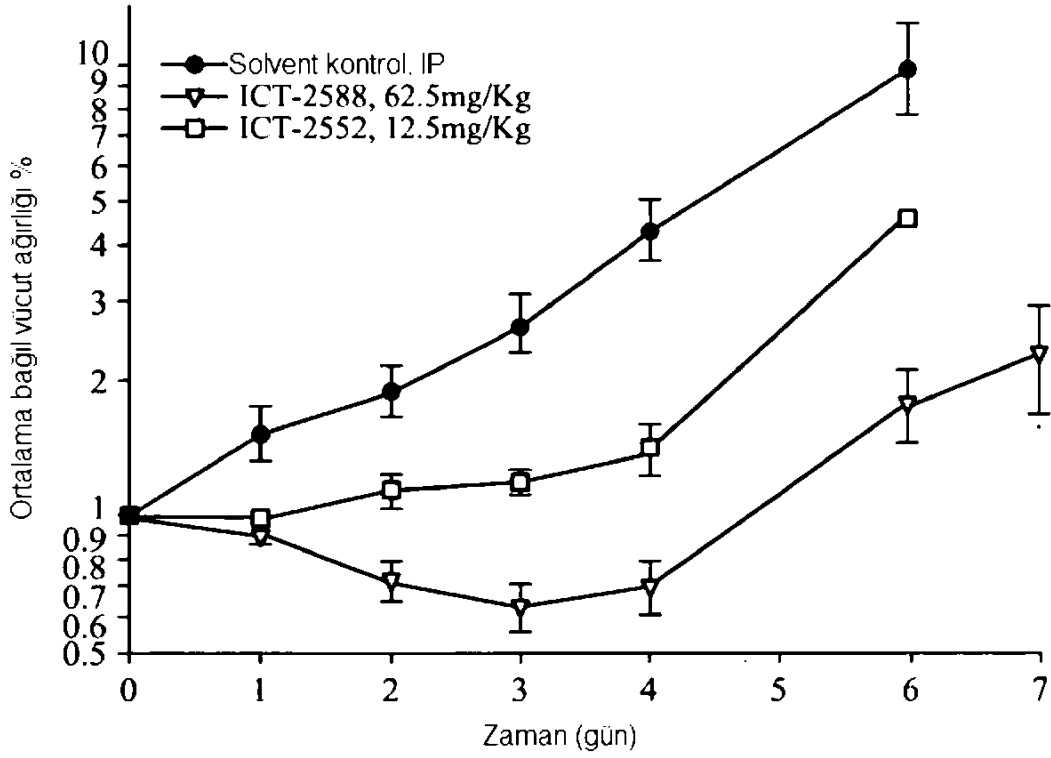
ŞEKİL 9



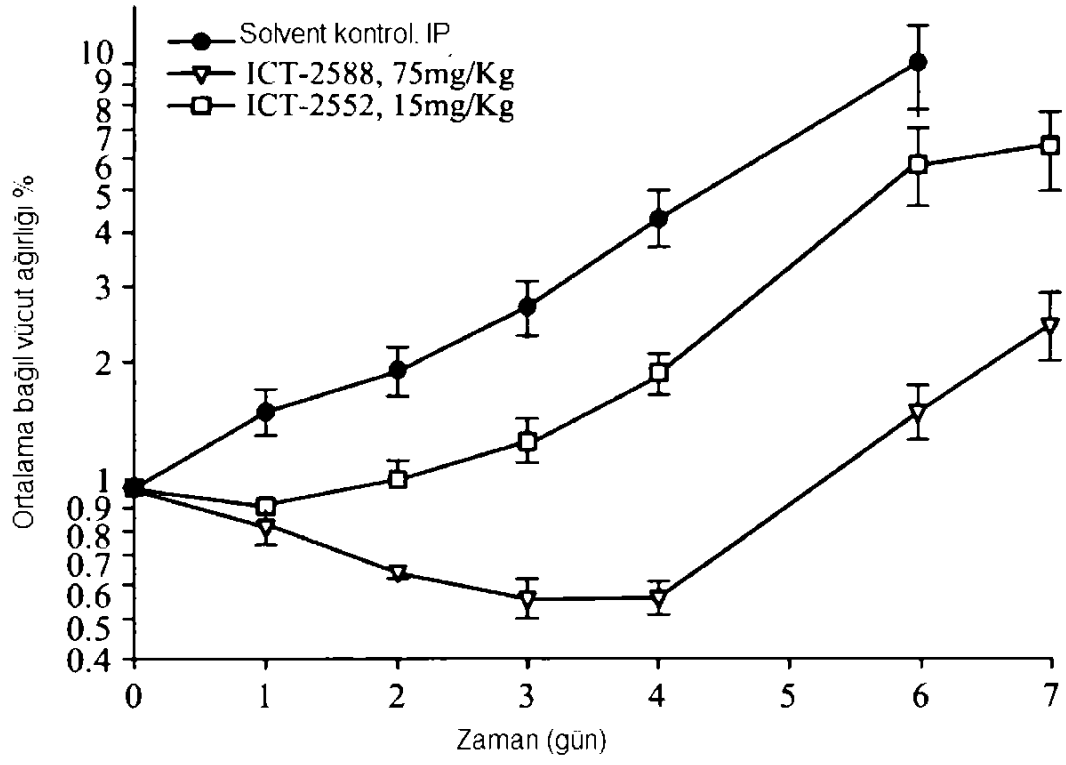
Şekil 10(a)

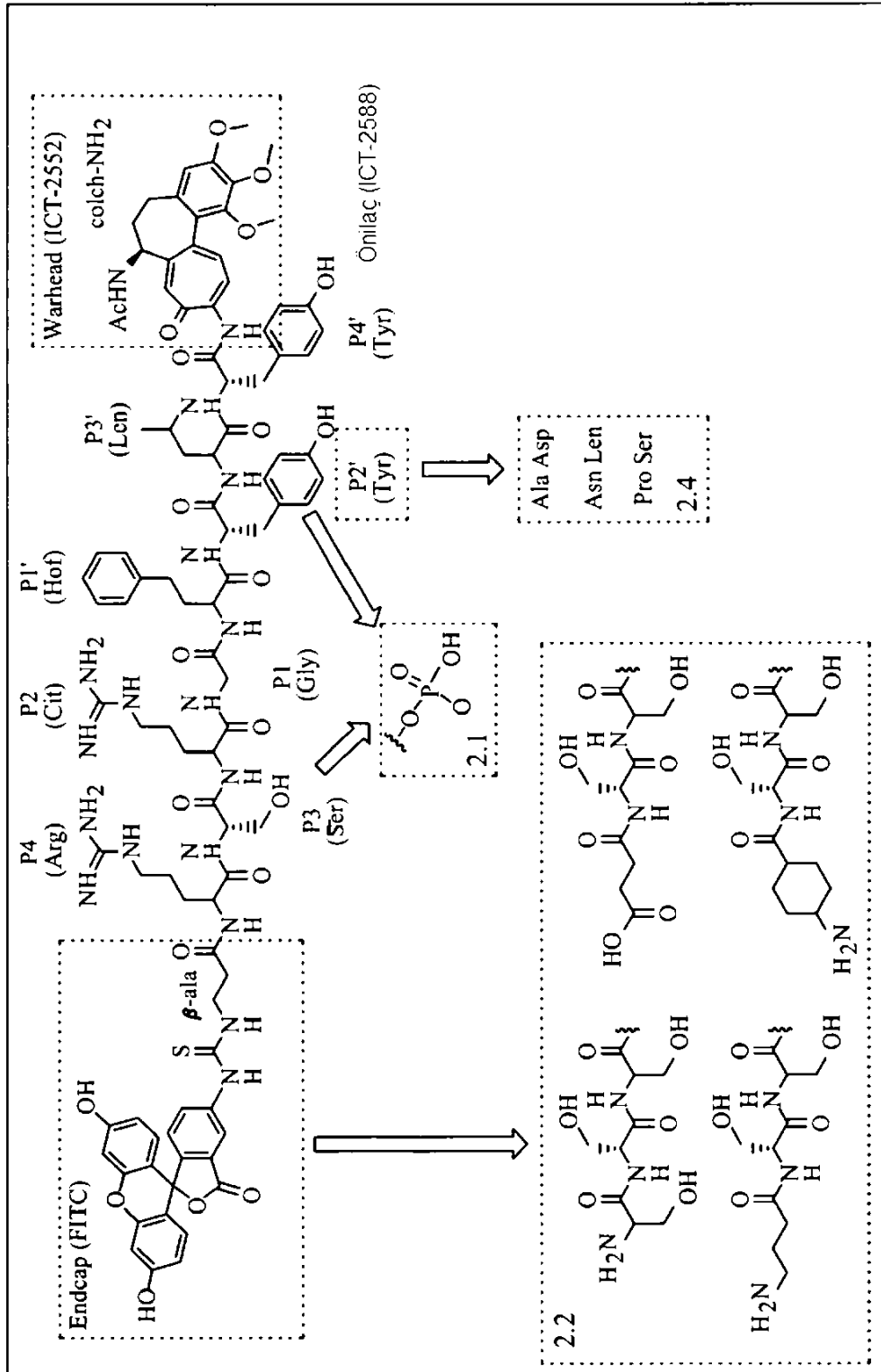


ŞEKİL 10(b)



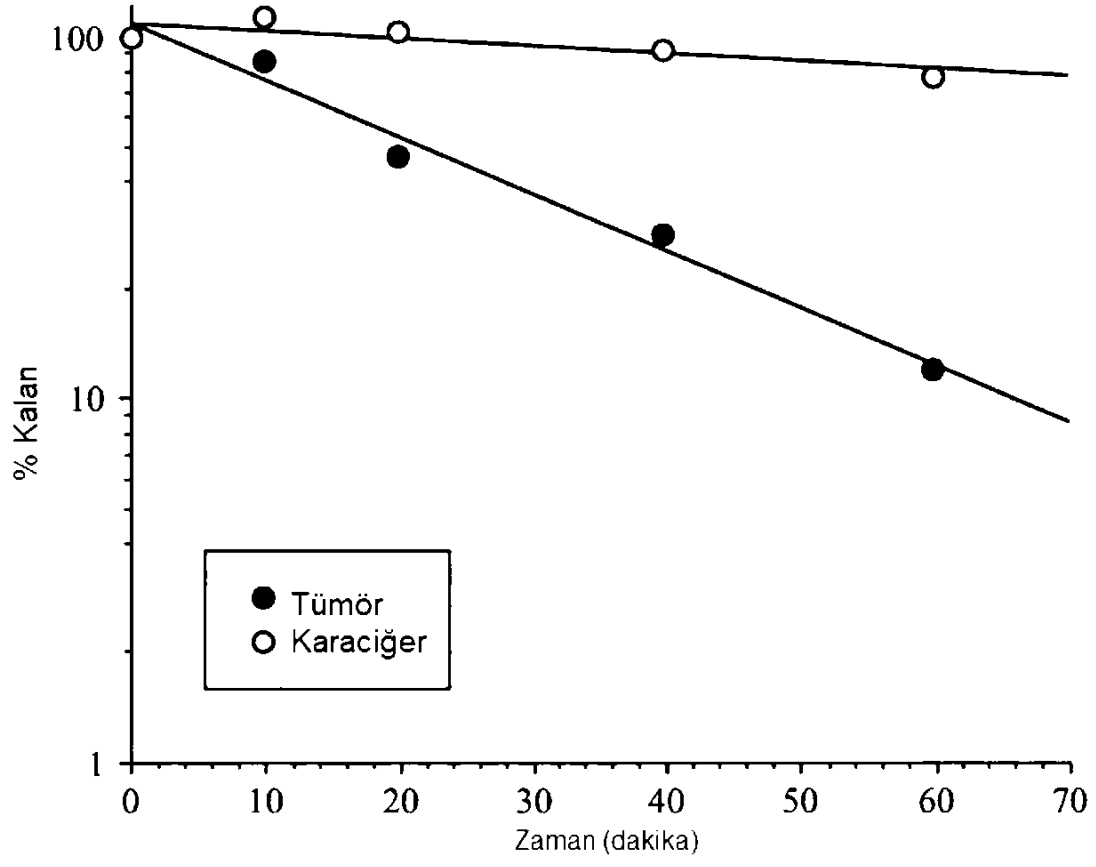
ŞEKİL 10 (c)

**ŞEKİL 10(d)**

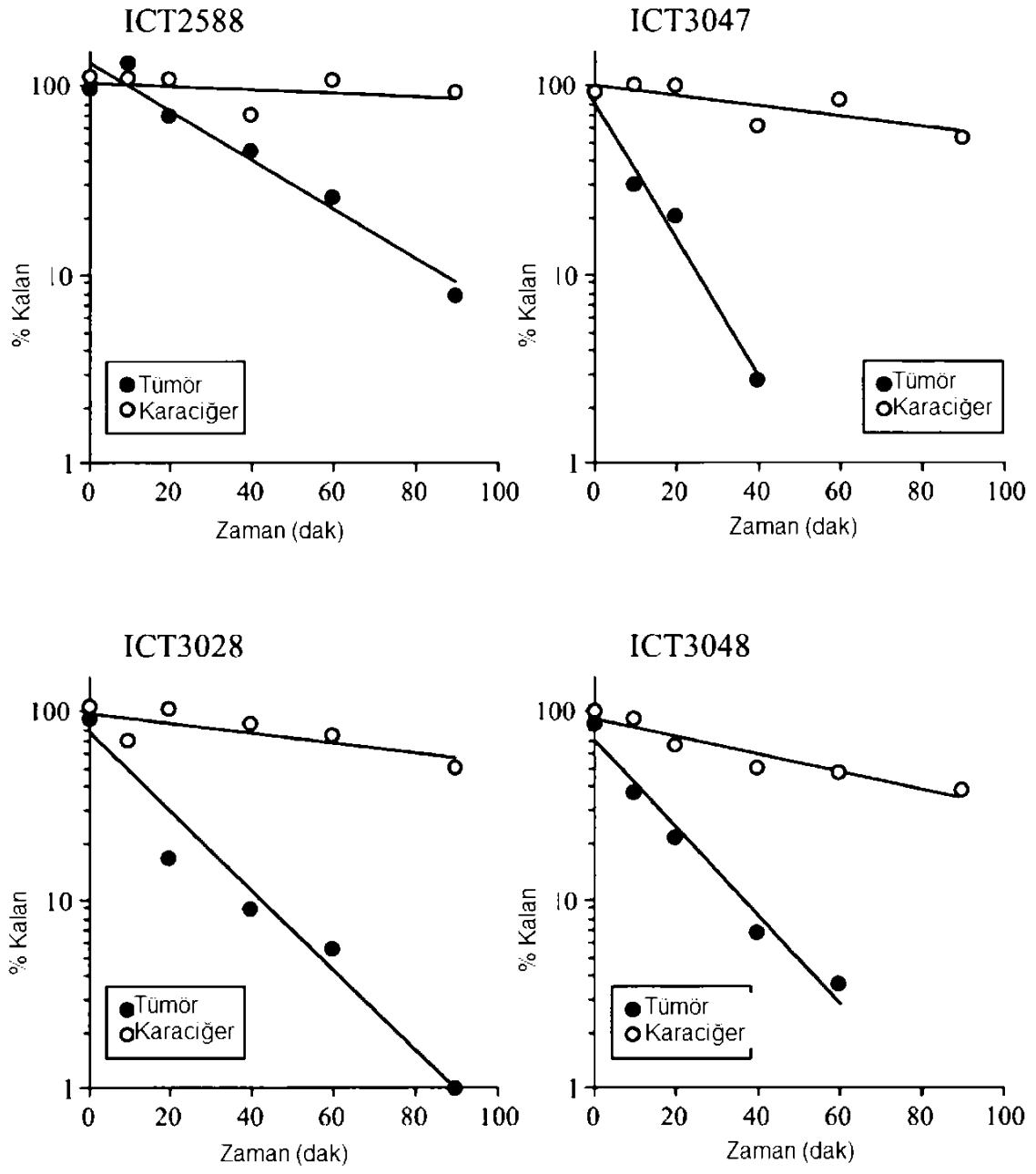


ŞEKİL 11

ICT3053 Ala



ŞEKİL 12



ŞEKİL 13