



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 065**

51 Int. Cl.:
C07D 493/04 (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02791768 .1**
96 Fecha de presentación : **03.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1451193**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

54 Título: **Podofilotoxinas en calidad de agentes antiproliferativos.**

30 Prioridad: **03.12.2001 DE 101 60 515**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2011

73 Titular/es: **Universitätsklinikum Charité der
Humboldt- Universität zu Berlin
Technologietransferstelle
10098 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Wrasidlo, Wolfgang;
Lode, Holger, N. y
Gaedicke, Gerhard**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 354 065 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

Los lignanos, tales como podofilotoxina y sus metabolitos/precusores, son parte de la ruta de los fenilpropanoides y están ampliamente distribuidos a través del reino vegetal. Se sabe que algunos de ellos, en particular la propia podofilotoxina, tienen propiedades anticancerosas, antifúngicas y/o antimicrobianas. La podofilotoxina se extrajo en primer lugar de podofilo (*Podophyllum peltatum*) y de especies de *Linum*, tales como *Linum album*, *Linum flavum* y *Linum nodiflorum*, como una resina y fue usada por los médicos en las zonas del sur de los EE. UU. de A. a finales del siglo 19 para el tratamiento de verrugas genitales, estando asociadas las últimas con algunas partes de cáncer a través de su etiología por el papilomavirus humano (HPV). La podofilotoxina ha alcanzado un particular interés como la molécula parental de fármacos quimioterapéuticos tales como etopósido, tenipósido y etopofos, que son inhibidores de topoisomerasa II. En la actualidad, la demanda de podofilotoxina supera de lejos el suministro global, que se ha hecho insuficiente debido al crecimiento lento y la sobreexplotación de las plantas silvestres. Para compensar el suministro limitado de podofilotoxina se han llevado a cabo intentos de cultivar células de *Podophyllum peltatum* y *Linum album* que, en alguna extensión, han sido satisfactorios. Los derivados semisintéticos, etopósido y tenipósido, son importantes fármacos anticancerosos ampliamente usados, pero tienen varias limitaciones, tales como escasa solubilidad en agua, desactivación metabólica y el desarrollo de resistencia al fármaco. Para vencer estas limitaciones, se han sintetizado en muchos laboratorios derivados de podofilotoxina (Yin et ál., *acts pharm. Sinica* 1993, 28,758-761, Wang et ál., *acta chem. Sinica* 1992, 50, 698-701, Chang et ál., *J. med. chem.* 1994, 37446-442, Pelter et ál., *J. nat. prod.* 1994, 57, 1598-1602). Sin embargo, ninguno de estos ha dado como resultado una mejora sustancial ni en términos de eficacia ni de prevención de efectos secundarios.

El etopósido es un fármaco anticanceroso muy eficaz ampliamente usado contra un gran espectro de tumores incluyendo cánceres pediátricos tales como linfomas linfáticos agudos, rabdomiosarcomas y neuroblastomas, así como en la mayoría de los cánceres comunes del adulto. También se usa en regímenes de acondicionamiento para el trasplante de médula ósea. Sin embargo, el uso terapéutico de etopósido está limitado por su toxicidad que implica principalmente mielosupresión.

Uno de los principales retos para una quimioterapia satisfactoria en el cáncer en general y la leucemia de alto riesgo en particular es vencer la resistencia a múltiples fármacos. La mayoría de los pacientes responde inicialmente al tratamiento con combinaciones de diversos agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, la poliquimioterapia puede inducir clones celulares resistentes a múltiples fármacos (MDR) que continúan proliferando en presencia de agentes citotóxicos (Dalton WS. *Mechanism of drug resistance in hematologic malignancies Semin Hematol.* 1997; 34:3-8). La reducción de la quimiosensibilidad en tales clones celulares requeriría la administración de agentes citostáticos en cantidades que superan la dosis máxima tolerada in vivo. Uno de los mecanismos de resistencia mejor caracterizado en leucemias y carcinomas es la extrusión del fármaco mediada por p-glicoproteína, el producto del gen de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR-1), que se ha observado que está asociado con resultados pobres (Hunault M, Zhou D, Delmer A et ál. *Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognosis significance for in vivo drug resistance to induction treatment. Ann Hematol.* 1997; 74:65-71; Marie JP, Zhou DC, Gurbuxani S, Legrand O, Zittoun R. *MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. Eur J Cancer.* 1996; 32A:1034-1038.).

Se ha desarrollado una variedad de estrategias para evitar o sortear la resistencia a fármacos desde la introducción de la poliquimioterapia. Los esfuerzos para vencer la resistencia a fármacos establecida en pacientes se dirigen a (i) planificación, es decir, terapia prolongada a dosis bajas tal como antifolatos en leucemia reincidente o administración de dosis altas a corto plazo, p. ej. antifolatos con rescate con folato subsiguiente en el osteosarcoma, (ii) terapia de combinación con sensibilizadores químicos tales como inhibidores de MDR-1 en el caso de resistencia mediada por MDR y (iii) combinación de quimioterapia con sensibilizadores no químicos tales como radioterapia, hipertermia u oxígeno hiperbárico (Dalton WS. *Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies. Semin Hematol.* 1997; 34:3-8; Joel SP, Slevin ML. *Schedule-dependent topoisomerase II-inhibiting drugs. Cancer Chemother Pharmacol.* 1994; 34 Supl: S84-S88; Ishikawa T, Kuo MT, Furuta K, Suzuki M. *The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design. Clin Chem Lab Med.* 2000; 38:893-897).

Solo se han realizado unos pocos intentos de modificar directamente el agente citostático a fin de encontrar análogos que evadan activamente mecanismos de resistencia a fármacos tales como análogo de doxorubicina desaminada (Solary E, Ling YH, Pérez-Soler R, Priebe W, Pommier Y. *Hydroxyrubicin, a deaminated derivative of doxorubicin, inhibits mammalian DNA topoisomerase II and partially circumvents multidrug resistance. Int J Cancer.* 1994; 58:85-94.) y beta-aminoderivados de etopósido (Zhang YL, Guo X, Cheng YC, Lee KH. *Antitumor agents. 148. Synthesis and biological evaluation of novel 4*

betaamino derivatives of etoposide with better pharmacological profiles. *J Med Chem.* 1994; 37:446-452; Zhang YL, Shen YC, Wang ZQ et ál. Antitumor agents, 130, Novel 4 beta-arylamino derivatives of 3',4'-didemethoxy-3',4'-dioxo-4-deoxypodophyllotoxin as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J Nat Prod.* 1992; 55:1100-1111.). Así, posibles soluciones a fallos relacionados con la MDR incluyen el diseño racional de fármacos que no estén afectados por mecanismos de MDR y exhiban toxicidad sistémica reducida y potencia antitumoral incrementada.

La resistencia contra etopósido se produce a distintos niveles celulares, que implican la regulación a la baja de la enzima diana topoisomerasa II, la regulación a la baja de mecanismos proapoptóticos o la regulación al alza de mecanismos antiapoptóticos tales como bcl-2, y el metabolismo y/o la extrusión incrementados del fármaco procedente de la célula mediados por sistemas de transporte. La inducción de tales sistemas de transporte conduce frecuentemente a resistencia cruzada contra otros agentes citostáticos, según se observa para resistencia a múltiples fármacos mediada por MDR-1, MRP o LRP (Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 1993; 53:747-754; Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:1295-1302; Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1461:347-357). Un mecanismo principal de la resistencia a fármacos, que se documenta que se presenta en enfermedades malignas hematológicas, es la sobreexpresión del producto génico de MDR-1, P-glicoproteína. Por lo tanto, los intentos de vencer la resistencia a fármacos mediada por sistemas de transporte se enfocaron así muy principalmente a la modulación de la expresión de MDR-1 (Liu C, Qureshi IA, Ding X, et ál. Modulation of multidrug resistance gene (mdr-1) with antisense oligodeoxynucleotides. *Clin Sci (Colch).* 1996; 91:93-98.) o la coadministración de inhibidores de MDR-1 tales como ciclosporina (Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM et ál. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. *Lancet.* 1992; 340:255-259.), verapamil (Joly P, Lallemand A, Oum'Hamed Z, Trentesaux C, Idoine O, Desplaces A. Effects of verapamil and S9788 on MDR-1 mRNA expression studied by in situ hybridization. *Anticancer Res.* 1996; 16:3609-3614.) o valspodar (Tai HL. Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG. *Curr Opin Mol Ther.* 2000; 2:459-467.), todos los cuales revelaban una eficacia limitada in vitro e in vivo. Estas proteínas de transporte de membrana extruyen una gama sorprendentemente amplia de sustratos con estructuras totalmente diferentes, posiblemente debido al hecho de que los metabolitos comunes, tales como glucurónido, glutatión o sulfato, más que los fármacos diferentes, son reconocidos específicamente (Zhu BT. A novel hypothesis for the mechanism of action of P-glycoprotein as a multidrug transporter. *Mol Carcinog.* 1999; 25:1-13.). Por lo tanto, estos mecanismos de resistencia se asemejan al sistema de ubiquitina, en el que una plétora de proteínas totalmente diferentes son "etiquetadas" con ubiquitinas a fin de ser reconocidas en primer lugar y a continuación degradadas por proteasomas. Estas modificaciones del fármaco que interfieren con el "etiquetado" molecular dan como resultado nuevas moléculas que no pueden depurarse de células tumorales resistentes a múltiples fármacos.

Se han realizado algunos intentos de sintetizar derivados de etopósido que permitan una orientación más específica del etopósido a los tejidos diana. El documento EP0423747 presenta la síntesis de profármacos de glicosiletopósido que mediante la acción de conjugados enzimáticos específicos de tumores pueden escindirarse en el fármaco de etopósido eficaz y un residuo glicosílico, con lo que, debido a los conjugados enzimáticos específicos de tumores, el fármaco se activa sólo en su sitio de acción preferido. (cfr. además el documento US4975278). Shabat et ál. (*PNAS*, vol. 98, 13, 7528-7533) describen la síntesis de un sistema anticuerpo-profármaco basado en etopósido en el que el grupo OH 4'-fenólico estaba enmascarado por un compuesto de carbamato aldólico. Sin embargo, tal profármaco solo no mostraba actividad antitumoral, a no ser que se combinara con un anticuerpo catalítico 38C2, que activa el profármaco para dar etopósido. Los profármacos descritos en Shabat et ál. solo son activados por reacciones retro-Michael/retro-aldólicas que no se presentan en la naturaleza. Solo las enzimas artificiales, como el anticuerpo catalítico 38C2, pueden catalizar la conversión. El manejo y el uso de tal profármaco se hace más difícil por el requerimiento adicional de la coaplicación de un anticuerpo catalítico que cataliza la conversión en el fármaco activo. Por lo tanto, ninguno de los profármacos mencionados anteriormente han resultado particularmente útiles en el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

Profármacos de diversos agentes antitumorales se han sintetizado a fin de mejorar su biodisponibilidad, farmacocinética y solubilidad acuosa. El documento W099/30561 describe un profármaco basado en nucleótidos en el que la liberación y la activación del componente farmacológico surge de la hidrólisis del enlace éster de conexión que empalma el componente nucleotídico al componente farmacológico.

El documento US4.975.278 describe un método para el aporte de fármacos citotóxicos a células tumorales mediante la administración de un conjugado de anticuerpo-enzima específico para un tumor que se une a las células tumorales, y la administración adicional de un profármaco que se convierte en la

zona del tumor, en presencia de la enzima unida a anticuerpo, en un fármaco citotóxico activo. Este concepto se ha usado junto con 4'-fosfato de etopósido o 7-(2'-aminoetil-fosfato)-mitomicina. De nuevo, esto ha sido de una utilidad limitada hasta ahora.

5 El documento W094/13324 describe la conversión de fármacos en profármacos al convertir sus grupos funcionales correspondientes en derivados de 1-O-alquil-, 1-O-acil-, 1-S-acil- y 1-S-alquil-sn-glicero-3-fosfato. Ninguno de los profármacos presentados del documento W094/13324 ha resultado particularmente eficaz en el tratamiento de cánceres.

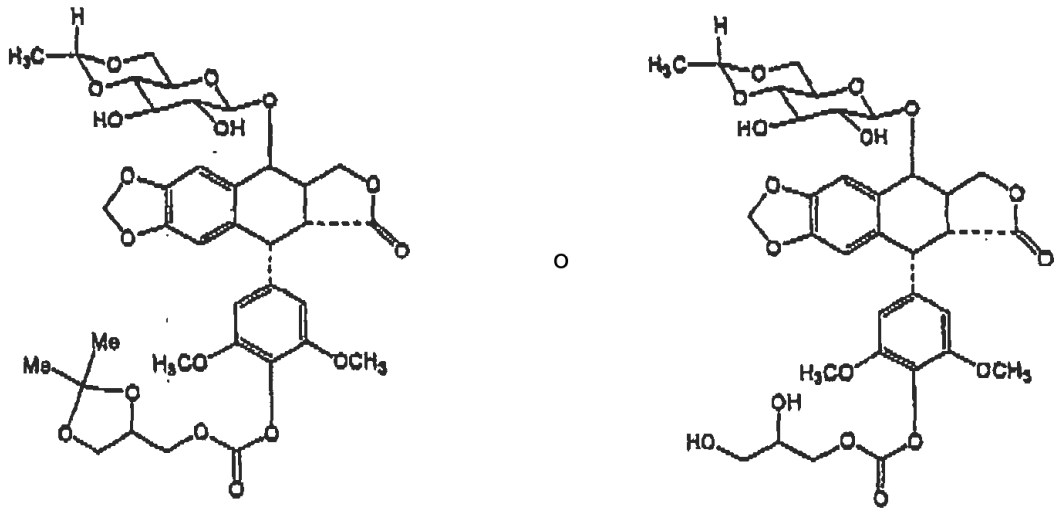
10 El documento W098/13059 presenta profármacos que comprenden un péptido protegido amino-terminal que es un sustrato para una peptidohidrolasa situada sobre la superficie de una célula metastática. El fármaco anticanceroso usado típicamente con ese propósito es doxorubicina, taxol, camptotecina, mitomicina C o esperamicina. La peptidohidrolasa que hidroliza el sustrato del profármaco es típicamente catepsina B.

La Patente de EE. UU. N° 5.977.065 describe profármacos de actinomicina D, doxorubicina, mitomicina C o mostaza nitrogenada que surgen de una reacción con cloroformiato de 4-nitrobencilo.

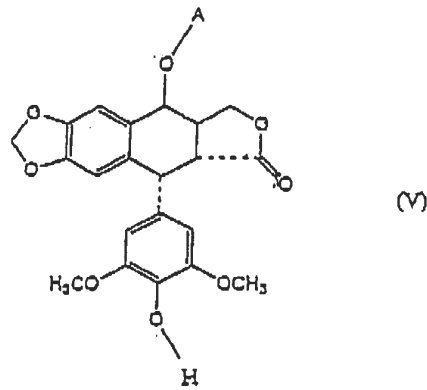
15 La Solicitud de Patente Europea EP 0320988 de Bristol-Myers Company divulga 4'-ésteres, 4'-carbonatos y 4'-carbamatos de glucósidos de 4'-desmetilepipodofilotoxina para los que se presenta una cierta actividad antitumoral en animales. Los compuestos divulgados en el documento EP 0320988 no son capaces de vencer la resistencia a múltiples fármacos.

20 Nicolaou (Nature 1993, 364, 464) y Niethammer et ál. (Bioconj. Chem. 2001, 3, 414) presentan un profármaco de paclitaxel bloqueado en el grupo hidroxilo de C7 con una cadena lateral de dihidroxipropilo que puede escindirse hidrolíticamente mediante un mecanismo de liberación lenta dependiente del pH. El profármaco resultante mostraba algunas ventajas en relación con el fármaco original en que era más soluble en agua y podía usarse a 3 veces por encima de la dosis tolerada máxima (MTD). El paclitaxel es un agente anticanceroso que se usa particularmente en cánceres de mama, pulmón y ovario. Se sabe que promueve la polimerización irreversible de tubulina interrumpiendo de ese modo la división celular mediante la detención del ciclo celular en la fase G2 premitótica. Un segundo mecanismo citotóxico del paclitaxel es ayudar a la inducción de TNF alfa, un episodio no relacionado con la polimerización de los microtúbulos. Los profármacos de paclitaxel descritos en las publicaciones mencionadas anteriormente son inestables en solución acuosa y se hidrolizan espontáneamente. Por lo tanto, la utilidad de los profármacos presentados en Niethammer et ál. es muy limitada. Hasta ahora, no se han presentado profármacos en relación con el etopósido que muestren una eficacia sustancialmente mejorada y efectos secundarios muy reducidos en comparación con la molécula parental. De acuerdo con esto, un objetivo de la invención ha sido proporcionar un profármaco de podofilotoxinas que reduzca sustancialmente las reacciones adversas cuando se administre a un paciente. También ha sido un objetivo de la invención proporcionar profármacos de podofilotoxinas que sean estables en soluciones acuosas, y sin embargo no requieran la aplicación de anticuerpos catalíticos para su conversión en el fármaco activo. También ha sido un objetivo de la invención proporcionar profármacos de podofilotoxinas que permitan una liberación lenta del fármaco en la zona de acción pretendida, es decir, un tumor. También ha sido un objetivo de la presente invención proporcionar profármacos de podofilotoxinas que sean capaces de vencer la resistencia a múltiples fármacos comúnmente encontrada con la molécula parental del fármaco. Por otra parte, ha sido un objetivo proporcionar un método para preparar tales profármacos así como una composición farmacéutica que comprende tales profármacos así como proporcionar usos potenciales de tales profármacos y tal composición farmacéutica.

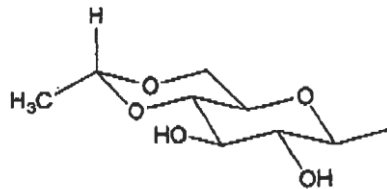
Este objetivo se alcanza mediante una podofilotoxina representada por la fórmula



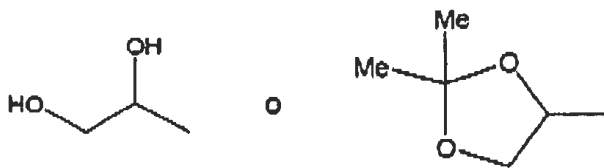
Los objetivos de la presente invención también se alcanzan mediante un método para preparar una podofilotoxina, caracterizado porque un compuesto como el representado por la fórmula V



5 siendo A



se hace reaccionar con un haloformiato $W-(C=X)-(Y)-(CH_2)_n-Z$, en el que X, Y son O, $n=1$ y Z es



y siendo W Cl, F, Br o I,

o caracterizado porque un compuesto como el representado por la fórmula V se hace reaccionar con fosgeno o cloroformiato de triclorometilo, para dar un producto intermedio de cloroformiato de 4'-fenol,

- 5 haciéndose reaccionar a continuación dicho producto intermedio de cloroformiato de 4'-fenol con un alcohol de la fórmula ZYH, para dar el carbonato correspondiente Y=O, y siendo Z como se define anteriormente.

Preferiblemente, el compuesto que se representa mediante la fórmula V se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo que comprende cloroformiato de solcetal y cloroformiato de PEG.

- 10 En una realización del método de acuerdo con la presente invención, el producto resultante del método que se describe anteriormente se hidroliza.

Los objetivos de la presente invención también se alcanzan mediante una composición farmacéutica que comprende una podofilotoxina de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Los objetivos de la presente invención también se alcanzan mediante un uso de una podofilotoxina de acuerdo con la presente invención o de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares, en donde, preferiblemente, el trastorno proliferativo celular es en un niño, un adolescente o un adulto.

- 20 A fin de crear profármacos hidrolíticamente activados de etopósido VP-16 como moléculas precursoras inactivas que se activan mediante hidrólisis, se sintetizaron derivados del grupo hidroxifenólico en 4'. En estudios previos, podía demostrarse que este grupo hidroxifenólico en 4' es muy importante para la actividad citotóxica del etopósido ya que un conector estable condensado a ese grupo OH disminuía la citotoxicidad en >3 logaritmos (Shabat D, Lode HN, Perl U, et ál. In vivo activity in a catalytic anti body-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:7528-7533.). Sin embargo, los profármacos presentados por Shabat eran ineficaces para conferir citotoxicidad y no mostraban actividad antitumoral a no ser que se combinaran con el anticuerpo catalítico 38C2 que activa esos profármacos para dar el fármaco activo. Los profármacos presentados en Shabat et ál. solo son activados por reacciones retro-Michael-retro-aldólicas que no se producen en la naturaleza, de modo que tienen que añadirse un anticuerpo catalítico o enzimas específicamente adaptadas que sean capaces de catalizar la conversión. En contraste con esto, los profármacos de la presente invención son activados por una reacción de hidrólisis simple, y no obstante son estables a una amplia gama de valores de pH bajo condiciones fisiológicas normales.

- 35 En contraste con el paclitaxel, las podofilotoxinas, en particular el etopósido, son inhibidores de topoisomerasa II, con una amplia gama de aplicaciones en enfermedades malignas humanas, incluyendo tumores sólidos y leucemias, que son distintas del campo de aplicaciones del paclitaxel. Por ejemplo, el etopósido se emplea para el tratamiento de leucemia linfática aguda, leucemia mielótica aguda, neuroblastoma y rhabdomyosarcoma. En contraste con los profármacos de paclitaxel que se han presentado en las publicaciones mencionadas anteriormente (en particular Niethammer et ál.), los profármacos de la presente invención son mucho más estables en soluciones acuosas bajo condiciones fisiológicas, y no obstante pueden hidrolizarse fácilmente mediante cambios de pH apropiados. Sin querer limitarse por una teoría, se cree actualmente que una razón para esa estabilidad inesperada es la naturaleza hidrófoba de la parte "sur" de la molécula (es decir, en el anillo fenólico), en combinación con la bolsa hidrófoba que se forma en la posición 4' mediante los dos grupos metoxi vecinos en la posición 3' y 5', respectivamente.

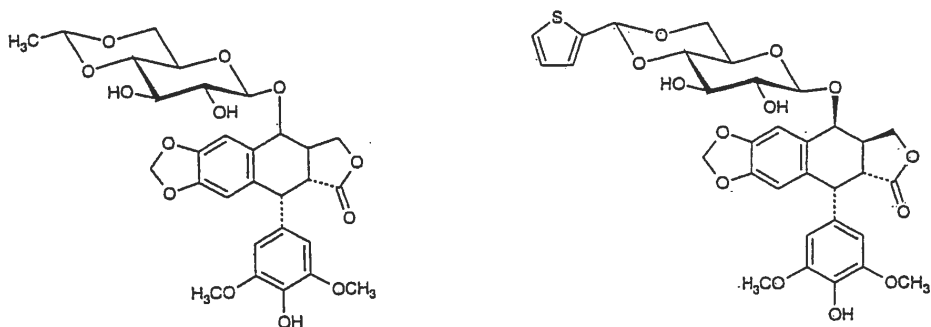
- 45 Por lo tanto, el diseño racional de profármacos activados hidrolíticamente de VP-16 implica la modificación del grupo hidroxifenólico en 4' químicamente reactivo que se adapta específicamente a un

efecto deseado. Dependiendo de la naturaleza de la modificación química, puede definirse que la activación del profármaco se produce a una velocidad dependiente del pH deseada. Los profármacos de la presente invención son estables bajo un amplio intervalo de valores de pH, y no obstante pueden activarse mediante un cambio apropiado de pH, así como bajo condiciones fisiológicas en presencia de enzimas presentes en la naturaleza, tales como, por ejemplo, carboxilo esterases. Esto se mostrará con más detalle posteriormente.

Por lo tanto, se encontró sorprendentemente que, mediante un diseño racional, pueden producirse profármacos de etopósido hidrolíticamente activados, que retienen toda la actividad antitumoral contra células tumorales resistentes a múltiples fármacos in vitro e in vivo.

Según se usa en la presente memoria, el término "proteínas y péptidos que tienen función de hallazgo de receptores asociados con células tumorales" está destinado a indicar cualquier proteína o péptido que sea capaz de unirse a un receptor que está asociado con células tumorales.

"Restos orientadores para receptores de mamífero" son grupos que son capaces de unirse a receptores de mamífero. "Proteínas, péptidos y miméticos no peptídicos que inhiben receptores de factores de crecimiento" está destinado a indicar cualquier proteína, péptido o compuesto de molécula pequeña no peptídico que sea capaz de inhibir un receptor de factor de crecimiento mediante cualquier mecanismo, en particular al unirse al mismo. "Etopósido y tenipósido" está destinado a indicar compuestos de la fórmula



, y cualquiera de sus formas protonadas. El término "funcionalidad" está destinado a indicar cualquier resto químico que permita que la molécula a la que está ligado tal resto sufra una reacción química.

Se hace referencia ahora a las figuras, en las que

la figura 1 muestra un esquema de síntesis de ProVP-16 I y II,

la figura 2 muestra la conversión de ProVP-16 I en ProVP-16 II y VP-16,

la figura 3 muestra perfiles de citotoxicidad para ProVP-16 I y II en comparación con VP-16,

la figura 4 muestra el efecto de ProVP-16 I y II sobre células MOVP-3 resistentes a múltiples fármacos,

la figura 5 muestra la inducción de apoptosis por ProVP-16 I y II en células resistentes, y

la figura 6 muestra la toxicidad y la respuesta antitumoral después de terapia con ProVP-16 II en ratones.

Con más detalle, las figuras son como sigue:

La Figura 1 muestra un Esquema de síntesis y activación de ProVP-16 I y II. La síntesis de ProVP-16 I implica la reacción de cloroformiato de solcetal y VP-16 según se describe en Materiales y Métodos. El compuesto ProVP-16 II se sintetiza a partir de ProVP-16 I mediante hidrólisis ácida con la eliminación de 2,2-dihidroxiopropano. La activación de ProVP-16 II en VP-16 se produce con la eliminación de glicerol y dióxido de carbono.

La Figura 2 muestra la Conversión de ProVP-16 I en ProVP-16 II y VP-16. ProVP-16 I se incubó

en THF/HCl al 2% y se analizaron periódicamente muestras mediante HPLC en los puntos temporales indicados (A). La activación hidrolítica de ProVP-16 II se determinó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a los niveles de pH indicados (B). ProVP-16 I (3 mM) se incubó en soluciones de PBS y las muestras se analizaron periódicamente mediante HPLC. El porcentaje de conversión se calculó a partir de las áreas bajo la curva determinadas mediante integración de picos.

La Figura 3 muestra Perfiles de citotoxicidad para ProVP-16 I y II en comparación con VP-16. El efecto citotóxico de ProVP-16 I y II se evaluó frente a un conjunto de líneas celulares mediante determinaciones por triplicado de las concentraciones IC_{50} para ambos profármacos contra cada línea celular (A). La citotoxicidad mediada por los profármacos con relación a VP-16 se calculó de acuerdo con IC_{50} VP-16 = IC_{50} ProVP-16 I o II. Las barras representan valores medios \pm DE. Las diferencias entre ProVP-16 I o II y VP-16 eran estadísticamente significativas ($p < 0,01$) para todas las líneas celulares excepto NXS2. Las estrellas indican líneas celulares con expresión de MDR-1 amplificada.

La cinética de liberación lenta de la citotoxicidad por ProVP-16 I activado hidrolíticamente se determinó usando células Molt-3 (B). 10^4 células por pocillo se incubaron con concentraciones crecientes (10^{-10} M a 10^{-6} M) de ProVP-16 I y VP-16 en placas de 96 pocillos. En los mismos puntos temporales indicados, la viabilidad celular se determinó por triplicado mediante el ensayo de XTT según se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de viabilidad celular se calculó a partir de medidas de la densidad óptica a 450 nm de acuerdo con $DO\ 450\ muestra = DO\ 450\ sin\ tratar \times 100\%$. Los resultados se representaron como función semilogarítmica de la concentración de fármaco.

La Figura 4 muestra el Efecto de ProVP-16 I y II sobre células MOVP-3 resistentes a múltiples fármacos. La línea celular MOVP-3 resistente a VP-16 recientemente generada se analizó con respecto a la expresión del gen MDR-1 (A), la resistencia contra citotoxicidad inducida por VP-16 (B) y la resistencia cruzada a fármacos de MDR-1 que son sustratos conocidos para p-glicoproteína (C). La expresión del gen de MDR-1 se determinó mediante análisis por RT-PCR sobre RNA total aislado de células MOVP-3 y Molt-3, respectivamente (6A). La expresión de GAPDH se usó como un control para la integridad del cDNA. La resistencia de células MOVP-3 contra VP-16 se calculó a partir de las concentraciones IC_{50} de acuerdo con IC_{50} MOVP-3 = IC_{50} Molt-3 ($n=3$) y los resultados se compararon con los efectos observados con ProVP-16 I y II (6B). Los hallazgos diferenciales entre células Molt-3 y MOVP-3 obtenidos con VP-16 eran estadísticamente significativos ($p < 0,001$) en contraste con ProVP-16 I y II ($p > 0,05$). (6C) La resistencia cruzada de células MOVP-3 contra fármacos MDR-1 (doxorubicina, melfalán, vinblastina y paclitaxel) se calculó a partir de valores de IC_{50} ($n=3$) según se describe en 6B). Los resultados para fármacos no MDR-1 (MTX, 5-FU, genisteína, caliqueamicina θ , ProVP-16 I) se muestran como controles. Los hallazgos diferenciales para fármacos MDR-1 entre células MOVP-3 y Molt-3 eran todos estadísticamente significativos ($p < 0,01$) en contraste con fármacos no MDR-1 ($p > 0,05$).

La Figura 5 muestra la Inducción de la apoptosis mediante ProVP-16 I y II en células resistentes. El efecto de ProVP-16 I y II (5×10^{-7} M) sobre el ciclo celular se analizó en células Molt-3 (A) y MOVP-3 (B) y los resultados se compararon con VP-16 (5×10^{-7} M). Las células se recogieron en puntos temporales indicados ($n=3$), se fijaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron mediante FACS según se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de células en pre G1 (células apoptóticas) se calculó a partir de histogramas de DNA.

La Figura 6 muestra la Toxicidad y la respuesta antitumoral después de una terapia con ProVP-16 II en ratones. Ratones A/J ($n=6$) fueron inyectados i.p. con ProVP-16 II (20 y 60 mg/kg) y VP-16 (20 mg/kg) los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11 y con VP-16 (60 mg/kg) los días 1, 3 y 5 (A). El peso corporal se determinó para cada animal a lo largo del tiempo y se calculó como porcentaje de peso total observado el día 0. Un episodio como el indicado por las gráficas de Kaplan Maier se define por una pérdida de peso corporal mayor de 20%.

El efecto antitumoral de una terapia con ProVP-16 II se determinó en un modelo de xenoinjerto resistente a múltiples fármacos (B,C). Ratones SCID ($n=7$) fueron inyectados s.c. con 5×10^6 células MOVP-3 y tumores primarios de un tamaño medio de $250\ mm^3$ se establecieron 55 días después de la inoculación. El tratamiento consistía en inyecciones i.p. con Pro VP-16 II (45 y 15 mg/kg), VP-16 (15 mg/kg) y disolvente los días 55, 57, 59, 69, 71, 87 y 90 después de la inoculación de células tumorales. El crecimiento de los tumores se verificó mediante medidas con microcalibre y el tamaño del tumor se calculó como se describe en Materiales y Métodos (B). Los hallazgos diferenciales entre grupos experimentales de animales tratados con ProVP-16 II (45 y 15 mg/kg) y grupos de control (disolvente y VP-16) eran estadísticamente significativos ($p < 0,001$ después del día 63) (B). El peso corporal de los animales tratados se determinó a lo largo del tiempo y se calculó como porcentaje de peso corporal el día 57 (C).

Al final del experimento de tratamiento, los tumores s.c. restantes se retiraron y analizaron mediante RT-PCR para la expresión génica de MDR-1, excepto los ratones tratados con 45 mg/kg sin tumor residual. Señales representativas de un tumor de cada grupo se representan y se comparan con células VCR-100 que expresan MDR-1 usadas como un control positivo. La presencia de señales de 229 o 127 pb indica la expresión de MDR-1.

Sorprendentemente, las podofilotoxinas de acuerdo con la presente invención han resultado ser particularmente eficaces para mediar en la citotoxicidad. Se sintetizaron diversos derivados de etopósido y su mecanismo de activación a través de hidrólisis se estableció claramente (véanse los ejemplos que siguen). De forma importante, en condiciones de tampón fisiológico, los profármacos permanecían estables. Ya se había observado que un profármaco de etopósido con un conector de carbamato estable para bloquear el grupo hidroxilo en 4' de VP-16 era completamente estable bajo condiciones fisiológicas (Shabat D, Lode HN, Pertl U, et ál. *In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:7528-7533.). En contraste con los profármacos hidrolíticamente activados de la presente invención, ejemplificados por ProVP-16 I y II, el profármaco de carbamato se diseñó para activarse solamente mediante la catálisis de una reacción retro-aldólica retro-Michael mediada por el anticuerpo catalítico 38C2, una reacción que no se produce en la naturaleza. Ha de subrayarse que este profármaco de carbamato, en oposición a los profármacos de la presente invención, era ineficaz para mediar en la citotoxicidad contra todas las líneas celulares tumorales investigadas, demostrando así un papel crucial para el grupo hidroxilo en 4' en VP-16 como un centro biológicamente relevante capaz de inducir citotoxicidad. El centro activo también está bloqueado en los profármacos descritos en la presente memoria; sin embargo, los profármacos que están comprendidos por la presente invención con su mecanismo de activación hidrolítica sí median en la citotoxicidad muy eficazmente. La naturaleza atóxica de ProVP-16 I y II no convertidos se muestra mediante el mecanismo de liberación lenta demostrado en células Molt-3 (Fig. 3) y por la ausencia de efectos citotóxicos para los profármacos hasta las 12 h de incubación está en contraste con VP-16. Un incremento estable de actividad citotóxica de ambos derivados de VP-16 a lo largo del tiempo demostraba claramente que los nuevos compuestos de la presente invención son inicialmente estables y atóxicos, pero a continuación se activan dentro de las células diana. El mecanismo de liberación lenta observado in vitro también explica la toxicidad sistémica drásticamente disminuida en ratones, ya que se demostraba para ProVP-16 II que era tolerado un incremento de más de 3 veces en la dosis máxima tolerada sobre el compuesto original (Fig. 6).

Una caracterización adicional de los profármacos de acuerdo con la presente invención revelaba una potencia superior en un número de líneas celulares cancerosas en comparación con VP-16. Así, en células con expresión del gen MDR-1 amplificada (VCR 100, ADR 5000 y SW480) se observaba una eficacia mayor de 3 de los profármacos de acuerdo con la presente invención (Fig. 4). Este es un incremento raramente alcanzado por moduladores de MDR-1 (Dalton WS. *Mechanisms of drug resistance in hematologic malignancies.* Semin Hematol. 1997; 34:3-8; Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, et ál. *Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin.* The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. Lancet. 1992; 340:255-259; Joly P, Lallemand A, Oum'Hamed Z, Trentesaux C, Idoine O, Desplaces A. *Effects of verapamil and S9788 on MDR-1 mRNA expression studied by in situ hybridization.* Anticancer Res. 1996; 16: 3609-3614; Tai HL. *Technology evaluation: Valspodar, Novartis AG.* Curr Opin Mol Ther. 2000;2:459-467; Kang Y, Perry RR. *Effect of alpha-interferon on P-glycoprotein expression and function and on verapamil modulation of doxorubicin resistance.* Cancer Res. 1994;54:2952-2958; Hofmann J, Gekeler V, Ise W, et ál. *Mechanism of action of dexniguldipine-HCl (B8509-035), a new potent modulator of multidrug resistance.* Biochem Pharmacol. 1995; 49:603-609.).

Por otra parte, ensayos funcionales demuestran que los profármacos de acuerdo con la presente invención inhiben el flujo de sustrato mediado por MDR1. Por consiguiente, parece que los nuevos profármacos inhiben la función de p-glicoproteína de MDR-1, lo que explica la excelente actividad contra líneas celulares cancerosas que expresan MDR-1. De forma importante, este efecto drástico in vitro también se traduce en una regresión a largo plazo de tumores primarios establecidos en un modelo in vivo de xenoinjerto de leucemia de células T resistente a fármacos (Fig. 6). En este modelo, la expresión del gen MDR-1 se amplifica establemente con una resistencia de 100 veces contra VP-16 in vitro (Fig. 4) dando como resultado la ausencia completa de un efecto terapéutico por VP-16 a la dosis tolerada máxima (Fig. 6). De forma interesante, en tal modelo de estimulación que exhibe una resistencia a fármacos artificialmente alta, el tratamiento con los profármacos de acuerdo con la presente invención puede inducir una respuesta antitumoral drástica (Fig. 6). Esto es de particular importancia ya que tal alta amplificación de MDR-1 raramente se observa en pacientes después de la poliquimioterapia incluso en enfermedades malignas reincidentes (Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. *Expression of mdrl, mrrp, topoisomerase II alpha/beta, and cyclin A in primary or relapsed states of acute*

lymphoblastic leukaemias. Br J Haematol. 1995; 89:356-363; Beck JF, Bohnet B, Brugger D, et ál. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. Anticancer Res. 1998; 18:701-705.).

5 Un hallazgo importante de este estudio es la respuesta antitumoral altamente eficaz observada en modelos resistentes a múltiples fármacos con los profármacos de la presente invención in vitro e in vivo, sugiriendo que la terapia con ellos conducirá a una mejora significativa sobre la quimioterapia existente con podofilotoxinas habituales.

Los ejemplos que siguen están destinados meramente a ilustrar, no a limitar, el alcance de la presente invención.

10 Ejemplo 1

Materiales: El hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio (XTT), el VP-16, el solcetal, los disolventes orgánicos y el metosulfato de fenazina (PMS) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania). Los reactivos de cultivo celular, las enzimas de restricción y otros reactivos de biología molecular eran de Life Technologies (Karlsruhe, Alemania).

15 **Células:** Las líneas celulares tumorales se hicieron crecer en RPMI, FCS al 10% (Nalm-6, Reh, Molt-3, Jurkat, HL-60, K562, HeLa, CEM, A2780, SW480) o DMEM, FCS al 10% (NXS2, SK-N-SH, HT-29) en presencia de 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (P/S) y se propagaron bajo condiciones de cultivo tisular estándar (CO₂ al 5%, 37°C). Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC, Rockville, MD, excepto NXS2 que se describió previamente (Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. Journal of the National Cancer Institute. 1997; 89:1586-1594.) y VCR100, ADR5000 y A2780 que fueron amablemente proporcionadas por James Beck, Greifswald, Alemania (Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. Expression of mdrl, mrp, topoisomerase II alpha/beta, and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. Br J Haematol. 1995; 89:356-363; Beck JF, Bohnet B, Brugger D, et ál. Expression analysis of protein kinase C isozymes and multidrug resistance associated genes in ovarian cancer cells. Anticancer Res. 1998; 18:701-705.). Se usaron células Molt-3 para generar una sublínea MOVP-3 resistente a etopósido mediante la exposición continua a cantidades crecientes de VP-16. Después de un período de tiempo de 6 meses, las células MOVP-3 eran estables y se propagaban en presencia de VP-16 1 µM y se usaron para experimentos in vitro e in vivo adicionales.

30 **Ratones:** Ratones A/J hembra y ratones C.B-17/lcrCri-scid BR FOX CHASE™ se obtuvieron a las 8 semanas de edad de Charles River Laboratories, Sulzfeld, Alemania. Se alojaron en la colonia de ratones libres de patógenos en la institución en grupos de 8 ratones. Los ratones se alimentaron ad libitum con pienso de laboratorio para ratones estándar. Los experimentos en animales se realizaron de acuerdo con la guía alemana para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, es decir "Tierschutzgesetz".

Química analítica de proetopósidos: La síntesis de proetopósidos y el análisis mediante HPLC se han presentado previamente, Wrasidlo W, Schroeder U, Bernt K, et ál. Synthesis, hydrolytic activation and cytotoxicity of etoposide prodrugs. Bioorg Med Chem Lett. 2002; 12. 557-560, que se incorpora por la presente mediante referencia en su totalidad.

40 **Aislamiento de RNA, transcripción inversa y amplificación por PCR:** El aislamiento de RNA celular total, la síntesis de cDNA y las condiciones de RT-PCR se describieron previamente (Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. Journal of the National Cancer Institute. 1997; 89: 1586-1594.). La amplificación de MDR-1 humano se realizó con 5' GGA GAG ATC CTC ACC AAG CG 3' sentido y 5' GTT GCC AAC CAT AGA TGA AGG 3' antisentido durante 35 ciclos (15 s 96°C, 30 s 60°C, 90 s 72°C) conduciendo a un fragmento de 229 pb denominado MDR-1. La detección de alta sensibilidad se alcanzó mediante amplificación inclusiva de 1,0 µl de MDR-1 después de 21 ciclos usando 5' GCT CAG ACA GGA TGT GAG TT 3' sentido y 5' CTG GGT AAT TAC AGC AAG CC 3' antisentido durante 30 ciclos para crear un fragmento de 127 pb. La integridad del cDNA se probó mediante la amplificación de glicerolaldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) con 5' CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG 3' sentido y 5' GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG 3' antisentido durante 25 ciclos conduciendo a un fragmento de 358 pb. La especificidad de todos los fragmentos se verificó mediante secuenciación.

55 **Ensayo de JC-1 funcional:** Para la tinción, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS que contenía monómero de JC-1, según se describió previamente (Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Marie JP. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult

5 acute myeloid leukemia. Blood. 2001; 97:502-508.). Brevemente, monómero de JC-1 0,1 μM se incubó a 37°C durante 15 minutos con 5×10^5 células/ml y se incubó en presencia y ausencia de etopósido y ProVP-16 I y II. Muestras incubadas con ciclosporina A 2 μM se usaron como controles positivos (datos no mostrados). La fluorescencia de las células se registró usando un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson) y las señales de JC-1 se detectaron en el canal FL1 (filtro de 530 nm) para el análisis del monómero de colorante.

10 **Transfección estable de MDR-1:** El cNDA de MDR-1 fue proporcionado amablemente en un plásmido basado en pUC por C. Baum, University of Hamburg. Para la expresión en mamíferos, el cDNA de MDR-1 se clonó en el plásmido de expresión eucariótico bicistrónico pIRESpuro usando sitios de restricción NotI y BamHI. pMDR-IRESpuro se transfectó en células Molt-3 mediante electroporación (960 μF , 250 V). Se seleccionaron transfectantes estables con 300 ng/ml de puomicina. La expresión de MDR-1 se determinó mediante análisis de FACS (FACS-calibur, Becton Dickinson, Bedford, MA) usando 1 $\mu\text{g/ml}$ de mAb específico de MDR-1 (C. Baum, University of Hamburg).

15 **Ensayo de citotoxicidad:** La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo de tetrazolio XTT/formazano según se describió previamente (Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KID, et ál. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988;48:4827-4833.). Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 10^4 /pocillo en 100 μl de medio y se expusieron a concentraciones de fármaco que variaban de 10^{-4} a 10^{-12} M. En los puntos temporales indicados (6-72 h), la viabilidad celular se evaluó al añadir 50 μl de reactivo de XTT (1 mg/ml en RPMI libre de suero) activado con PMS al 0,2% v/v (1,53 mg/ml en PBS) incubado a 37°C durante 4 h. Las placas se analizaron en un lector de microplacas Thermo-max (Molecular Devices) a 450 nm. Los valores de DO se representaron como una función de la concentración de fármaco y las curvas se integraron usando el software softmax para obtener los valores de concentración IC_{50} .

25 **Análisis del ciclo celular:** Las distintas fases del ciclo celular se determinaron en un ensayo estándar usando yoduro de propidio. Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (10^5 /pocillo) y se incubaron con VP-16 o ProVP-16 I y II. En los puntos temporales indicados, las células se recogieron y se fijaron en 4,5 ml de etanol (75%, -20°C) durante al menos 12 h (4°C). Las células se lavaron en PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en 250 μl de PBS que contenía RNAsa (0,3 mg/ml) y yoduro de propidio (50 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron a la oscuridad (30 min., TA). Los histogramas de DNA que definen las distintas fases del ciclo celular se determinaron subsiguientemente por duplicado mediante análisis de FACS y los resultados medios se expresaron como porcentaje.

35 **Estudios de toxicidad en ratones:** Se prepararon soluciones de reserva de etopósido y proetopósido 10 mM en cremophor/etanol 50:50 v/v, y se diluyeron hasta la concentración final en PBS (pH 7,4). Ratones A/J de 8 a 10 semanas de edad fueron inyectados i.p. con 20 mg/kg o 60 mg/kg bien de etopósido o bien de proetopósido, o con control de disolvente (DMSO al 25%, etanol al 12,5%, cremophor al 12,5%, PBS al 50%), el día 1, 3, 5, 7, 9 y 11. VP-16 (60 mg/kg) se inyectó sólo los días 1, 3 y 5. Los pesos corporales y la supervivencia se verificaron a lo largo del tiempo.

40 **Efecto antitumoral en un modelo de xenoinjerto de leucemia de células T:** Se indujeron tumores primarios mediante inyección de 5×10^6 células MOVp 3 en 100 μl de PBS (pH 7,4) en la piel del flanco lateral izquierdo de cada ratón SCID. Tumores primarios establecidos eran palpables 55 días después de la inyección. Los ratones (n=8) fueron tratados mediante inyección intraperitoneal de disolvente (DMSO al 25%, etanol al 12,5%, cremophor al 12,5%, PBS al 50%), VP-16 (15 mg/kg) y Pro VP-16 II (15 y 45 mg/kg) en un volumen total de 200 μl . Cada ratón recibió un total de 7 inyecciones los días 55, 57, 59, 45 69, 71, 87, 90 después de la inoculación de las células tumorales. El tamaño del tumor primario se determinó a lo largo del tiempo mediante medidas con microcalibre y los volúmenes se calcularon de acuerdo con $\frac{1}{2} \times \text{anchura}^2 \times \text{longitud}$. El peso corporal se determinó en una balanza digital estándar.

50 **Estadística:** La significación estadística de los hallazgos diferenciales entre grupos experimentales de animales se determinó mediante la prueba t de Student de dos colas. Los hallazgos se consideraban significativos si los valores de p de dos colas eran $<0,01$.

55 **Química de la activación de profármacos de etopósido:** A fin de establecer que ProVP16-I y II son en efecto profármacos, en primer lugar se determinaron sus características de activación in vitro mediante HPLC (Fig. 1, 2). La conversión de ProVP-16 I en ProVP-16 II y la subsiguiente liberación de VP-16 siguen un mecanismo de activación en dos etapas (Fig. 1). En primer lugar, ProVP-16 I se convierte en ProVP-16 II con la eliminación de 2,2-dihidroxiopropano en menos de 2 h con algo de degradación (alrededor de 10%) del resto glicosídico bajo condiciones ácidas (THF, HCl 2N) (Fig. 2A). En segundo

lugar, ProVP-16 II se hidroliza en VP-16 bajo condiciones de pH básico con la eliminación de glicerina (Fig. 1, 2B). En todos los experimentos, las curvas de conversión-tiempo exhibían cinética de primer orden. De forma importante, bajo condiciones de tampón fisiológico (PBS, pH 7,4, 37°C), ProVP-16 II es estable con una velocidad de conversión de <5% en de 5 a 18 h. ProVP-16 I es completamente estable sin conversión medible en PBS (pH 7,4, 37°C) y, en contraste con ProVP-16 II, es inerte también bajo condiciones de tampón básico (pH ≤ 10,0). Esta estabilidad hidrolítica inusual de ProVP-16 I se atribuye a la naturaleza hidrófoba de toda la región sur de esta molécula y, en una extensión menor, también al impedimento estérico procedente de los dos grupos metoxi en orto que rodean el resto carbonato.

La utilidad de los profármacos de acuerdo con la presente invención también es evidente a partir del hecho de que son activados, es decir hidrolizados, en presencia de enzimas presentes en la naturaleza, pero muestran estabilidad en soluciones acuosas a lo largo de un amplio intervalo de valores de pH.

La activación de ProVP-16 I y II se produce en presencia de suero con semividas de conversión de 750,8 min y 56,1 min, respectivamente. La carboxilo esterasa de hígado porcino también mediaba en la conversión de ProVP-16 I y II en VP-16 con semividas de conversión de 14,2 min y 514,1 min, respectivamente. Estos hallazgos indican claramente la activación enzimática de profármacos a pH 7,4 mediante carboxilo esterasas (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos para la hidrólisis de profármacos de etopósido

compuesto	medio	pH	k_{obs}	$t_{1/2}$
	(37°C ± 0,5)	(±0,1)	(10 ⁻³ -min ⁻¹) ^a	(min)
Profármaco I	tampón de PBS	5,0-10,0	sin conversión	-
2		11,8	8,333 ± 0,50	83,16
	suero humano	7,3	0,923 ± 0,046	750,8
	esterasa ^b	7,3	48,89 ± 3,62	14,17
Profármaco II	tampón de PBS	5,0-7,3	sin conversión	-
3		8,0	3,201 ± 0,428	216,49
		8,8	7,142 ± 0,351	97,03
		10,5	100,01 ± 12,72	6,93
	suero humano	7,3	12,36 ± 0,965	56,07
	esterasa	7,3	1,348 ± 0,081	514,10

a) media ± DE

b) carboxilo éster hidrolasa de hígado porcino

Ejemplo 2

20 **Actividad de ProVP-16 I y II contra líneas celulares de leucemia y cáncer:** La citotoxicidad

de esos dos proetopósidos se probó contra un conjunto de líneas celulares tumorales usando el ensayo antiproliferación con colorante vital de XTT (Fig. 3A). Para la mayoría de las líneas celulares tumorales humanas probadas, ambos proetopósidos eran sustancialmente más activos que el compuesto original con valores de IC_{50} 1000 veces inferiores con carcinoma de colon SW480, 100-1000 veces inferiores con carcinoma de colon HT-29, carcinoma ovárico ADR5000 y preleucemia de células B HL-60, 10-100 veces inferiores con carcinoma cervical HeLa, carcinoma ovárico A2780, leucemia mieloide crónica K562, leucemia de células T de Jurkat y neuroblastoma SK-N-SH, y 2-10 veces inferiores con leucemia de células T Molt-3, preleucemia de células B Reh y Nalm-6, leucemia linfoblástica T VCR100 y células de leucemia linfoblástica T CEM. Solo tres líneas celulares, células de neuroblastoma mûrido NXS2 (Fig. 3A), ovario de hámster chino CHO y carcinoma de colon humano de Hamms, respondían igualmente bien a etopósido y proetopósidos. Dos líneas celulares, ADR5000 resistente a doxorubicina y la VCR100 resistente a vincristina, ambas con expresión de MDR-1 amplificada, revelaban un potencial citotóxico superior para ambos proetopósidos que para las líneas celulares parentales no resistentes A2780 y CEM.

El curso temporal de la acción citotóxica de Pro-VP16 I se siguió usando células de leucemia de células T Molt-3 (Fig. 3B). Los resultados indican un comienzo retardado de la actividad citotóxica por ProVP-16 I, comenzando después de 24 h de incubación. En ese punto temporal, el efecto citotóxico de VP-16 parental ya estaba casi completamente establecido. El efecto citotóxico de ProVP-16 I era completo 48-72 h después de la incubación (IC_{50} $1,0 \times 10^{-8}$) y superaba el de VP-16 (IC_{50} $6,5 \times 10^{-8}$ M). Se observaron resultados similares con ProVP-16 II (datos no mostrados). Estos hallazgos indican un mecanismo de liberación lenta de actividad citotóxica procedente de ProVP-16 I y II que está absolutamente de acuerdo con el concepto de profármaco.

Ejemplo 3

Efecto de ProVP-16 I y II sobre células resistentes a múltiples fármacos: Basándose en el hallazgo de que ProVP-16 I y II también son más eficaces que VP-16 en líneas celulares que expresan MDR naturales (Fig. 3), la cuestión se dirigió a si estos profármacos podrían vencer la MDR artificial in vitro. Con este propósito, la línea celular negativa a MDR-1 Molt-3 se usó para generar un subclón resistente MOVP-3 (Fig. 4A). La expresión de mRNA de MDR-1 en células MOVP-3 se determinó mediante RTPCR (Fig. 4A) mientras que la expresión de proteína de MDR-1 incrementada sobre la superficie celular se estableció mediante análisis de FACS usando el anticuerpo monoclonal UIC2. Los análisis de expresión génica extendida que también examinan MRP, LRP, Topisomerasas I, II α y II β así como Bax y Bcl-2 (datos no mostrados) revelan que la única diferencia que explica la resistencia a fármacos en células MOVP-3 en contraste con Molt-3 es la expresión de MDR-1. Esto se confirmó adicionalmente mediante la caracterización funcional de la sublínea y revelaba una resistencia de 100 veces contra etopósido con valores de IC_{50} de 2×10^{-6} M para células MOVP-3 y 2×10^{-8} M para Molt-3 (Fig. 4B). Sin embargo, las células MOVP-3 permanecían casi completamente sensibles hacia ProVP16 I y II sin diferencia significativa en la citotoxicidad mediada por proetopósido entre células Molt-3 parentales y MOVP-3 resistentes a fármacos, con valores de IC_{50} de 2×10^{-8} M tanto para los profármacos como para las líneas celulares. Se obtuvieron resultados similares en células Molt-3 después de la transfección estable con cDNA de MDR-1 usando pMDR-IRESpuo (Molt-3/MDR-1) que daba como resultado resistencia contra etopósido, doxorubicina, taxol y vinblastina (datos no mostrados). Las células Molt-3/MDR-1 también permanecían totalmente sensibles contra ProVP-16 I y II. Los controles establemente transfectados con vector vacío (pIRESpuo) o un vector que contiene GFP no revelaban resistencia a ninguno de los fármacos probados.

Por otra parte, el tipo de resistencia en la sublínea MOVP-3 usada se caracterizaba por evaluar la extensión de la resistencia cruzada. Las células MOVP-3 desplegaban resistencia cruzada contra todos los fármacos de tipo MDR-1 (etopósido, doxorubicina, paclitaxel, vinblastina) en contraste con fármacos no MDR-1 (MTX, 5-FU, genisteína, caliqueamicina θ) (Fig. 4C). En resumen, estos hallazgos demuestran claramente que ProVP-16 I y II pueden vencer la resistencia a múltiples fármacos mediada por MDR-1 in vitro.

En un ensayo de MDR-1 funcional usando colorante JC-1, podría demostrarse un flujo de JC-1 incrementado en células MOVP-3 en contraste con controles de Molt-3 según se indica por una disminución en la señal de FL-1 en la sublínea resistente en contraste con células parentales Molt3 (Fig. 4D). Esta disminución se eliminó mediante la coincubación con Pro-VP-16 I 3×10^{-4} M (Fig 4D) y el flujo mediado por MDR-1 inhibido a lo largo de un amplio intervalo de concentración hasta 10×10^{-6} M (datos no mostrados). De forma interesante, VP-16 usado en concentraciones equimolares era ineficaz para modular la función de MDR-1 según se indicaba por una señal de JC-1 no diferente de los controles de PBS. Estos hallazgos indican claramente que el diseño del profármaco disminuye directamente el flujo de sustrato mediado por MDR-1.

Para evaluar el mecanismo citotóxico mediado por ProVP-16 I y II en células MOVP-3 resistentes a múltiples fármacos, el efecto de estos fármacos sobre el ciclo celular se analizó a concentraciones que variaban de 10 nM a 1 μ M y se comparó con células parentales Molt-3. Resultados típicos obtenidos con profármacos 0,5 μ M se muestran en la Figura 5. Específicamente, células MOVP-3 (Fig. 5 B) y Molt-3 (5 A) asincrónicas se incubaron con VP-16, ProVP-16 I y II durante 72 h. Periódicamente, las células se sometieron a análisis del ciclo celular en puntos temporales indicados. Los resultados indican claramente que ambos, Pro VP-16 I y II, a 0,5 μ M (Fig. 5B) así como para todo el intervalo de concentración (10 nM-1 μ M) (datos no mostrados) son muy eficaces para inducir un incremento estacionario en el pico de pre-G1 en células MOVP-3 después de 24 h, característico de la apoptosis. En contraste con los profármacos, VP-16 era ineficaz para inducir la apoptosis, de acuerdo con la eliminación de VP-16, pero no ProVP-16 I y II, mediante MDR-1. La inducción de la apoptosis también se demostró en células parentales Molt-3 a lo largo de todo el intervalo de concentración (0,5 μ M, Fig. 5A). Se demostró que VP-16 inducía la apoptosis en células Molt-3 hasta una extensión similar a ProVP-16 I y II. En conjunto, estos resultados sugieren que ProVP-16 I y II no son sustratos para MDR-1.

15 Ejemplo 4

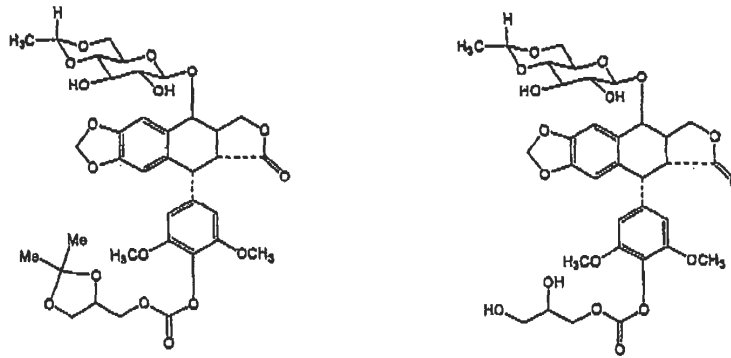
Toxicidad in vivo y eficacia de ProVP-16 II en un modelo de xenoinjerto de leucemia de células T resistente a múltiples fármacos: Basándose en los hallazgos in vitro que no revelaban diferencias entre ProVP-16 I y II, ProVP-16 II se seleccionó para experimentos in vivo debido a la superior solubilidad en agua. En primer lugar, la toxicidad sistémica de ProVP-16 II se determinó en ratones A/J (n=6) inyectados i.p. con VP-16 y ProVP-16 II (Fig. 6A). Todos los ratones que recibían 20 mg/kg de VP-16 sobrevivían con una pérdida de peso media de 10%. En contraste, 5/6 ratones tratados con 60 mg/kg de VP-16 mostraban una pérdida de peso >20%. Estos hallazgos contrastan profundamente con los resultados obtenidos con ProVP-16 II. En ese caso, la administración de 20 y 60 mg/kg de ProVP-16 II era bien tolerada sin muerte en ningún grupo experimental. Solo los ratones que recibían 60 mg/kg de ProVP-16 II revelaban una pérdida de peso transitoria de <10% en contraste con 20 mg/kg de Pro VP-16 II, que mantenía pesos corporales medios estables. Así, la dosis máxima tolerada definida por una disminución en el peso corporal <20% se estableció en 20 mg/kg para VP-16 y en 60 mg/kg para ProVP-16 II, de acuerdo con una disminución de la toxicidad sistémica por el diseño del profármaco en al menos un factor 3.

En segundo lugar, el efecto antitumoral de ProVP-16 II se determinó en un modelo de xenoinjerto resistente a múltiples fármacos de leucemia de células T y se comparó con VP-16. Tumores primarios establecidos se indujeron mediante inyección s.c. de 5×10^6 células MOVP-3 resistentes a múltiples fármacos y el crecimiento del tumor se siguió a lo largo de un período de tiempo de 105 días. El tratamiento se inició 55 días después de la inoculación de las células tumorales mediante inyección i.p. con un tamaño medio del tumor de 250 mm³. Los niveles de dosis para VP-16 (15 mg/kg) y ProVP-16 II (15 y 45 mg/kg) se seleccionaron basándose en los resultados de la Fig. 6A para reducir adicionalmente la toxicidad sistémica. El tratamiento con 45 mg/kg de ProVP-16 II inducía una regresión de tumores primarios establecidos en 7/7 animales 10 días después del inicio del tratamiento, que era estable durante más de 2 meses (Fig. 6B). Este tratamiento era bien tolerado con una pérdida de peso transitoria de solamente 6% (Fig. 6C). Este hallazgo estaba en contraste con el observado en ratones tratados con 15 mg/kg de VP-16, que no mostraban respuesta antitumoral y revelaban un crecimiento continuo de tumores primarios idéntico a los ratones de control tratados solamente con disolvente. Sin embargo, se observó una toxicidad significativa en ratones tratados con 15 mg/kg de VP-16 que exhibían una pérdida de peso media transitoria de 20% (Fig. 6C). De hecho, los ratones que recibían 15 mg/kg de ProVP-16 II no mostraban una pérdida de peso medible (Fig. 6C) y se presentaban con una reducción drástica en el crecimiento de tumores primarios en contraste con ratones tratados con la cantidad equivalente de 15 mg/kg de VP-16. A fin de determinar si la expresión de MDR-1 permanecía estable durante el transcurso del experimento, se aisló RNA de explantes tumorales el día 105 y todos los tumores investigados revelaban una señal de MDR-1 mediante RT-PCR (Fig. 6D).

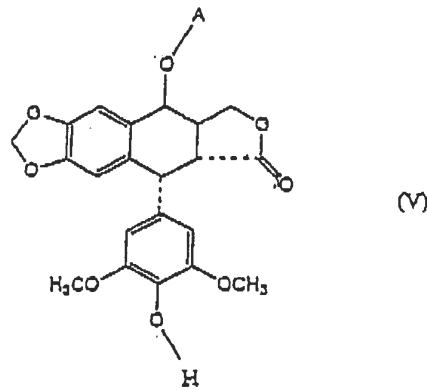
Los rasgos de la presente invención divulgados en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos pueden, tanto separadamente como en cualquiera de sus combinaciones, ser fundamentales para llevar a cabo la invención en sus diversas formas.

REIVINDICACIONES

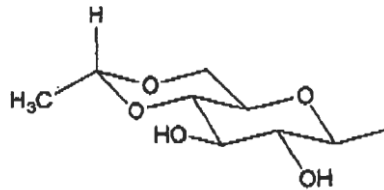
1. Una podofilotoxina caracterizada porque se selecciona del grupo que comprende



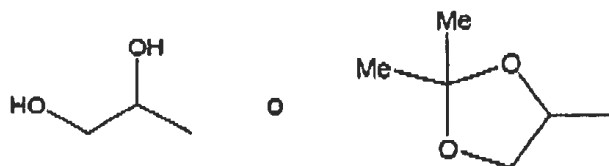
5 2. Un método para preparar una podofilotoxina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque a) un compuesto que se representa mediante la fórmula V



siendo A



se hace reaccionar con un haloformiato $W-(C=X)-(Y)-(CH_2)_n-Z$, en el que X, Y son O, n=1 y Z es



10

y siendo W Cl, F, Br o I,

o b) caracterizado porque un compuesto que se representa mediante la fórmula V se hace reaccionar con fosgeno o cloroformiato de triclorometilo, para dar un producto intermedio de cloroformiato de 4'-fenol,

haciéndose reaccionar a continuación dicho producto intermedio de cloroformiato de 4'-fenol con un alcohol de la fórmula ZYH, para dar el carbonato correspondiente, Y=O, y definiéndose Z como bajo a).

- 5 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el compuesto que se representa mediante la fórmula V se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo que comprende cloroformiato de solcetal y cloroformiato de PEG.
4. Un método para preparar una podofilotoxina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el producto resultante de cualquiera de las reivindicaciones 2-3 se hidroliza.
- 10 5. Composición farmacéutica que comprende a) una podofilotoxina de acuerdo con la reivindicación 1 o una podofilotoxina preparada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, y b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una podofilotoxina de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares.
- 15 7. Una podofilotoxina o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el trastorno proliferativo celular es en un niño, un adolescente o un adulto.

Fig. 1

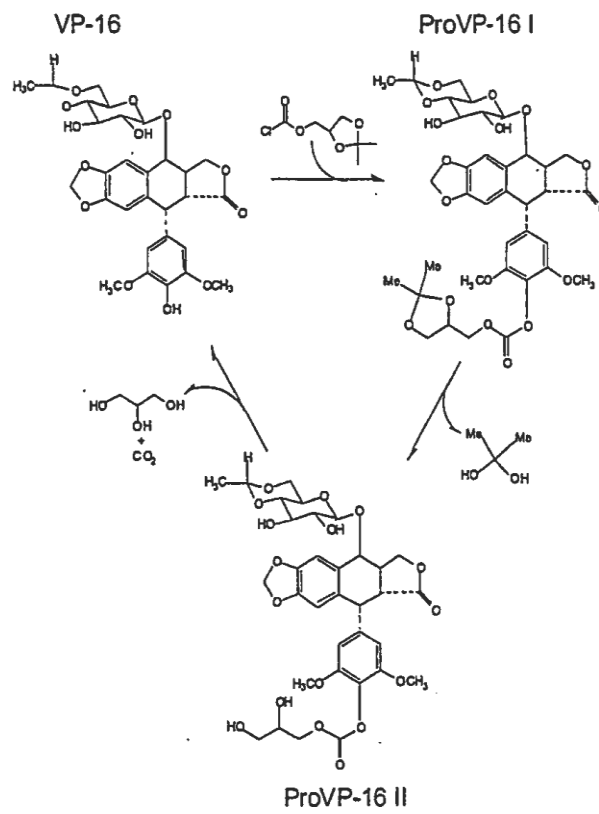


Fig. 2

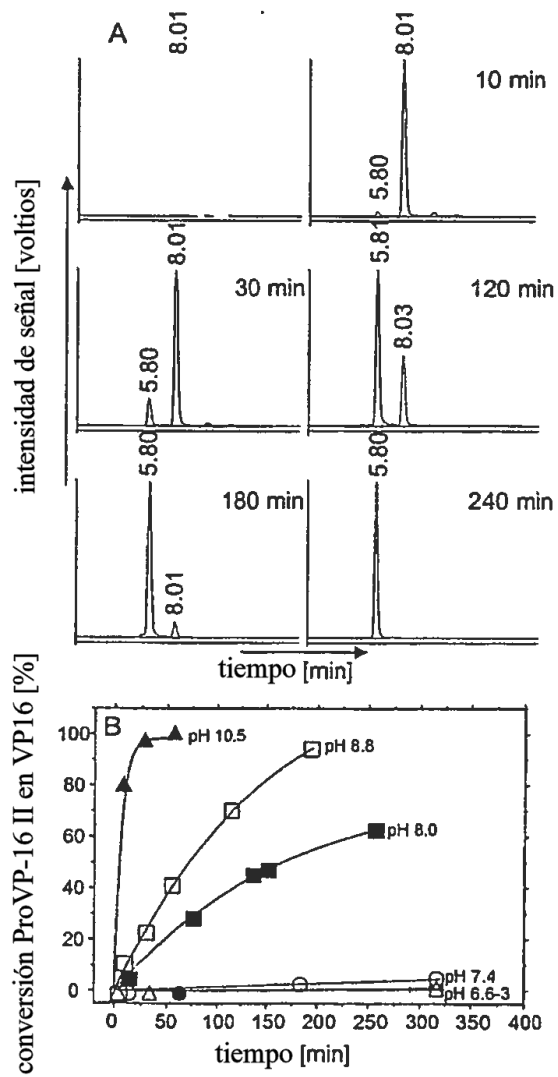


Fig. 3

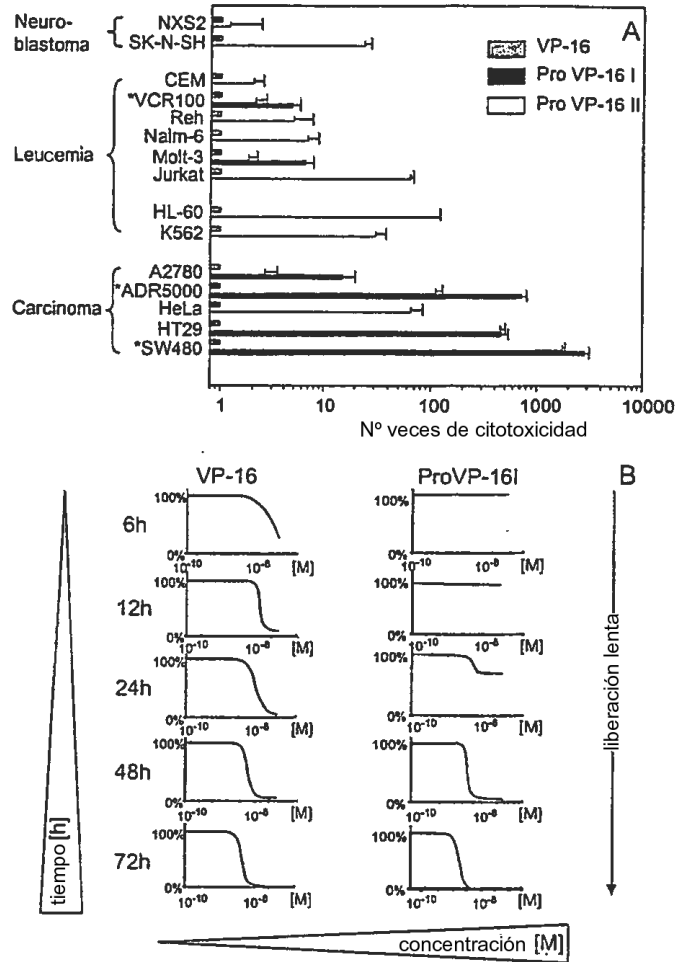


Fig. 4

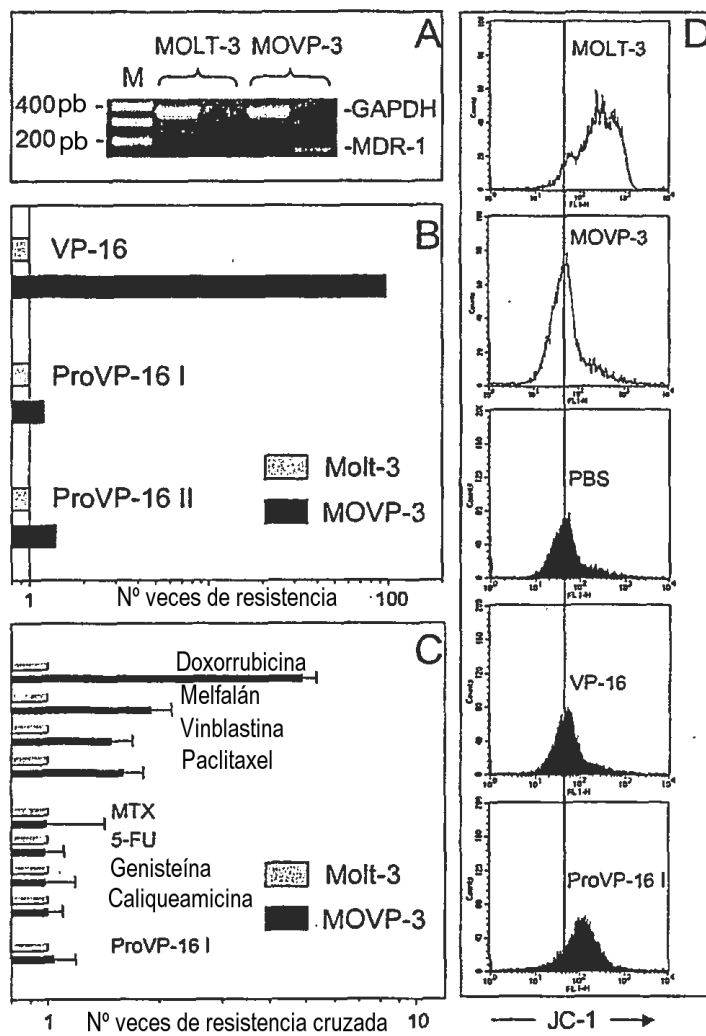


Fig. 5

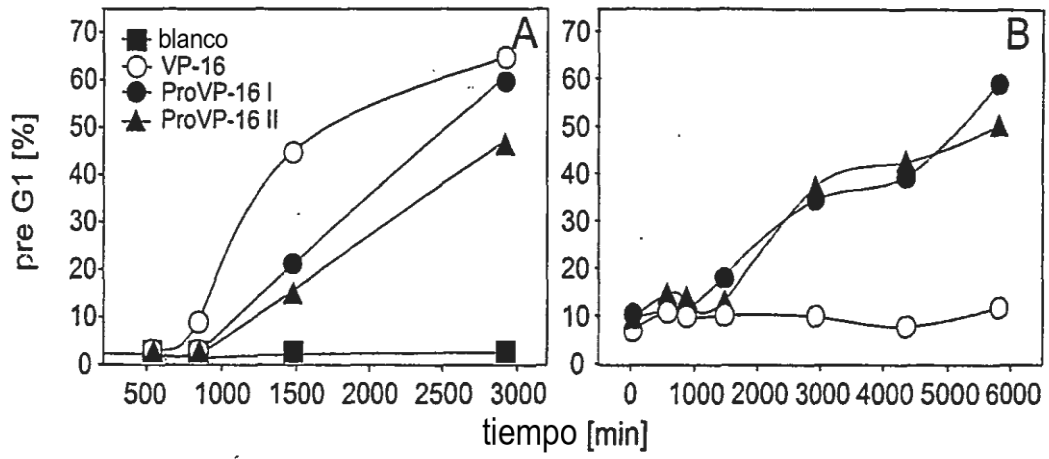


Fig. 6

