



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

[Handwritten signature]

Organizacion CSA Ltda

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE No.

00-34117

54. TITULO

COMPUESTOS ANTI-TUMORALES ACTIVADOS POR PAF Nuevo titulo

Un profarmaco que comprende un grupo aminoácido cíclico y
un grupo citotóxico o citostático que es escisionable por la
acción catalítica de la proteína de activación de fibroblasto

71. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K³⁸/04.

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG.

DOMICILIO

Ingelheim am Rhein, Alemania.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

Código No. 1092

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

2000-05-11



UD
EL
JO

Superintendencia y Comercio
Radicación: 00034117 00000000 Folios: 39
Fecha (AMD): 2000-05-11 17:14:00
Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTADO
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS OPERACIONES
TRAMITE: 02 EVENTO: 01 ACTUACION: 01

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social **BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG**
Cambio de Nombre FOLIOS 172 y ss.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Alemania

Departamento o Estado

Dirección

D-55216 Ingelheim am Rhein

Ciudad

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35 Piso 4o.,

Ciudad

BOGOTA, COLOMBIA

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Dr. John-Edward PARK,
3- Dr. Martin LENTER
5- Dr. Pilar GARIN-CHESA
7- Dr. Diefmar LEIPERT

2- Dr. Wolfgang J. RETTIG
4- Dr. Stefan PETERS
6- Dr. Jürgen MACK
8- Dr. Raymond A. FIRESTONE

Identificación

1- Widdersteinstr. 162, 88400 Biberach, Alemania.
2- Magnolienweg 7, 88400 Biberach, Alemania.
3- Promenade 23, 89073 Ulm, Alemania.
4- Ringgasse 25, 55218 Ingelheim, Alemania.
5- Magnolienweg 7, 88400 Biberach, Alemania.
6- Arnriswilstr. 7, 88400 Biberach, Alemania.
7- Albrecht-Duerer-Str. 17, 55218 Ingelheim, Alemania.
8- 59 Barnes Road, Stamford, CT. 06902, Estados Unidos de América.

Dirección

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

COMPUESTOS ANTI-TUMORALES ACTIVADOS POR PAF

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

33) País

Fecha

No. Solicitud

DE US
Convención de París

14 de Mayo de 1999

60/134.136. ✓

a Publicar a los
No: 10903-801-039.2
B/mrm-207

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

SIFICACION INTERNACIONAL

AGIK 38/04

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un profármaco que es capaz de ser convertido en un fármaco por la acción catalítica de proteína de activación de fibroblastos humana (PAFa), teniendo dicho profármaco un sitio de escisión que es reconocido por PAFa, y siendo dicho fármaco citotóxico o citostático en condiciones fisiológicas.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica

☒

Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC

☒

Recibo de la tasa respectiva *por v/r de \$608.000.-*

☒

Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación

☐

Si se reivindica prioridad Andina:

Copia de la primera solicitud

☐

Traducción oficial

☐

Si se reivindica prioridad Unionista:

Copia certificada de la primera solicitud:

☐

Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior

Traducción simple

☐

Capítulo descriptivo

☒

Dibujos, planos necesarios *(5 págs.)*

☒

Capítulo reivindicatorio

☒

Tarjeta archivo propietarios según formato

☒

Tarjeta archivo temático según formato

☒

Extracto para publicación según formato

☒

Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms

☐

Otros Documentos

☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA



NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

Compuestos anti-tumorales activados por PAF

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere al sector del tratamiento de tumores mediante la administración de un profármaco que se convierte en un fármaco en el sitio del tumor. En particular, la invención se refiere a profármacos que se pueden convertir en un fármaco por la acción catalítica de PAF α , a su fabricación y uso farmacéutico.

Antecedentes y técnica anterior

15 La proteína de activación de fibroblastos humana (PAF α) es una molécula de la superficie de la célula de M_r 95.000, originalmente identificada con el anticuerpo monoclonal (amc) F19 (Rettig et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3110-3114; Rettig et al. (1993) Cancer Res. 53, 3327-3335).

20 El ADNc de la PAF α codifica una proteína de la membrana integral del tipo II con un gran dominio extracelular, el segmento de trans-membrana y una cola citoplásmica corta (Scanlan et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5657-5661; documento WO 97/34927). La PAF α muestra una identidad

25 en la secuencia de aminoácidos del 48% con el antígeno CD26 de activación de células T, también conocido como dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV; EC 3.4.14.5), una proteína unida a la membrana con actividad dipeptidil-peptidasa (Scanlan et al., loc. cit.). PAF α tiene actividad enzimática y es un miembro

30 de la familia de la serina proteasa, siendo crítica la serina 624 para la función enzimática (documento WO 97/34927). Un trabajo utilizando un ensayo de recubrimiento de la membrana reveló que dímeros de PAF α son capaces de escindir dipéptidos de Ala-Pro-7-amino-4-trifluorometilcumarina, Gly-Pro-7-amino-

35 -4-trifluorometilcumarina y Lys-Pro-7-amino-4-trifluorometilcumarina (documento WO 97/34927).

PAF α se expresa selectivamente en fibroblastos del estroma reactivos de muchos tipos histológicos de cánceres epiteliales humanos, tejido de granulación de heridas cicatrizantes y células malignas de determinados sarcomas de huesos y tejido blando. Los tejidos adultos normales están generalmente desprovistos de PAF α detectable, pero algunos tejidos mesenquémicos fetales expresan transitoriamente la molécula. Por contraposición, la mayoría de los tipos comunes de cánceres epiteliales, que incluyen >90% de carcinomas de mama, de pulmón de células no pequeñas y colorrectales, contienen fibroblastos del estroma reactivos con PAF α (Scanlan et al., loc. cit.). Estos fibroblastos PAF α ⁺ acompañan a vasos sanguíneos tumorales recientemente formados, formando un compartimiento celular distinto interpuesto entre el endotelio capilar del tumor y el aspecto basal de racimos de células epiteliales malignas (Welt et al. (1994) J. Clin. Oncol. 12(6), 1193-1203). Mientras que fibroblastos del estroma PAF α ⁺ se encuentran tanto en carcinomas primarios como metastásicos, las lesiones epiteliales benignas y premalignas sometidas a ensayo (Welt et al., loc. cit.), tales como fibroadenomas de mama y adenomas colorrectales, contienen sólo raramente células del estroma PAF α ⁺. Basándose en el diseño de distribución restringida de PAF α en tejidos normales y en su expresión uniforme del estroma de soporte de muchos tumores malignos, se han iniciado ensayos clínicos con el amc F19 marcado con ¹³¹I en pacientes con carcinomas de colon metastásicos (Welt et al., loc. cit.).

Para las nuevas terapias del cáncer basadas en fármacos citotóxicos o citostáticos, una consideración principal consiste en incrementar el índice terapéutico mejorando la eficacia del exterminio del tejido canceroso y/o reduciendo la toxicidad para el tejido normal de los agentes citotóxicos o citostáticos. Para aumentar la especificidad del exterminio del tejido tumoral y reducir la toxicidad en tejidos normales, se pueden diseñar mecanismos de disparo de modo que los agentes tóxicos sintetizados en sus formas profármaco o

inactiva se vuelven activos cuando y en donde se requiera, particularmente en tejidos cancerosos (Panchal (1998) Biochem. Pharmacol. 55, 247-252). Los mecanismos de disparo pueden incluir factores exógenos tales como la luz o productos químicos, o factores celulares endógenos tales como enzimas con una expresión restringida en tejidos cancerígenos. Otro concepto que se ha elaborado adicionalmente es la denominada "terapia con profármacos enzimática dirigida a anticuerpos" (TPEDA) o "catálisis dirigida a anticuerpos" (CDA) (Huennekens (1994) Trends Biotechnol. 12, 234-239; Bagshawe (1994) Clin. Pharmacokinet. 27, 368-376; Wang et al. (1992) Cancer Res. 52, 4484-4491; Sperker et al. (1997) Clin. Pharmacokinet. 33(1), 18-31. En la TPEDA se utiliza un anticuerpo dirigido en un antígeno asociado a tumores para dirigir una enzima específica al sitio del tumor. La enzima localizada en el tumor convierte un profármaco administrado subsiguientemente en un agente citotóxico activo. El conjugado anticuerpo-enzima (CAE), se une a un antígeno diana sobre membranas celulares o a un antígeno libre en fluido extracelular (FEC). Un intervalo de tiempo entre la administración del CAE y el profármaco permite que el CAE sea desprendido de tejidos normales, de modo que el profármaco no es activado en los tejidos normales o sangre. Sin embargo, algunas desventajas de la TPEDA están relacionadas con las propiedades del CAE (Bagshawe, loc. cit.). Por ejemplo, en seres humanos, sólo una pequeña fracción de la dosis administrada del CAE que dirige a diana se une al tejido tumoral y el resto se distribuye por los fluidos corporales de los que se desprende con demoras de tiempo significativas. Incluso concentraciones muy bajas de enzima dirigida a diana pueden catalizar suficiente profármaco como para tener efectos tóxicos, debido a que los volúmenes de plasma de FEC normal son mucho mayores que los de FEC tumoral. El CAE puede ser también inmunogénico, evitando de esta forma, en muchos casos, una administración repetida.

Las solicitudes de patente internacional WO 97/12624 y

WO 97/14416 describen oligopéptidos que incluyen los siguientes penta- y hexa-péptidos (SEQ. ID. NOs: 151 y 177: hArg-Tyr-Gln-Ser-Ser-Pro; hArg-Tyr-Gln-Ser-Pro;) que comprenden secuencias de aminoácidos que son reconocidas y escindidas proteolíticamente por antígeno específico de la próstata (AEP) libre y agentes terapéuticos que comprenden conjugados de oligopéptidos de este tipo y agentes terapéuticos o citotóxicos conocidos. Estos conjugados de oligopéptidos, que comprenden al menos un resto glutamina-serina, son útiles solamente para el tratamiento del cáncer de próstata.

El problema en el que se basa la presente invención consistía en proporcionar métodos y medios para mejorar la tolerabilidad por parte de tejido normal de agentes citotóxicos o citostáticos con una eficacia conocida frente a una amplia gama de tejidos tumorales.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a compuestos anti-tumorales activados por enzimas. En particular, la invención proporciona profármacos que son capaces de ser convertidos en fármacos mediante la acción catalítica de proteína alfa activadora de fibroblastos endógena (PAF α), que se ha demostrado reside en tejidos cancerígenos humanos. Preferiblemente, un profármaco de la presente invención es capaz de ser convertido en un fármaco mediante la acción catalítica de PAF α , teniendo dicho profármaco un sitio de escisión que es reconocido por PAF α , y siendo dicho fármaco citotóxico o citostático frente a células cancerígenas en condiciones fisiológicas.

En el contexto de esta invención, un "fármaco" debe significar un compuesto químico que puede ser administrado a seres humanos o animales como un adyuvante en el tratamiento de la enfermedad. En particular, un fármaco es un agente farmacológico activo.

La expresión "compuesto citotóxico" debe dar a entender

un compuesto químico que es tóxico para células vivas, en particular un fármaco que destruye o extermina células. La expresión "compuesto citostático" debe dar a entender un compuesto que suprime el desarrollo y la multiplicación de la célula y, así, inhibe la proliferación de células. Ejemplos de compuestos citotóxicos o citostáticos adecuados para la presente invención son derivados de antraciclina tales como doxorubicina, análogos de metotrexato tales como metotrexato, pritrexima, trimetrexato o DDMP, melfalan, análogos de cisplatino tales como cisplatino, JM216, JM335, bis(platino) o carboplatino, análogos de purinas y pirimidinas tales como citarquina, gencitabina, azacitidina, 6-tioguanina, flurdarabina ó 2-desoxicoformicina, y análogos de otros agentes quimioterapéuticos tales como 9-aminocamptotecina, D,L-amino-glutetimida, trimetoprim, pirimetamina, mitomicina C, mitoxantrona, ciclosfosfanamida, 5-fluorouracilo, extramustina, podofilotoxina, bleomicina o taxol.

Un "profármaco" debe dar a entender un compuesto que, tras la administración, ha de sufrir una conversión química por procesos metabólicos antes de convertirse en un agente farmacológico activo. En particular, un profármaco es un precursor de un fármaco. En el contexto de la presente invención, el profármaco es significativamente menos citotóxico o citostático que el fármaco en el que se convierte tras la acción catalítica de PAF α . El experto conoce métodos para determinar la citotoxicidad de un compuesto, véase por ejemplo el Ejemplo 6 de esta memoria, o Mosmann ((1983) J. Immun. Meth. 65, 55-63). Preferiblemente, el profármaco es al menos tres veces menos citotóxico en comparación con el fármaco en un ensayo in vitro.

Un "fármaco que es citostático o citotóxico en condiciones fisiológicas" debe dar a entender un compuesto químico que es citostático o citotóxico en un cuerpo vivo humano o animal, en particular un compuesto que extermina células o inhibe la proliferación de células dentro de un cuerpo vivo humano o animal.

Un "profármaco que tiene un sitio de escisión que es reconocido por PAF α " debe dar a entender un profármaco que puede actuar como un sustrato para la actividad enzimática de PAF α . En particular, la actividad enzimática de PAF α puede

5 catalizar la escisión de un enlace covalente del profármaco en condiciones fisiológicas. Mediante la escisión de este enlace covalente, el profármaco se convierte en el fármaco, ya sea directa o indirectamente. La activación indirecta sería el caso si el producto de escisión de la etapa catali-

10 zada por PAF α no es el agente farmacológicamente activo propiamente dicho, sino que se somete a una etapa de reacción adicional, por ejemplo hidrólisis, para volverse activo. Más preferiblemente, el sitio de escisión del profármaco es específicamente reconocido por PAF α , pero no por otras

15 enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo humano o animal. También preferiblemente, el sitio de escisión es reconocido específicamente por PAF α , pero no por enzimas proteolíticas presentes en fluidos corporales de seres humanos o animales, especialmente el plasma. En una realización particularmente

20 preferida, el profármaco es estable en el plasma, otros fluidos corporales, o tejidos, en los que no está presente ni es detectable PAF α biológicamente activa. Preferiblemente, en un ensayo in vitro tal como se lleva a cabo en el Ejemplo 7 en esta memoria, más del 50%, más preferiblemente más del

25 80%, más preferiblemente más del 90% del profármaco está todavía presente en una solución que contiene 10% (v/v) de plasma humano después de 8 h a 37°C. El sitio de escisión debería ser preferiblemente específico para PAF α . En una realización preferida, el sitio de escisión comprende un

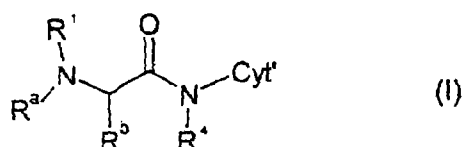
30 residuo L-prolina que está enlazado a un fármaco citotóxico o citostático a través de un enlace amida. Un ejemplo de esta clase es un conjugado de doxorubicina-péptido. PAF α puede catalizar la escisión de un enlace peptídico entre el residuo de aminoácido C-terminal del péptido, que es preferiblemente

35 L-prolina, y el compuesto citotóxico o citostático.

Compuestos preferidos muestran una conversión de al

menos 10% en el fármaco libre, en condiciones convencionales listadas más abajo. Se prefieren más compuestos que muestran una conversión de al menos el 20% en el fármaco libre en condiciones convencionales. Se prefieren incluso más compuestos que muestran una conversión de al menos el 50% en el fármaco libre en condiciones convencionales. En este contexto, condiciones convencionales se definen como sigue: cada compuesto se disuelve en tampón Hepas 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, a una concentración final de 5 μ M y se incuba con 100 ng de CD8PAF α (véase el Ejemplo 4) durante 24 horas a 37°C. La liberación de fármaco libre por parte de CD8PAF α se determina según se describe en el Ejemplo 5.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R¹ representa un grupo aminoalcanoilo, un grupo oligopeptidoilo, en particular un grupo di- o tri-peptidoilo, cuya función amino N-terminal puede estar fijada a un grupo de protección terminal;

R^a y R^b, junto con el grupo N-C interyacente, forman un anillo heterocíclico de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido y opcionalmente condensado con benzo o ciclohexano, en el que uno o dos grupos CH₂ también pueden ser reemplazados por NH, O o S,

R⁴ representa H, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo; y

Cyt¹ representa el residuo de un compuesto citotóxico o citostático,

con la condición de que estén excluidos N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutami-

nil-L-seril-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftacenil]-.alfa.-L-lixo-hexopiranos-3-il]-L-prolinamida; y

- 5 N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutaminil-L-seril-L-seril-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftacenil]-.alfa.-L-lixo-hexopiranos-3-il]-L-prolinamida.

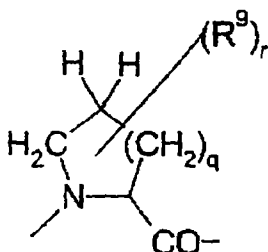
Particularmente preferidos son los compuestos de fórmula

- 10 I, en donde R^1 es un residuo de fórmula Cg-A, Cg-B-A o Cg-(D)_m-B-A, en que

Cg representa un átomo de hidrógeno o un grupo de protección terminal, seleccionado del grupo que consiste en R^5 -CO-, R^5 -O-CO-, R^5 -NH-CO-, R^5 -SO₂- o R^5 -, en donde R^5 es un grupo alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, aralquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; preferiblemente, Cg es un sustituyente acetilo, benzoílo, D-alanilo, (R)-H₂NCH(CH₃)- o H₂NCOCH₂CH₂- u otro grupo de protección terminal para la protección de la función amino N-terminal;

A, B y D, cada uno independientemente, representan restos derivados de ácidos aminocarboxílicos de la fórmula -[NR⁶-(X)_p-CO]-, en donde X representa CR⁷R⁸ y en donde R⁶, R⁷ y R⁸, cada uno independientemente, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, y p es 1, 2, 3, 4, 5; o

A, B y D, cada uno independientemente, representa restos derivados de ácidos aminocarboxílicos cíclicos de fórmula



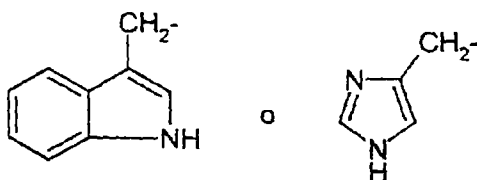
5

en donde

10 R^9 representa alquilo C_1-C_6 , OH o NH_2 ,
m es un número entero de 1 a 10,
q es 0, 1 ó 2; y
r es 0, 1 ó 2.

Se prefieren adicionalmente los compuestos de fórmula I,
en donde R^6 , R^7 y R^8 , cada uno independientemente, representa
15 un átomo de hidrógeno o CH_3- , CH_3CH_2- , $CH_3CH_2CH_2-$, $(CH_3)_2CH-$,
 $CH_3CH_2CH_2CH_2-$, $(CH_3)_2CHCH_2-$, $CH_3CH_2CH(CH_3)-$, $(CH_3)_3C-$, $HOCH_2-$,
 $CH_3CH(OH)-$, $CH_3CH(OH)CH_2CH_2-$, $HOCH_2CH_2CH_2CH_2-$, $H_2NCH_2CH_2CH_2-$,
 $H_2NCH_2CH_2CH_2CH_2-$, $H_2NCH_2CH(OH)CH_2CH_2-$, $H_2NC(=NH)NHCH_2CH_2CH_2-$,
 $HSCH_2-$, $CH_3SCH_2CH_2-$, $HOOCCH_2-$, $HOOCCH_2CH_2-$, $H_2NC(=O)CH_2-$,
20 $H_2NC(=O)CH_2CH_2-$, bencilo, para-hidroxibencilo,

25



ciclohexilo, fenilo,

p es 1, y en donde la configuración en CR^7R^8 puede ser R o S;
30 si R^7 es distinto de H, entonces R^8 es preferiblemente H; R^6
es preferiblemente H; si p es mayor que uno, R^7 y R^8 son
preferiblemente H.

Otra realización preferida de la presente invención son
los compuestos de fórmula I, en donde el anillo heterocíclico
35 formado por R^a , R^b y el N-C interyacente están sustituidos con
 R^2 y R^3 , en donde R^2 y R^3 , cada uno independientemente, repre-

sentan un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo alquilo C₁-C₆, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alcoxi C₁-C₆, tiol, alquil C₁-C₆-tio, oxo, imino, fomilo, alcoxi C₁-C₆-carbonilo, aminocarbonilo, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo.
5 lo.

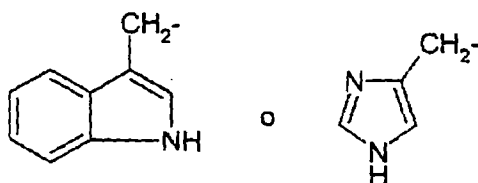
A menos que se indique de otro modo, los estereoisómeros simples, así como mezclas o racematos de los estereoisómeros están incluidos en la invención.

"Alquilo C₁-C₆" representa generalmente un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene 1 a 6 átomos de carbono.
10

La expresión "opcionalmente sustituido", tal como se utiliza aquí anteriormente o aquí en lo que sigue con respecto a un grupo o resto, se refiere a un grupo o resto
15 que puede estar opcionalmente sustituido con uno o varios átomos de halógeno, sustituyentes hidroxilo, amino, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alquil C₁-C₆-oxi, tiol, alquil C₁-C₆-tio, =O, =NH, -CHO, -COOH, -CONH₂, -NHC(=NH)NH₂, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo, que pueden ser
20 idénticos entre sí o diferentes.

A título de ejemplo, se pueden mencionar los siguientes radicales:

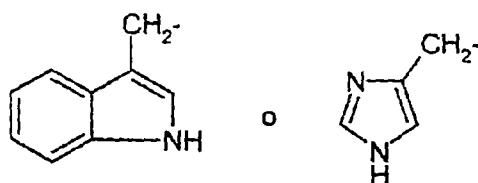
metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo (isopropilo), butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, n-pentilo,
25 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo,
30 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metil-propilo, HOCH₂-, CH₃CH(OH)-, CH₃CH(OH)CH₂CH₂-, HOCH₂CH₂CH₂CH₂-, H₂NCH₂CH₂CH₂-, H₂NCH₂CH₂CH₂CH₂-, H₂NCH₂CH(OH)CH₂CH₂-, H₂NC(=NH)NHCH₂CH₂CH₂-, HSCH₂-, CH₃SCH₂CH₂-,
35 HOOCCH₂-, HOOCCH₂CH₂-, H₂NC(=O)CH₂-, H₂NC(=O)CH₂CH₂-, bencilo, para-hidroxi-bencilo,



5

Si un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ está sustituido, los sustituyentes son preferiblemente hidroxilo, amino, dimetilamino, dietilamino, tiol, metil-tiol, metoxi, etoxi, $=\text{O}$, $=\text{NH}$, $-\text{CHO}$,
 10 $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, ciclohexilo, fenilo, bencilo, para-hidroxibencilo

15



Si alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ está sustituido con arilo o heteroarilo,
 20 alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ es preferiblemente C_1 , más preferiblemente un grupo metileno.

Los términos "aminoalcanoílo" y "oligopeptidoílo", incluido "di- o tri-peptidoílo" tal como se utilizan aquí anteriormente o aquí en lo que sigue con respecto al radical R^1 ,
 25 describen el radical en el que un aminoácido o un oligómero que comprende hasta 12, preferiblemente 2 ó 3 restos aminoácido está fijado en posición C-terminal al átomo de nitrógeno del anillo heterocíclico a través de un enlace amida.

Una persona de experiencia ordinaria en la química de
 30 los aminoácidos y oligopéptidos apreciará fácilmente que determinados aminoácidos pueden ser reemplazados por otros aminoácidos homólogos, isostéricos y/o isoelectrónicos, en donde la actividad biológica del aminoácido u oligopéptido original se ha conservado tras la modificación. También se
 35 pueden utilizar determinados aminoácidos no naturales y naturales modificados para reemplazar el correspondiente

aminoácido natural. Así, por ejemplo, la tirosina puede ser reemplazada por 3-yodotirosina, 2- ó 3-metiltirosina, 3-fluorotirosina.

La expresión "grupo de protección terminal", tal como se utiliza aquí anteriormente o aquí en lo que sigue con respecto a un grupo que está fijado al átomo de nitrógeno N-terminal del grupo aminoalcanoílo o peptidoílo del radical R^1 , define un grupo o resto que reduce o elimina la degradación enzimática de los compuestos de la presente invención por la acción de aminopeptidasas que están presentes en el plasma sanguíneo de animales homeotermos. Grupos de protección terminal adecuados incluyen alcanoílo C_1-C_{10} , aril C_6-C_{18} -alcanoílo C_1-C_{10} , aril C_6-C_{18} -alquil C_1-C_{10} -sulfonilo. Grupos de protección terminal de este tipo incluyen también grupos de bloqueo hidrofílicos que se eligen por la presencia de la funcionalidad hidrofílica. Grupos de protección terminal de este tipo aumentan la hidrofilia de los compuestos de la presente invención y, así, refuerzan su solubilidad en medios acuosos. Estos grupos de protección terminal que refuerzan la hidrofilia se seleccionan preferiblemente de alcohol hidroxilado, alcanoílo polihidroxilado, aroílo hidroxilado, arilalcanoílo hidroxilado, aroílo polihidroxilado, arilalcanoílo polihidroxilado, polietilenglicol, glicosilatos, azúcares y éteres corona.

"Cicloalquilo C_3-C_8 " representa generalmente un radical hidrocarbonado cíclico que tiene 3 a 8 átomos de carbono y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes hidroxilo, amino, alquil C_1-C_6 -amino, dialquil C_1-C_6 -amino, alquilo C_1-C_6 , alquiloxi C_1-C_6 , tiol, alquil C_1-C_6 -tio, $=O$, $=NH$, $-CHO$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-COOCH_2CH_3$, $-CONH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ o halógeno, que pueden ser idénticos uno con otro o diferentes.

"Anillo heterocíclico", tal como se utiliza aquí anteriormente y aquí en lo que sigue con respecto al grupo formado por R^a y R^b junto con el grupo N-C interyacente, representa generalmente un sistema de anillo heterocíclico no

aromático de 3 a 7 miembros, preferiblemente 4, 5 ó 6 miembros, que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados del grupo de nitrógeno, oxígeno y azufre, que puede estar sustituido con uno o varios átomos de halógeno o grupos alquilo C₁-C₆, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alcoxi C₁-C₆, tiol, alquil C₁-C₆-tio, oxo, imino, fomilo, alcoxi C₁-C₆-carbonilo, amino-carbonilo, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo, que pueden ser idénticos uno con otro o diferentes y que pueden estar opcionalmente condensados con benzo o ciclohexano. Anillos heterocíclicos de este tipo son preferiblemente azetidina o se derivan de un grupo pirrol, piridina, tiazol, isoxazol, pirazol, imidazol, indol, bencimidazol, indazol, piridazina, pirimidina, pirazina total o parcialmente hidrogenado. Los más preferidos son azetidina, pirrolidina, 3,4-deshidropirrolidina, piperidina, hexahidro-1H-azepina, octahidroindol, imidazolidina, tiazolidina.

Si un anillo heterocíclico de este tipo está sustituido, los sustituyentes son, preferiblemente, metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo (isopropilo), butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, hidroxilo, amino, dimetil-amino, dietil-amino, tiol, metil-tiol, metoxi, etoxi, -CHO, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃ o -CONH₂.

"Arilo" representa generalmente un sistema de anillo aromático con 6 a 10, preferiblemente 6 átomos de carbono, que puede estar opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes hidroxilo, amino, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alquilo C₁-C₆, alquiloxi C₁-C₆, tiol, alquil C₁-C₆-tio, -CHO, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -CONH₂ o halógeno, que pueden ser idénticos uno con otro o diferentes, y que pueden estar opcionalmente condensados con benzo. Los sustituyentes arilo se pueden derivar preferiblemente de benceno, siendo ejemplos preferidos fenilo, 2-hidroxi-fenilo, 3-hidroxi-fenilo, 4-hidroxi-fenilo, 4-amino-fenilo, 2-amino-fenilo, 3-amino-fenilo.

Si arilo está sustituido, los sustituyentes son preferi-

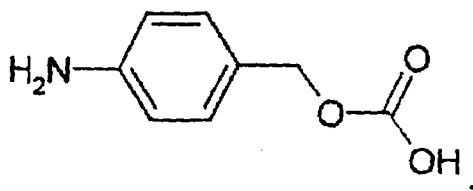
blemente metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo (isopropilo),
butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo,
hidroxilo, amino, dimetil-amino, dietil-amino, tiol, metil-
-tiol, metoxi, etoxi, -CHO, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃ o
5 -CONH₂.

"Heteroarilo" representa generalmente un sistema de anillo heterocíclico aromático de 5 a 10 miembros que contiene 1 a 5 heteroátomos seleccionados del grupo de nitrógeno, oxígeno o azufre, que puede estar opcionalmente sustituido
10 con uno o varios sustituyentes hidroxilo, amino, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alquilo C₁-C₆, alquiloxi C₁-C₆, tiol, alquil C₁-C₆-tio, -CHO, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -CONH₂ o halógeno, que pueden ser idénticos uno con otro o diferentes, y que pueden estar opcionalmente condensados con
15 benzo. Los sustituyentes heteroarilo se pueden derivar preferiblemente de furano, pirrol, tiofeno, piridina, bitazol, isoxazol, pirazol, imidazol, benzofurano, tianafteno, indol, bencimidazol, indazol, quinolina, piridazina, pirimidina, pirazina, quinazolina, pirano, purina, adenina, guanina,
20 timina, citosina, uracilo.

Si heteroacilo está sustituido, los sustituyentes son preferiblemente metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo (isopropilo), butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, hidroxilo, amino, dimetil-amino, dietil-amino, tiol,
25 metil-tiol, metoxi, etoxi, -CHO, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃ o -CONH₂.

"Residuo de un compuesto citotóxico o citostático" significa el compuesto H₂N-Cyt', que se libera tras la escisión del enlace amida mostrado en la fórmula (I), es citotóxico o
30 citostático por sí mismo o se puede convertir en una etapa subsiguiente en un compuesto citotóxico o citostático.

En este último caso, -Cyt' puede ser un residuo de la fórmula -L-Cyt", en donde L es un residuo de enlazador derivado de una molécula bifuncional, por ejemplo una diamina
35 H₂N-L'-NH₂, un aminoalcohol H₂N-L'-OH, por ejemplo alcohol p-amino-bencílico (PABOH), un aminocarbonato, por ejemplo



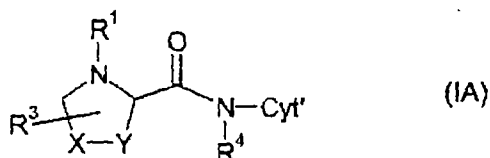
5

o un ácido aminocarboxílico no natural. Si -Cyt' es de la fórmula -L-Cyt", el compuesto $H_2N-L'-Cyt''$ se genera por la escisión enzimática del enlace amida mostrado en la fórmula (I). El compuesto $H_2N-L'-Cyt''$ puede ser citotóxico o citostático por sí mismo, o el residuo de enlazador se puede separar por escisión de Cyt" en una etapa subsiguiente liberando el agente citotóxico o citostático. Por ejemplo, el compuesto $H_2N-L'-Cyt''$ se puede hidrolizar en condiciones fisiológicas para dar un compuesto $H_2N-L'-OH$ y el compuesto H-Cyt" citotóxico o citostático, que es el agente terapéutico activo (en lo que sigue, solamente se utiliza el término Cyt' tanto para Cyt' como para Cyt", y solamente se utiliza el término L tanto para L como para L', por simplicidad).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales, formadas a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, sales no tóxicas convencionales de este tipo incluyen las que proceden de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, oxálico, trifluoroacético y similares.

Compuestos preferidos de la fórmula I son los de la fórmula IA

35



5

en donde R^2 , R^3 , R^4 , Cyt' son como se definen aquí anteriormente,

R^1 representa un grupo aminoalcanoílo u oligopeptidoílo, y X-Y representa CHR^2-CH_3 , $CR^2=CH$, $NH-CH_2$, CH_2-NH , $-CR^2-$,

10 $CH_2-CHR^2-CH_2$; con la condición de que R^1 represente un grupo aminoalcanoílo, di- o tri-peptidoílo, o R^1 represente un oligopeptidoílo que tiene más de tres restos aminoácido que no contiene una secuencia de aminoácidos Gln-Ser, en el caso de que X-Y represente un grupo CH_2-CH_2 .

15 Preferiblemente, el átomo de carbono α del residuo aminoácido cíclico es racémico, es decir de configuración (R/S), lo más preferiblemente de configuración (S); en una realización particularmente preferida, el átomo de carbono α es de configuración (S) y R^2 es H. En el caso de que R^2 sea OH, éste
20 está preferiblemente en posición trans.

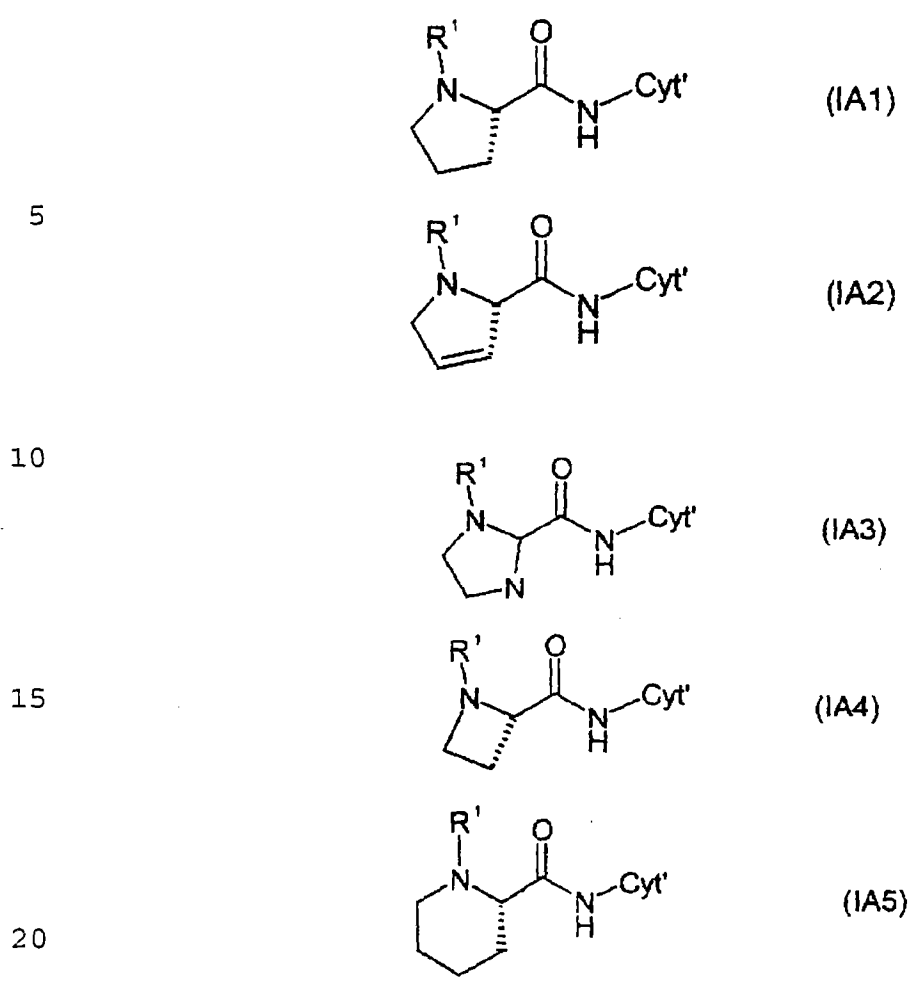
R^2 , R^3 representan preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, fenilo, metoxi, etoxi o hidroxilo, lo más preferiblemente un átomo de hidrógeno. R^4 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un
25 grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo o fenilo, lo más preferiblemente un átomo de hidrógeno.

Compuestos particularmente preferidos de la fórmula IA se seleccionan de las fórmulas IA1, IA2, IA3, IA4 y IA5

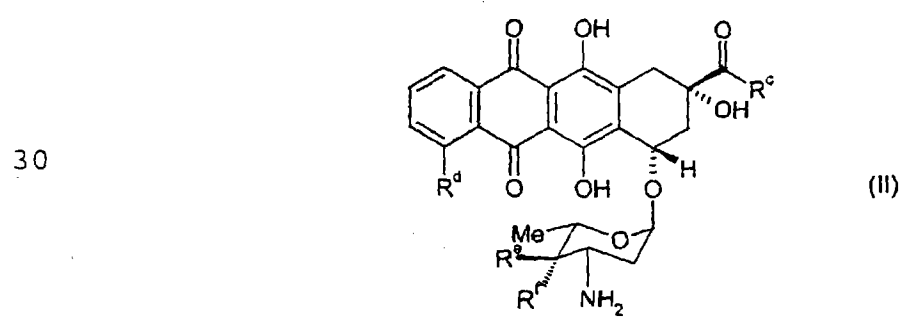
30

35

B



H₂N-Cyt' es preferiblemente un derivado de antraciclina
de la fórmula II



en donde
R^c representa alquilo C₁-C₆, hidroxialquilo C₁-C₆ o alcanoiloxi

C₁-C₆-alquilo C₁-C₆, en particular metilo, hidroximetilo, dietoxiacetoximetilo o butiriloximetilo;
R^d representa hidrógeno, hidroxilo o alcoxi C₁-C₆, en particular metoxi;

5 uno de R^e y R^f representa un átomo de hidrógeno; y el otro representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo o tetrahidropiran-2-iloxi (OTHP).

Son particularmente preferidos los siguientes compuestos de fórmula II:

10	R ^c	R ^d	R ^e	R ^f	Cyt
	CH ₂ OH	OCH ₃	H	OH	doxorubicina
	CH ₃	OCH ₃	H	OH	daunorubicina
	CH ₂ OH	OCH ₃	OH	H	epirubicina
15	CH ₃	H	H	OH	idarrubicina
	CH ₂ OH	OCH ₃	H	OTHP	THP
	CH ₂ OH	OCH ₃	H	H	esorubicina
	CH ₂ OCOCH(OC ₂ H ₅) ₂	OCH ₃	H	OH	detorubicina
	CH ₂ OH	H	H	OH	carminorubicina
20	CH ₂ OCOC ₄ H ₉	OCH ₃	H	OH	

El más preferido es doxorubicina (Dox). Otros residuos Cyt' citotóxicos o citostáticos se pueden derivar, por ejemplo, de metotrexato, trimetrexato, piritrexima, 5,10-
25 -didesazatetrahidrofolatopirimetamina, trimetroprim, 10-propargil-5,8-didesazafolato-2,4-diamino-5(3',4'-dicloro-fenil)-6-metilpirimidina, aminoglutetimida, goreserelina, melfalan, clorambucil, análogos u otros agentes quimioterapéuticos tales como 9-aminocamtotecina (para los ejemplos,
30 véase, por ejemplo, Burris HA, r.d. y S.M. Fields (1994). "Topoisomerase I inhibitors. An overview of the camptothecin analogs. [Review]." Hematol. Oncol. Clin, North Am. 8(2): 333-335; Iyer, L. y M.J. Ratain (1998). "Clinical pharmacology of camptothecins. [Review] [137 refs]." Cancer Chemother. Pharmacol. 42 Supl: pág. 31-pág. 43).

En la fórmula (I), Cyt' también puede ser una molécula de efector biológica que efectúa, directa o indirectamente,

la destrucción de células tumorales, tal como por ejemplo $\text{TNF}\alpha$.

Ejemplos preferidos de ácidos aminocarboxílicos, a partir de los cuales se pueden derivar A, B y D, son glicina (Gly) o las formas D o, más preferiblemente, L de alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), cisteína (Cys), metionina (Met), serina (Ser), treonina (Thr), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), prolina (Pro), trans-4-hidroxi-prolina (Hyp), 5-hidroxi-lisina (Hyl), norleucina (Nle), 5-hidroxinorleucina, 6-hidroxinorleucina (Hyn), ornitina (Orn), ciclohexilglicina (Chg), fenilglicina (Phg), glutamina (Gln), ciclohexilalanina (Cha), metionina-S-óxido (Met), β -ciclopropilalanina (Cpa), terc-leucina (Tle) u homo-serina (Hse).

Compuestos preferidos tienen la fórmula general (I), en donde la unidad A se deriva de alanina, valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), cisteína (Cys), metionina (Met), serina (Ser), treonina (Thr), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), prolina (Pro), trans-4-hidroxi-prolina (Hyp), 5-hidroxi-lisina (Hyl), norleucina (Nle), 5-hidroxinorleucina, 6-hidroxinorleucina (Hyn), ornitina (Orn), o ciclohexilglicina (Chg), fenilglicina (Phg), glutamina (Gln), ciclohexilalanina (Cha), metionina-S-óxido (Met), β -ciclopropilalanina (Cpa), terc-leucina (Tle) u homo-serina (Hse).

Son particularmente preferidos los compuestos de fórmula (I), en donde R^1 es un grupo seleccionado de las fórmulas (1) a (34):

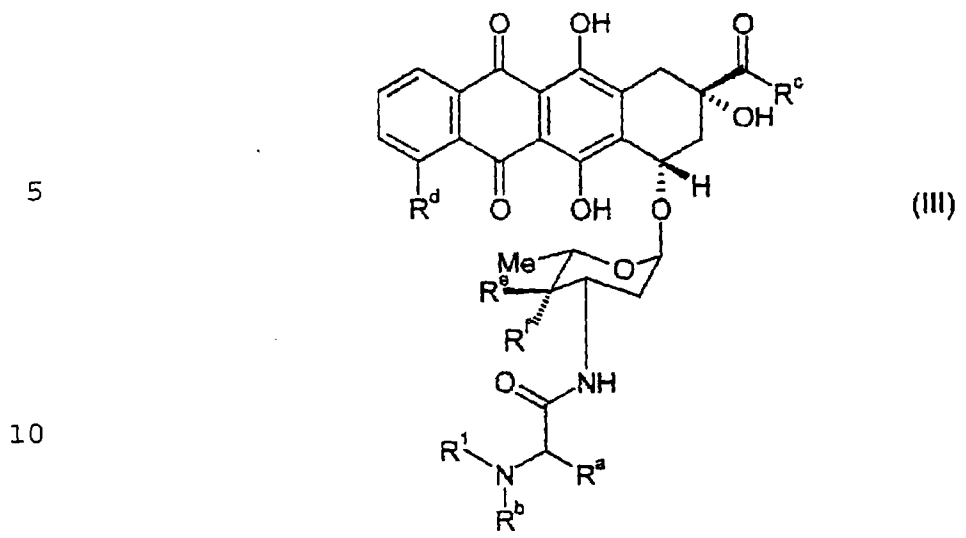
H-Chg	(1)	H-Tle	(18)
H-Lys	(2)	H-Hyl	(19)
H-Nle	(3)	H-Hse	(20)
H-Ala	(4)	Cg-Gly	(21)
H-Hyn	(5)	Cg-Nle	(22)
H-Pro	(6)	Cg-Val	(23)
H-Phg	(7)	Cg-Met	(24)
H-Gln	(8)	H-Xxx-Lys	(25)
H-trans-Hyp	(9)	H-Xxx-Hyn	(26)
H-Val	(10)	H-Xxx-Pro	(27)
H-Cha	(11)	H-Xxx-His	(28)
H-Met	(12)	H-Xxx-Met	(29)
H-Nva	(13)	H-Xxx-Ala	(30)
H-Met(O)	(14)	Cg-Xxx-Hyn	(31)
H-β-Cpa	(15)	Cg-Xxx-Ala-Gly	(32)
H-Ile	(16)	Cg-(Xxx) _m -Xxx-Ala-Gly	(33)
H-Ser	(17)	Cg-(Xaa) _m -Xaa-Gly	(34)

en donde

Cg representa un átomo de hidrógeno o un grupo de protección
5 terminal seleccionado de benzoiloxicarbonilo, fenilacetilo,
fenilmetilsulfonilo y bencilaminocarbonilo; Xaa representa un
resto derivado de un ácido aminocarboxílico, preferiblemente
seleccionado del grupo de aminoácidos naturales, en particu-
lar del grupo que consiste en Ala, Pro, Tyr, Phe, His, Ser,
10 Thr, Hyp y Lys; y m es un número entero de 1 a 6.

Grupos de protección terminal Cg preferidos son acetilo
(Ac), succinimidilo (Suc), D-alanilo, benciloxicarbonilo (Cbz
o Z), o macromoléculas tal como polietilenglicol.

Profármacos de antraciclina preferidos son los compues-
15 tos de fórmula III



15 en donde R^a , R^b , R^c , R^d , R^e , R^f y R^g son como se definen aquí anteriormente.

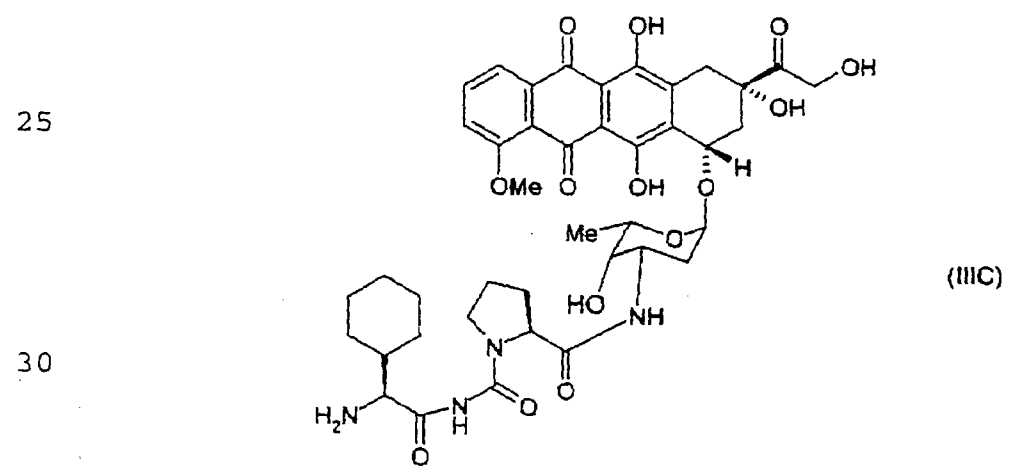
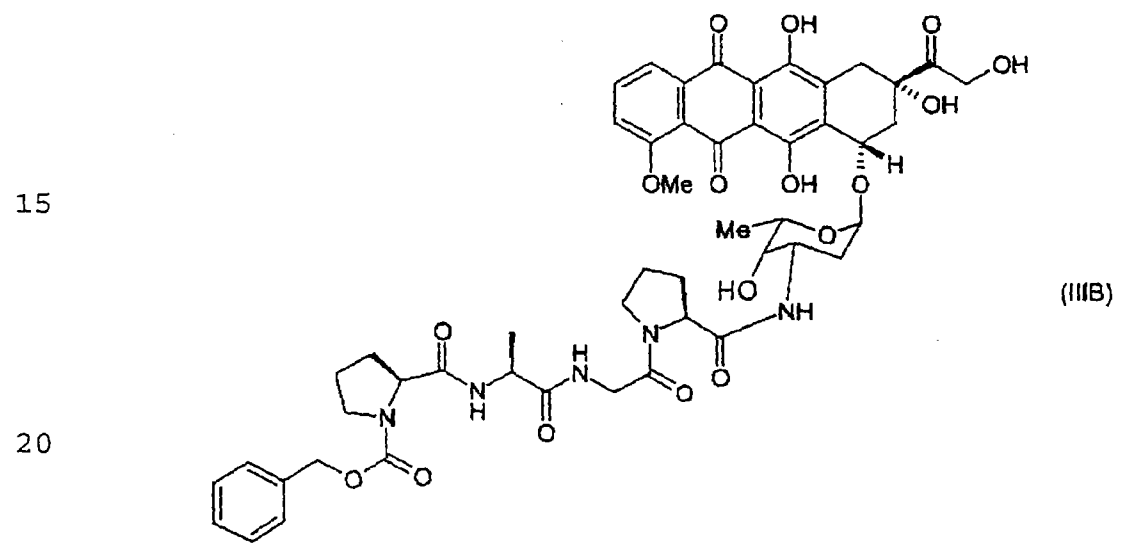
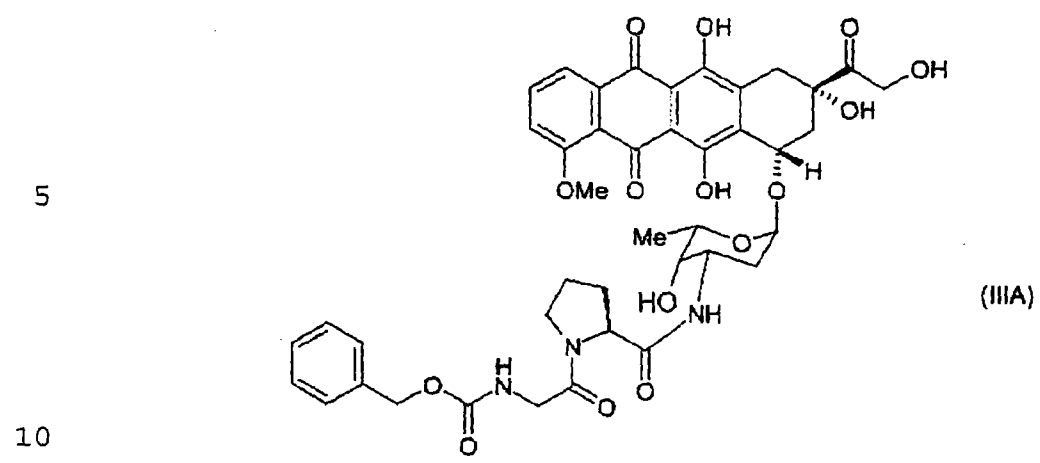
Compuestos más preferidos de la invención son derivados de doxorubicina de las fórmulas (IIIA) a (IIIF):

20

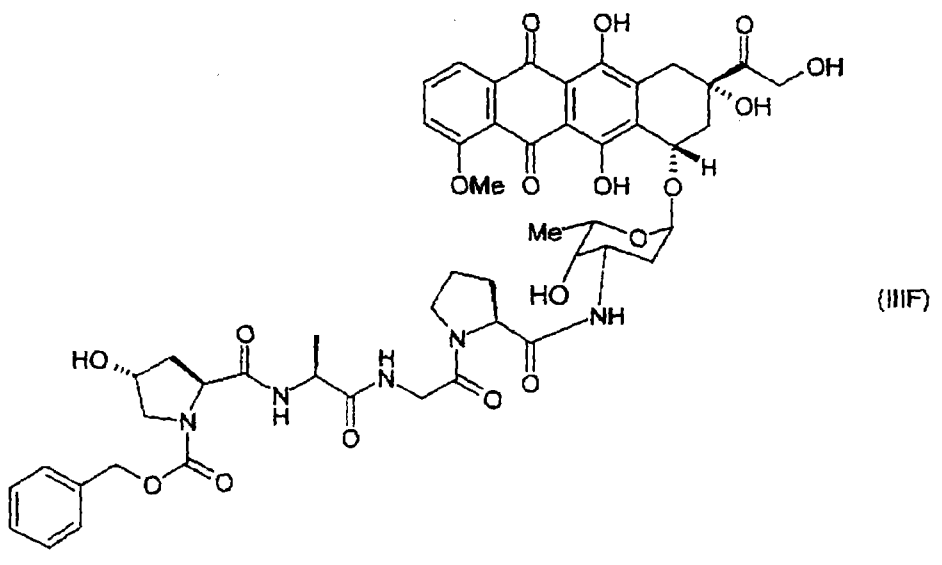
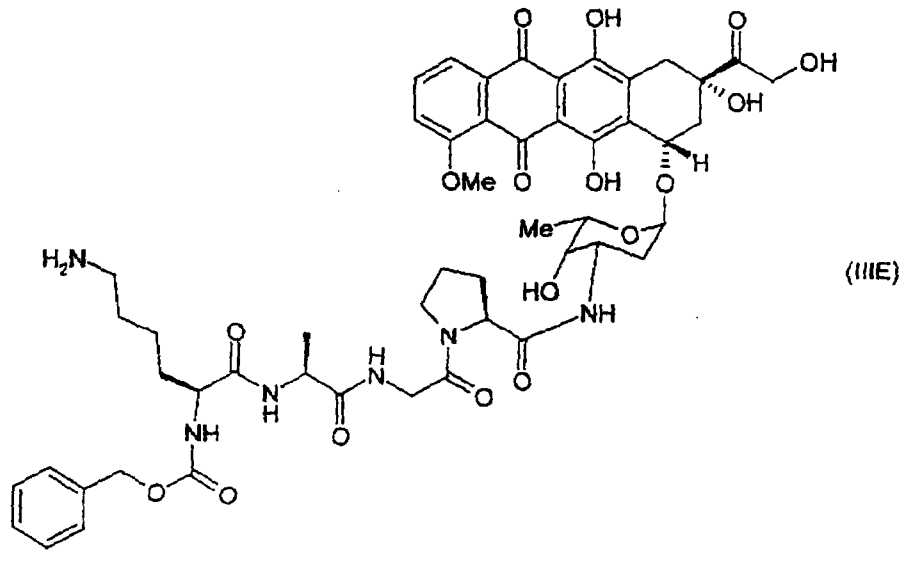
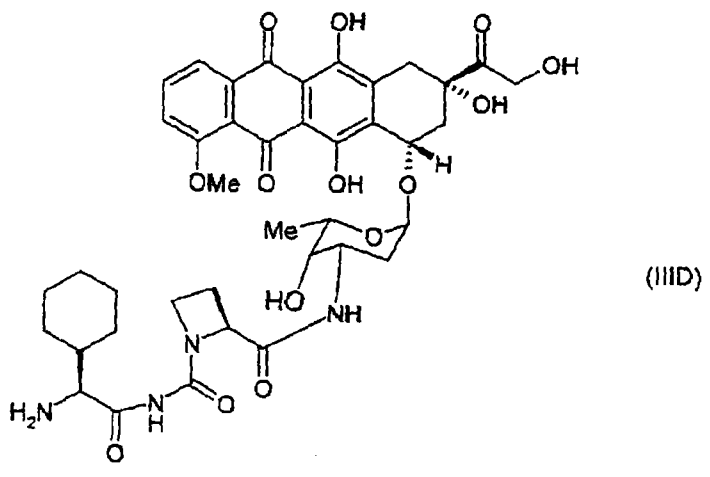
25

30

35



35



Si la parte Cg-B-A o Cg-(D)_m-B-A de la fórmula (I) contiene dos o más átomos de azufre, el compuesto de la invención puede contener uno o más enlaces disulfuro.

Una clase de compuestos citotóxicos o citostáticos que se puede utilizar para la presente invención tiene una función amino primaria que está disponible para la formación de un enlace amídico tal como se muestra en la fórmula (I), tal como doxorubicina. En este caso, no es necesaria una molécula de enlazador L. Si un compuesto citostático o citotóxico no tiene una función amino de este tipo, se puede crear una función de este tipo en un compuesto de este tipo por medio de modificación química, por ejemplo introduciendo o convirtiendo un grupo funcional o fijando una molécula de enlazador en el compuesto. Una molécula de enlazador también se puede insertar entre la parte oligómera (es decir la parte que comprende los residuos aminocarboxílicos) y la parte citostática o citotóxica del compuesto de la invención para asegurar u optimizar la escisión del enlace amida entre la parte oligómera y la parte citotóxica o citostática. Si está presente una molécula de enlazador, es decir en compuestos que contienen la estructura L-Cyt', el enlace entre L y Cyt' es preferiblemente un enlace amídico o éster. En una realización preferida, una molécula de enlazador de este tipo se separa por hidrólisis del compuesto citostático o citotóxico en condiciones fisiológicas después de la escisión enzimática y, así, se genera el compuesto citostático o citotóxico libre. En cualquier caso, el compuesto de la invención tiene que tener la propiedad de ser escindible tras la acción catalítica de PAF α y, como consecuencia directa o indirecta de esta escisión, liberar en condiciones fisiológicas un compuesto citostático o citotóxico.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un profármaco que es capaz de ser convertido en un fármaco mediante la acción catalítica de PAF α , teniendo dicho profármaco un sitio de escisión que es reconocido por PAF α , y siendo dicho fármaco citotóxico o citostático en condicio-

nes fisiológicas. Un profármaco de este tipo comprende preferiblemente una parte oligómera que comprende dos o más residuos aminocarboxílicos y una parte citotóxica o citostática, en donde el residuo aminocarboxílico C-terminal de la

5 parte oligómera es un aminoácido cíclico de 3 a 7 miembros, natural o no natural, preferiblemente D- o L-prolina, o D- o L-hidroxiprolina, y la función carboxi C-terminal está enlazada a la parte citotóxica o citostática por un enlace amida que se puede escindir por la acción catalítica de PAF α .

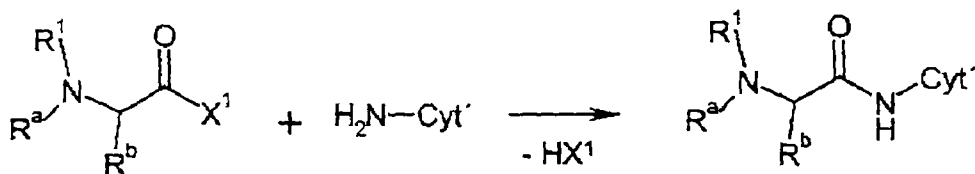
10 La parte oligómera es preferiblemente un péptido. Preferiblemente, la parte oligómera comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce residuos ácido aminocarboxílico, más preferiblemente dos, tres o cuatro residuos aminocarboxílicos. La función N-terminal está

15 preferiblemente protegida por un grupo de protección terminal.

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar por procedimientos conocidos en la técnica (E. Wünsch, Synthese von Peptiden, en "Methoden der organischen Chemie", Houben-

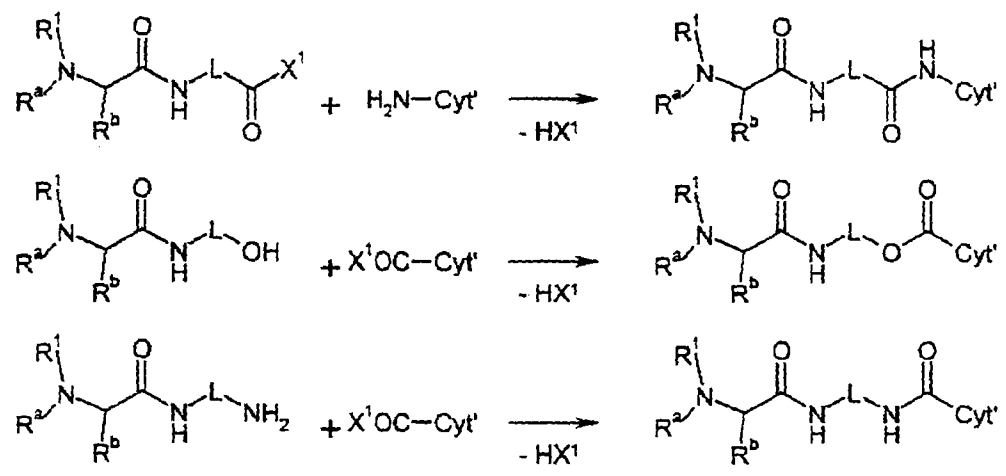
20 -Weyl (comps. E. Müller, O. Bayer), vol. XV, Partes 1 y 2, editorial Georg Thieme, Stuttgart, 1974). Por ejemplo, los compuestos se podrían sintetizar en un modo de síntesis en bloque por condensación de la función carboxi terminal de la parte oligómera, en donde X puede ser OH o un grupo lábil de

25 activación, resultando el grupo amino de la molécula citotóxica o citostática H₂N-Cyt' en una formación amida.



30 Si se requiere un residuo de enlazador (L) entre la

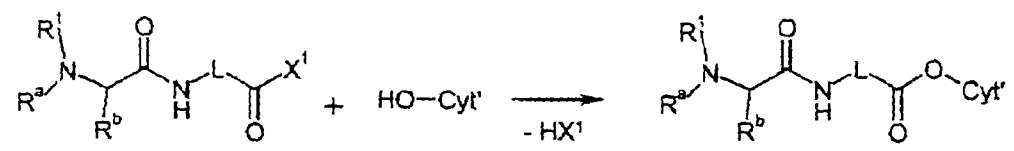
parte oligómera y el agente citotóxico o citostático, la síntesis en bloque se puede realizar de la misma manera.



5

Si el agente citotóxico o citostático porta una función carboxi para la fijación a la parte oligómera, la molécula de enlazador puede ser una imina o un aminoalcohol, y la síntesis en bloque de compuestos de este tipo se puede llevar a cabo de una manera similar por reacción del XOC-Cyt' activado con el componente hidroxí o el componente amino.

10



15

Si el reactivo citotóxico o citostático tiene una función hidroxí que es adecuada para el acoplamiento a la parte oligómera, el residuo de enlazador puede ser un ácido aminocarboxílico y se puede realizar una síntesis en bloque de manera similar.

20

Si es necesario, otros grupos funcionales en las

unidades Cyt', L, hidroxiprolina, A, B y D, que no reaccionarán durante la reunión de las moléculas dianas, se pueden proteger mediante grupos protectores adecuados. Grupos protectores adecuados son bien conocidos a partir del estado
5 de la técnica (P.G.M. Wuts, "Protective groups in organic synthesis", John Wiley and Sons Inc., Nueva York, 1991). Estos grupos protectores se separan al término de la síntesis.

Solamente a título de ejemplo, grupos protectores de
10 amino útiles pueden incluir, por ejemplo, grupos alcanóilo C_1-C_{10} tales como formilo, acetil-dicloroacetilo, propionilo, 3,3-dietilhexanoílo y similares, grupos alcoxi C_1-C_{10} -carbonilo y aralquiloxi C_6-C_{17} -carbonilo tales como terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo (BOC), fluorenilmtoxycarbonilo y
15 similares. El más preferido es fluorenilmtoxycarbonilo (FMOC).

Grupos protectores de carboxi adecuados pueden incluir, por ejemplo, grupos alquilo C_1-C_{10} tales como metilo, terc-butilo, decilo; aralquilo C_6-C_{17} tales como bencilo, 4-
20 -metoxibencilo, difenilmtilo, trifenilmtilo, fluorenilo; tri-(alquil C_1-C_{10})sililo o (alquil C_1-C_{10})-diarilsililo tal como trimetilsililo, dimetil-terc-butilsililo, difenil-terc-butilsililo y grupos relacionados.

Para conseguir formaciones éster o amida de este tipo,
25 puede ser necesario activar el grupo carbonilo del ácido carboxílico para un ataque nucleófilo de una amina o alcohol, es decir para que X sea un grupo de activación o grupo lábil que sea adecuado para ser sustituido por un grupo amino. Esta activación se puede realizar mediante la conversión del ácido
30 carboxílico en un cloruro de ácido o fluoruro de ácido, o por conversión del ácido carboxílico en un éster activado, por ejemplo un éster N-hidroxisuccinimidílico o un éster pentafluorofenílico. Otro método de activación es la transformación en un anhídrido simétrico o asimétrico. Alternativamente,
35 te, la formación de los enlaces amida o éster se puede conseguir mediante el uso de reactivos de acoplamiento in

situ tales como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP) (E. Frerot et al., Tetrahedron, 1991, 47, 259-70), 1,1'-carbonildimidazol (CDI) (K. Akaji et al., THL, 35, 1994, 3315-18), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (R. Knorr et al., THL, 30, 1989, 1927-30), 1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT) (B. Blankenmeyer-Menge et al., THL, 31, 1990, 1701-04).

Como una alternativa a la síntesis en bloque, las moléculas en la fórmula general (I) se pueden reunir de una manera escalonada partiendo de la parte de la derecha mediante reacciones de condensación escalonadas de los respectivos monómeros Cyt', L, grupo aminoácido cíclico formado por R^a, R^b y el grupo N-C adyacente, en particular prolina o hidroxiprolina, A, B y D. Para la reacción de condensación se pueden emplear los mismos métodos de acoplamiento antes mencionados. Dado que las unidades L, prolina/hidroxiprolina, A, B y D son al menos moléculas bifuncionales que contienen un grupo amino y (al menos las unidades A, B, D y el grupo aminoácido cíclico formado por R^a, R^b y el grupo N-C interyacente, en particular prolina/hidroxiprolina) un grupo carboxi, el grupo amino necesita ser bloqueado por un grupo protector (PG) antes de la activación de la función carboxílica. Para la protección de los grupos amino se puede emplear el grupo BOC o, preferiblemente, el grupo FMOC. Después de la reacción de acoplamiento, el grupo protector de amino ha de ser separado, y se puede llevar a cabo el acoplamiento con la siguiente unidad protegida con Fmoc o Boc. Si es necesario, otros grupos funcionales en las unidades Cyt', L, el grupo aminoácido cíclico formado por R^a, R^b y el grupo N-C interyacente, en particular hidroxiprolina, A, B y D, que no reaccionarán durante la reunión de las moléculas dianas, se pueden proteger mediante grupos protectores adecuados. Estos grupos protectores se separan al término de la síntesis.

Grupos de protección terminal, según se definen en el contexto de la fórmula (I), también pueden servir como grupos

de protección, en particular cuando se añade la última unidad de ácido aminocarboxílico (N-terminal). En este último caso, el grupo protector no se separa, ya que es una parte de la molécula diana. Alternativamente, el grupo de protección
5 terminal se puede añadir después de haber acoplado y desprotegido la última unidad de ácido aminocarboxílico.

La síntesis escalonada se esboza en los siguientes esquemas. El segundo esquema es ejemplar, dado que el residuo de enlazador así como el residuo Cyt' pueden contener otros
10 grupos funcionales según se indica en este esquema (véase antes):

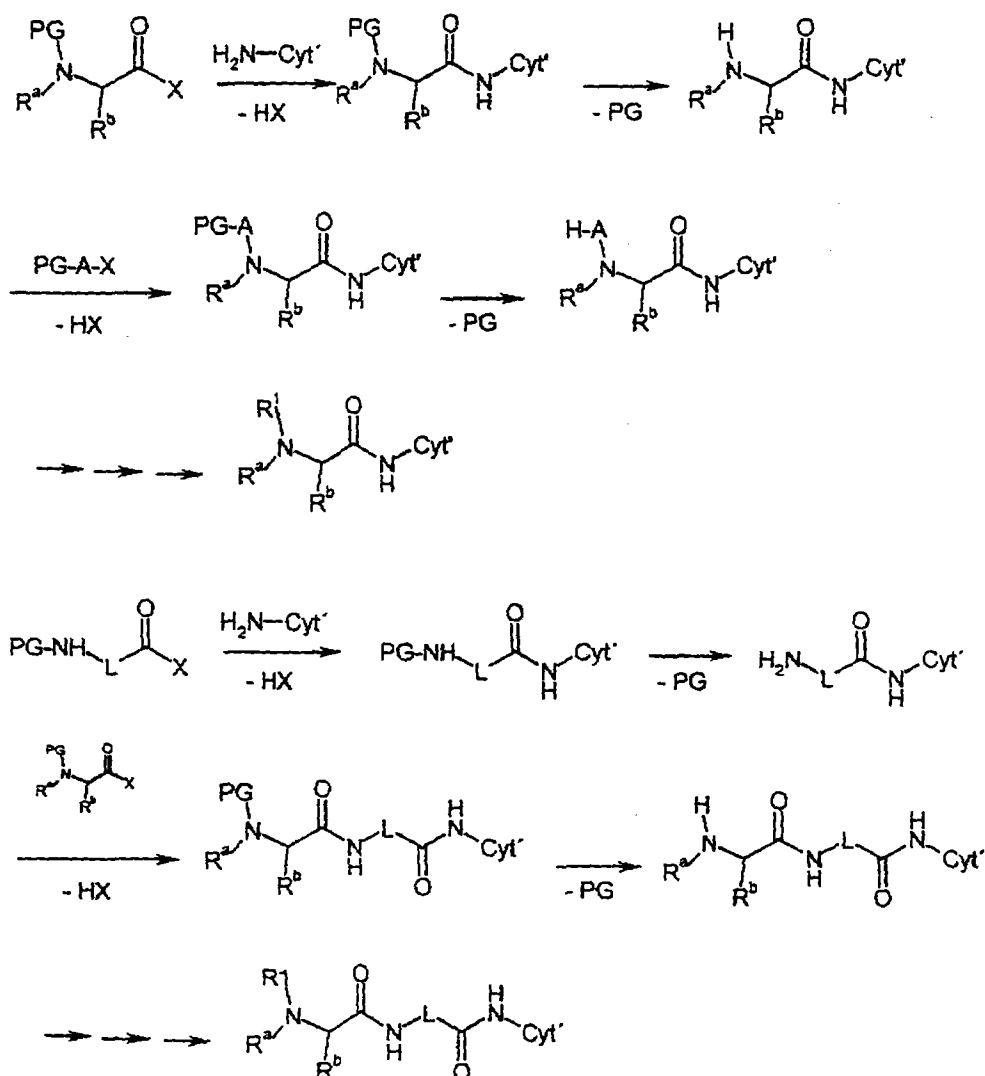
15

20

25

30

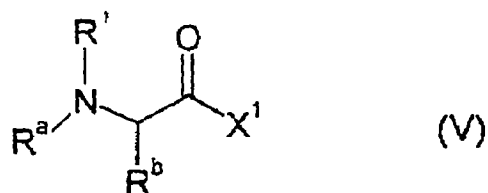
35



Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de la fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de la fórmula

5 fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (V)

- 31 -



5

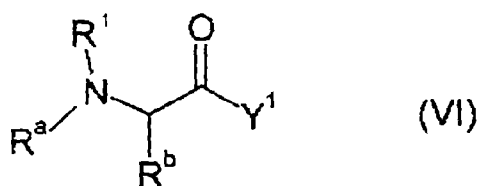
en donde R^1 , R^a y R^b son como se definen aquí anteriormente, X^1 representa OH o un grupo lábil que es adecuado para ser sustituido con un grupo amino,

10 se hace reaccionar con un compuesto $HN(R^4)\text{-Cyt}'$, en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático, y R^4 es como se define aquí anteriormente.

Preferiblemente, X^1 dentro de la fórmula (V) es un grupo lábil, por ejemplo -Cl, -F, N-hidroxisuccinimidilo, penta-
 15 fluorofenilo o un carboxilato. Alternativamente, X^1 puede ser OH, y la condensación se consigue mediante el uso de un reactivo de acoplamiento in situ, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), tetrafluoroborato de
 20 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) ó 1-(mesitileno-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT).

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de la fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (VI)

25



30

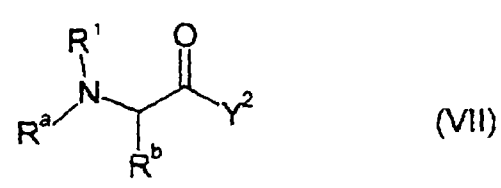
en donde R^1 , R^a y R^b son como se definen en la reivindicación 1, Y^1 representa $L\text{-COX}^2$, en donde L es un residuo de enlazador, y X^2 representa OH o un grupo lábil que es adecuado para
 35 ser sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxilo, se hace reaccionar con un compuesto $H_2N\text{-Cyt}'$ o con un com-

puesto HO-Cyt', en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático.

Preferiblemente, X² en la fórmula (VI) es un grupo lábil, por ejemplo -Cl, -F, N-hidroxisuccinimidilo, penta-
 5 fluorofenilo o un carboxilato. Alternativamente, X² puede ser OH, y la condensación se consigue mediante el uso de un reactivo de acoplamiento in situ, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), tetrafluoroborato de
 10 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) ó 1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT).

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de la fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (VII)

15



20

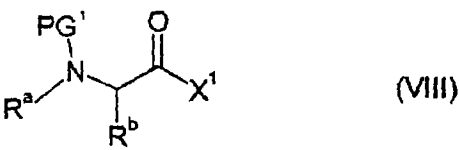
en donde R¹, R^a y R^b son como se definen aquí anteriormente, Y² es de la fórmula L-OH o L-NH₂, en donde L es un residuo de enlazador,

se hace reaccionar con un compuesto X³OC-Cyt', en donde X³
 25 puede ser OH o un grupo lábil que es adecuado para ser sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxilo, y en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático.

Preferiblemente, X³ del compuesto X³OC-Cyt' es un grupo lábil, por ejemplo -Cl, -F, N-hidroxisuccinimidilo, penta-
 30 fluorofenilo o un carboxilato. Alternativamente, X puede ser OH, y la condensación se consigue mediante el uso de un reactivo de acoplamiento in situ, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), tetrafluoroborato de
 35 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) ó 1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (MSNT).

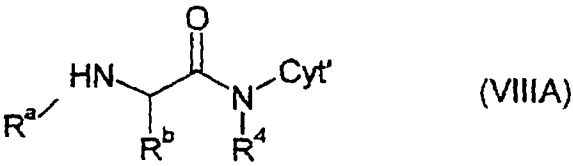
Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I), caracterizado porque un compuesto H_2N-Cyt' se condensa escalonadamente con las unidades que constituyen el compuesto de la fórmula (I). Antes de cada etapa de acoplamiento, puede ser necesario separar un grupo protector PG, si está presente.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (VIII)



15

en donde PG^1 es un grupo protector y los otros sustituyentes tienen el significado según se describe anteriormente, se hace reaccionar con un compuesto $HN(R^4)-Cyt'$, en donde Cyt' es un residuo de un compuesto citotóxico o citostático; a continuación, el grupo protector PG^1 se separa y el compuesto resultante de fórmula (VIII A)



25

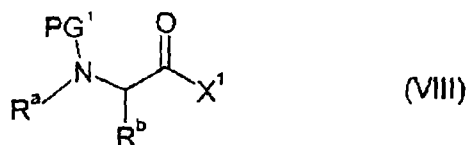
se hace reaccionar subsiguientemente con un compuesto PG^2-A-X^4 , en donde PG^2 es un grupo protector y X^4 representa OH o un grupo lábil adecuado para ser sustituido con un grupo amino; y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son necesarias, hasta que se obtenga el compuesto completo.

PG^1 y PG^2 pueden ser, por ejemplo, BOC o, preferiblemente, FMOC.

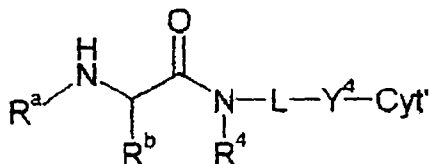
Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención

35

es un procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de fórmula $PG^3-N(R^4)-L-COX^3$, en donde PG^3 es un grupo protector y los otros sustituyentes tienen el significado según se describe anteriormente, se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula Y^4-Cyt' , en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático; e Y^4 representa H_2N o HO ; a continuación se separa el grupo protector PG^3 ; y el compuesto $HN(R^4)-L-Y^4-Cyt'$ resultante se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula (VIII)



a continuación se separa el grupo protector PG^1 y el compuesto resultante de fórmula



se hace reaccionar a continuación con un compuesto PG^4-A-X^4 , en donde PG^4 es un grupo de protección, y X^4 puede ser OH , o un grupo lábil adecuado para ser sustituido con un grupo amino; y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son necesarias, hasta que se obtenga la molécula completa.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de un compuesto de la fórmula (I), caracterizado porque

un compuesto de fórmula $PG^5-N(R^4)-L-Y^5$, en donde

PG^5 representa un grupo protector, Y^5 representa OH o NH_2 , y los sustituyentes tienen el significado según se describe

anteriormente,

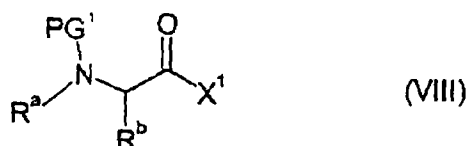
se hace reaccionar con un compuesto de fórmula $X^5OC-Cyt'$, en donde

Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático,

5 y X^5 es OH o un grupo lábil adecuado;

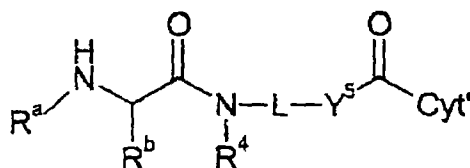
a continuación se separa el grupo protector PG^5 ; y el compuesto $HN(R^4)-L-Y^5-CO-Cyt'$ resultante se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula (VIII)

10



15 a continuación se separa el grupo protector y el compuesto resultante

20

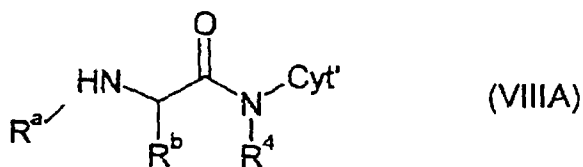


se hace reaccionar a continuación con un compuesto PG^2-A-X^4 , en donde

25 PG^2 es un grupo protector, y X^4 representa OH, o un grupo lábil adecuado para ser sustituido con un grupo amino; y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son necesarias, hasta que se obtenga la molécula completa.

Otro aspecto de la presente invención son los nuevos
30 compuestos intermedios de fórmula VIIIA

35



en donde R^a , R^b , R^c y Cyt' son como se definen aquí anteriormente.

Los compuestos de la invención están destinados para el uso médico. En particular, estos compuestos son útiles para el tratamiento de tumores que están asociados con fibroblastos del estroma que expresan PAF α y que, en general, no son óptimamente tratados con agentes citotóxicos y/o citostáticos disponibles. Tumores con esta propiedad son, por ejemplo, cánceres epiteliales tales como carcinomas de pulmón, pecho y colon. Con estos compuestos también se pueden tratar tumores tales como sarcomas de huesos y tejido blando que expresan PAF α .

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención y, opcionalmente, uno o más excipientes adecuados y farmacéuticamente aceptables, según se ejemplifica en: Remington: the science and practice of pharmacy. 19^a ed. Easton: Mack Publ., 1995. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma de sólidos o soluciones. Las formulaciones sólidas pueden ser para la preparación de una solución antes de la inyección. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la invención son soluciones para inyección. Estas se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo por inyección intravenosa, o tópica, por ejemplo por inyección directa en el sitio del tumor. La dosificación se ajustará de acuerdo con factores tales como peso corporal y el estado de salud del paciente, la naturaleza de la enfermedad subyacente, la ventana terapéutica del compuesto a aplicar, la solubilidad y similares. Está dentro del conocimiento del experto ajustar apropiadamente la dosificación. Para conjugados de doxorubicina, por ejemplo, la dosis estará preferiblemente en el intervalo de 10 mg/m² a 1350 mg/m², pero también pueden ser apropiadas dosis mayores o menores.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención es el uso de un compuesto de la invención en la

preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. Además, un aspecto de la invención es un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. Indicaciones incluyen el

- 1) el tratamiento de carcinomas epiteliales que incluyen los de origen de pecho, pulmonar, colorrectal, cabeza y cuello, pancreático, de ovarios, de vejiga, gástrico, de la piel, endometrial, de ovarios, testículos, esófago, próstata y renal;
- 2) sarcomas de huesos y tejido blandos: osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno (MFH), leiomiosarcoma;
- 3) enfermedades hematopoyéticas: linfomas de Hodgkin y no de Hodgkin;
- 4) tumores neuroectodermales: tumores nerviosos periféricos, astrocitomas, melanomas;
- 5) mesoteliomas.

Está también incluido el tratamiento de estados inflamatorios crónicos tales como artritis reumatoide, osteoartritis, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, arterioesclerosis y cicatrización anormal de heridas.

Un aspecto adicional de la invención es un método para el tratamiento del cáncer, en el que un profármaco se administra a un paciente, en donde dicho profármaco es capaz de ser convertido en un fármaco citotóxico o citostático por una actividad enzimática, siendo dicha actividad enzimática el producto de expresión de células asociadas con tejido tumoral. Preferiblemente, dicha actividad enzimática es la actividad proteolítica de PAF α .

Un método de administración de los compuesto es la infusión intravenosa. Otras vías posibles de administración incluyen la vía intraperitoneal (ya sea en forma de un bolo o infusión), la inyección intramuscular o intratumoral. En el caso de que sea apropiado, también es posible la aplicación

directa (por ejemplo fibrosis pulmonar).

Figuras

- 5 Figura 1: Escisión de conjugados de doxorubicina-péptido por parte de PAF α . Cromatogramas para ZGP-Dox (Z-Gly-(L)-Pro-doxorrubicina) después de incubación con la proteína de fusión FAPmCD8 purificada (A) o con tampón (B). Véase el Ejemplo 5.
- 10 Figura 2: Reducción de la citotoxicidad por doxorubicina por conjugación de doxorubicina a péptidos escindibles por PAF α . Véase el Ejemplo 6.
- Figura 3: Demostración de la citotoxicidad de doxorubicina liberada a partir de conjugados de doxorubicina-péptido
- 15 escindibles por PAF α mediante células del clon 33 de HT1080 que expresa PAF α frente a células HT1080 parenterales. Véase el Ejemplo 8.
- Figura 4: Estabilidad en plasma de N-Cbz-Gly-(L)-Pro-doxorrubicina y N-Cbz-(L)-Pro-(L)-Ala-Gly-(L)-Pro-doxorrubicina en
- 20 plasma de ratones y humano. Véase el Ejemplo 9.
- Figura 5: Demostración de la actividad enzimática de PAF α y confirmación de su peso molecular aparente en muestras de tejido tumoral humano. Véase el Ejemplo 12.

Un experto en la técnica apreciará que, a pesar de que

25 en los siguientes ejemplos se esbozan reactivos y condiciones de reacciones específicos, se pueden realizar modificaciones que pretenden estar abarcadas por el alcance de la invención. Por lo tanto, los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar adicionalmente la invención y no son limitantes.

30

Ejemplos

Ejemplo 1: Procesos de síntesis de conjugados de doxorubicina

- 35 **N-Cbz-Gly-Pro-doxorrubicina:** N-Cbz-Gly-Pro (116,1 mg, 0,37 mmol) y N-hidroxisuccinimida (44 mg, 0,37 mmol) se pesaron y

dispusieron en un matraz de fondo redondo de 2 bocas bajo dinitrógeno. Se añadió N,N-dimetilformamida anhidra (20 ml), y el matraz se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió dicilohexilcarbodiimida (78 mg, 0,37 mmol) en forma de
5 1 ml de solución en N,N-dimetilformamida. La solución se agitó a 0°C durante 40 minutos.

Doxorrubicina · HCl (100 mg, mmol) se pesó en un vial con una pequeña varilla de agitación y se dispuso bajo dinitrógeno. Con agitación se añadieron al vial N,N-dimetil-
10 formamida (3 ml) y N,N-diisopropiletilamina (33,1 µl, 0,19 mmol). La solución de doxorrubicina se añadió a través de una jeringa a la solución de péptido, y el vial se aclaró con 2 ml adicionales de N,N-dimetilformamida. El baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó durante aproximada-
15 mente 48 horas a temperatura ambiente.

La solución de reacción se extrajo con acetato de etilo (500 ml). El acetato de etilo se lavó secuencialmente con solución acuosa de ácido cítrico al 10% (250 ml), bicarbonato de sodio acuoso saturado (250 ml) y salmuera (250 ml). El
20 extracto orgánico se secó con MgSO₄ anhidro y el disolvente se separó con un evaporador rotatorio. El producto, que era rico en DMF contaminante, se cromatografió en una columna de resolución rápida de fase inversa C-18 con 8:2 metanol:agua como eluyente. Se aisló una mancha naranja, $r_f \approx 0,3$, que
25 fluorescía bajo luz UV de longitud de onda larga. El metanol se separó con el evaporador rotatorio y las últimas trazas de disolvente se separaron con la bomba de alto vacío durante una noche.

30 **N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro:** N-Cbz-Pro-Ala (5 g, 15 mmol) y carbonyldiimidazol (2,43 g, 15 mmol) se dispusieron en un matraz de fondo redondo de 3 bocas, de 250 ml, bajo una atmósfera de argón. Se añadió tetrahidrofurano anhidro (50 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante aproximada-
35 mente 45 minutos. Se observó un desprendimiento riguroso de un gas (CO₂).

En un matraz separado se pesó Gly-Pro-OCH₃·HCl (2,9 g, 15 mmol). Se añadieron tetrahidrofurano (5 ml) y N,N-diisopropiletilamina (5,23 ml, 30 mmol), y la solución se agitó durante varios minutos. El material que se disolvía se añadió a través de una jeringa al péptido activado y el material remanente se disolvió en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ y también se añadió al péptido activado a través de una jeringa.

La solución de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente (15 horas) y por la mañana existían cantidades copiosas de precipitado blanco. La mezcla de reacción se lavó con solución acuosa de ácido cítrico al 10% (300 ml) y se extrajo con acetato de etilo (500 ml). El extracto en acetato de etilo se lavó con solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (300 ml) y se secó con salmuera (300 ml) y MgSO₄ anhidro. El acetato de etilo se separó con el evaporador rotatorio para proporcionar 5 g de un aceite incoloro que dio datos de caracterización satisfactorios.

El aceite bruto de N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro-OCH₃ (5 g, 12 mmol) se disolvió en metanol (20 ml) en un matraz de fondo redondo. El matraz se dispuso en un baño de agua a temperatura ambiente. Cuidadosamente se añadió solución de hidróxido de sodio 1 N (12 ml). La solución se agitó durante 3,5 horas, tiempo después del cual se añadió solución de HCl 1 N (12 ml). La solución se concentró en el evaporador rotatorio y se añadieron unas pocas gotas más de HCl 1 N hasta que el pH era de aproximadamente 1,5 con papel de pH. El agua se separó con la bomba de vacío para dar un aceite que recristalizó lentamente en etanol.

N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro-doxorrubicina: N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro (180 mg, 0,38 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (15 ml). 1-hidroxibenzotriazol (51,3 mg, 38 mmol) y diciclohexilcarbodiimida (78 mg, 38 mmol) se disolvieron en 1 ml de en cada caso N,N-dimetilformamida y se añadieron al péptido en forma de soluciones. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 45 minutos.

Doxorrubicina · HCl (116 mg, 20 mmol) se pesó en un vial separado y se disolvió en N,N-dimetilformamida (3 ml). N,N-diisopropiletilamina (34,8 µl, 20 mmol) se introdujo a través de una jeringa en el vial que contenía la doxorrubicina y los contenidos se agitaron durante varios minutos para asegurar una disolución completa. La solución de doxorrubicina se añadió a través de una jeringa al péptido activado. La solución se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente.

El producto se extrajo con acetato de etilo (2 l) y se lavó con solución acuosa de ácido cítrico al 10% (500 ml). La capa en acetato de etilo se separó, se secó con MgSO₄ y se concentró para formar un aceite en el evaporador rotatorio. El aceite se cromatografió en gel de sílice de fase inversa C-18, que dio una mancha fluorescente por UV de longitud de onda larga, naranja, a $r_f = 0,25$. El producto final dio datos de caracterización satisfactorios.

Ejemplo 2: Preparación de líneas de células que expresan PAF α

Se prepararon líneas de células de mamífero que expresan PAF α recombinante. Células de fibrosarcoma HT1080, ampliamente conocidas y disponibles de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Braunschweig, Alemania) bajo el número de acceso DSMZ ACC 315, se mantuvieron en una mezcla de DMEM/F12 50:50 que contenía suero de bovino fetal al 10% en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Células HT1080 se transfectaron con vector FAP.38 (documento WO 97/34927, Scanlan et al., loc. cit.) utilizando el método de lipofectina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Gibco/BRL). Los transfectantes se seleccionaron en cuanto a la resistencia a antibióticos (200 µg/ml de geneticina) y, después de ello, se mantuvieron en un medio que contenía geneticina. Se recogieron colonias individuales de células resistentes, se hicieron crecer hasta la confluencia en placas de Petri de cultivo de tejido de 10 cm y se sometieron a ensayo en cuanto a la expresión de PAF α en un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal F19

específico de PAF α según se describe (Garin-Chesa et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(18), 7235-7239). La línea de células HT1080 parenteral no mostró ninguna expresión detectable de PAF α en este ensayo de inmunofluorescencia, mientras que un clon, al que en lo que sigue se le denomina clon 33 de HT1080, era positivo para PAF α .

De manera similar, células 293 de riñón embrionario humano, ampliamente conocidas y disponibles de American Tissue Type Collection (Rockville, MD) se mantuvieron en DMEM que contenía suero de bovino fetal al 10% en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se transfectaron con un vector de expresión de PAF α , pFAP.38, utilizando la transfección con fosfato de calcio según se describe (Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K. A. y Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J. Biol. Chem. 269(41), 25646-25654). Transfectantes se seleccionaron y analizaron según se describe anteriormente para la expresión de PAF α . La línea de células 293 parenteral no mostró ninguna expresión detectable de PAF α . Un clon, al que se le alude en lo que sigue como 293-I/2 era PAF α positivo.

Ejemplo 3: Examen de la expresión de PAF α en líneas de células transfectadas

La expresión de PAF α se examinó en las células HT1080 y del clon 33 de HT1080. El marcaje metabólico, las inmunoprecipitaciones y la fluorografía se efectuaron esencialmente según se describe (Park et al. (1991) Somatic Cell Mol. Genet. 17(2), 137-150). Células HT1080 y del clon 33 de HT1080 se marcaron metabólicamente con ³⁵S-metionina. Los extractos detergentes de estas células se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal F19 o con anticuerpo IgG1 de ratón en calidad de un testigo negativo. Los precipitados se hirvieron en un tampón de muestra y se separaron mediante electroforesis en gel con dodecilsulfato de sodio (según se

describe por Laemmli (1970) Nature 227(259), 680-685). El análisis fluorográfico del gel resultante confirmó que las células del clon 33 de HT1080 producen proteína PAF α . No era detectable proteína PAF α en extractos de las células HT1080 parenterales ni en inmunoprecipitados con IgG1 de ratón.

Ejemplo 4: PAF α recombinante soluble

Una forma recombinante soluble de la proteína PAF α se preparó como sigue. Un ADNc que codifica el dominio extracelular (DEC) de CD8 α murina (Genbank M12825), que consiste en los 189 aminoácidos N-terminales de CD8 α , se ligó a un ADNc que codifica el dominio extracelular de PAF α (aminoácidos 27 a 760) generando una construcción de proteínas de fusión, FAPmCD8, de estructura similar a la proteína de fusión del ligando CD8 α -CD40, tal como se describió previamente (Lane et al. (1993) J. Exp. Med. 177(4), 1209-1213). Los ADNcs se verificaron mediante secuenciación y se insertaron en el vector pVL1393. La transfección de células Sf9 y la amplificación del baculovirus recombinante resultante se efectuaron según se describe (O'Reilly (1994) Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford University Press, Nueva York). El sobrenadante del cultivo de células High Five infectado con baculovirus FAPmCD8 recombinante se recogió durante cuatro días y se aclaró por ultracentrifugación. La proteína de fusión FAPmCD8 se purificó a partir de sobrenadantes de este tipo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PAF α inmovilizado en perlas de agarosa activadas (Pierce Chemical, Indianapolis, IN, EE.UU.). El sobrenadante del cultivo se hizo pasar a través de la columna de afinidad de anticuerpos y se eluyó mediante desplazamiento del pH utilizando tampón citrato 0,1 M, pH 3. Las muestras se neutralizaron inmediatamente con una solución de Tris saturada (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) y las fracciones con contenido en proteína se agruparon.

Ejemplo 5: Medición de la escisión de conjugados de doxorru-

bicina-péptido

Las muestras se separaron mediante un ensayo cromatográfico en líquido de alta resolución (HPLC) de fase inversa que se estableció para medir la escisión de conjugados de doxorubicina-péptido. El sistema HPLC consistía en un automuestreador Waters 717 equipado con un bucle de 100 microlitros (μ l) y dos bombas Waters modelo 510 para suministrar disolventes. Las separaciones se efectuaron en condiciones isocráticas a un caudal de 0,7 ml/min en una columna Nucleosil C-18, 100 mm de longitud x 4 mm de D.I. con un tamaño de partícula de 5 μ m (Dr. Ing. H. Knauer GmbH, Berlín). La fase móvil consistía en metanol: agua (70:30, v/v) que contenía acetato de amonio 0,2 M ajustado a pH 3,2. Doxorubicina libre y conjugados de doxorubicina-péptido se detectaron mediante fluorescencia (excitación, 475 nm; emisión, 585 nm) utilizando un detector de fluorescencia Waters 474. La inyección, el suministro de disolvente, la adquisición de datos y el análisis de datos se efectuaron todos ellos utilizando el paquete de programa de cromatografía Millennium 2010 (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). Las sustancias a ensayar se disolvieron primeramente en dimetilsulfóxido a una concentración de 5 mM y subsiguientemente se diluyeron en solución acuosa antes de aplicarse a la columna de HPLC.

Se examinó la capacidad de enzima PAF α recombinante soluble de liberar doxorubicina a partir de conjugados de doxorubicina-péptido. Soluciones originales de conjugado de doxorubicina-péptido (5 mM) se diluyeron con solución salina tamponada con Hepes pH 7,4 hasta una concentración final de 50 a 100 μ M. Veinte μ l de la solución resultante se mezclaron con 50 μ l de la proteína de fusión FAPmCD8 purificada (aproximadamente 20 ng) descrita anteriormente y 30 μ l de solución salina tamponada con Hepes, pH 7,4. La mezcla se dejó incubar a 37°C durante 1 día y la liberación de doxorubicina libre se midió en el ensayo HPLC descrito. Las áreas bajo cada pico se identificaron utilizando el paquete de programas anterior y el valor inicial se estableció en 100%.

La tasa de liberación de doxorubicina libre se midió mediante la aparición de un pico con el mismo tiempo de retención que la doxorubicina libre bajo estas condiciones de HPLC. Las áreas bajo cada pico se utilizaron para calcular las cantidades relativas de doxorubicina libre con respecto a conjugado de doxorubicina-péptido. La integración de las áreas del pico para determinar el porcentaje de escisión se llevó a cabo utilizando el paquete de programas de cromatografía Millennium 2010 anterior. Tal como se observa en los cromatogramas para ZGP-Dox (N-Cbz-Gly-Pro-doxorubicina) mostrados en la figura 1, el conjugado de doxorubicina-péptido se podía convertir en doxorubicina libre después de la incubación con proteína de fusión FAPmCD8 purificada, pero el tiempo de retención del conjugado no se alteró mediante la incubación con tampón.

Ejemplo 6: Reducción de la citotoxicidad de doxorubicina por conjugación de péptidos escindibles con PAF α

Se determinó la capacidad de péptidos escindibles por PAF α para bloquear la acción citotóxica de doxorubicina en células PAF α -negativas y sensibles a doxorubicina. Células K562, disponibles de American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU. (número ATCC: CCL-243) se sembraron en placas de 96 pocillos (Greiner Scientific) a una densidad de 1000 células/pocillo. A las células se añadieron medios de cultivo de células exentos de suero que contenían diversas concentraciones de doxorubicina libre o concentraciones molares equivalentes de conjugados de doxorubicina-péptido. Cuatro días más tarde, se determinó el número de células utilizando un contador de células CASY[®] automatizado (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Alemania). Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo 7: Liberación de doxorubicina libre mediante PAF α unida a células

Se examinó la capacidad de la enzima PAF α unida a

47

células para liberar doxorubicina libre a partir de conjugados de doxorubicina-péptido. Cada conjugado se disolvió en un medio de cultivo de células exento de suero a una concentración final de 1 μ M. Diez mililitros de esta solución se añadieron a monocapas confluentes de células HT1080 o células del clon 33 de HT1080 en placas de cultivo de tejidos de 10 cm durante 19 horas a 37°C. Los medios se retiraron y la liberación de doxorubicina se midió como se describe en el Ejemplo 5. La línea de células que expresa PAF α , clon 33 de HT1080, convirtió 81% y 43% de los conjugados ZGP-Dox (N-Cbz-Gly-Pro-doxorubicina) y ZPAGP-Dox (N-Cbz-Pro-Ala-Gly-Pro-doxorubicina) en doxorubicina libre, respectivamente. La línea de células HT1080 parenteral convirtió sólo el 9% de ZGP-Dox en doxorubicina libre bajo las mismas condiciones. Bajo estas condiciones, se observó una pequeña conversión, o ninguna conversión detectable de ZPAGP-Dox en doxorubicina libre por parte de la línea de células HT1080 parenteral.

Ejemplo 8: Exterminio de células sensibles por parte de doxorubicina liberada por PAF α

Se determinó la capacidad de PAF α para generar doxorubicina libre capaz de exterminar células sensibles a doxorubicina. Células K562, disponibles de American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU. (número ATCC: CCL-243) se sembraron en placas de 96 pocillos (Greiner Scientific) a una densidad de 1000 células/pocillo. Medios de cultivo de células exentos de suero que contenían 1 μ M de conjugado de doxorubicina-péptido se añadieron a placas de células HT1080 o del clon 33 de HT1080 durante 19 horas a 37°C. Los medios se retiraron y la liberación de doxorubicina se confirmó como en el Ejemplo 5. A continuación, se añadieron a las células K562 sesenta y seis μ l de este medio por pocillo. Cuatro días más tarde, se determinó el número de células utilizando un contador de células CASY[®] automatizado. Los resultados se muestran en la figura 3.

Ejemplo 9: Estabilidad en plasma de conjugados de doxorubicina-péptido

La estabilidad en plasma de conjugados de doxorubicina-péptido se midió utilizando los métodos descritos en el
5 Ejemplo 5. Muestras que contenía conjugados de doxorubicina-péptido (a una concentración de 1 μ M) se incubaron en presencia de plasma de ratón o humano al 10% (v/v) durante los tiempos indicados a 37°C. En la figura 4 se muestran los resultados para ZGP-Dox y ZPAGP-Dox en plasma de ratón y
10 humano.

Ejemplo 10: Escisión catalizada por PAF α de conjugados de 4-metoxi- β -naftilamida-péptido

Para identificar sustratos de péptidos PAF α preferidos,
15 oligómeros constituidos por ácidos aminocarboxílicos naturales y/o no naturales se sintetizaron y acoplaron a prolina-4-metoxi- β -naftilamina (Pro-MNA) utilizando métodos conocidos en la técnica (E. Wünnch, Synthese von Peptiden, en Methoden der organischen Chemie, Houben-Weyl (comps. E. Müller, O.
20 Bayer), Vol. XV, Partes 1 y 2, editorial Georg Thieme, Stuttgart, 1974).

Síntesis de Pro-Pro-4-metoxi- β -naftilamida:

25 Boc-Pro (32 mg, 0,15 mmol), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (53 mg, 0,15 mmol) e hidrocloreuro de Pro-4-metoxi- β -naftilamida (46 mg, 0,15 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida anhidra/tetrahidrofurano 1:1 (4 ml). Se añadió N-etildiisopropilamina
30 (0,26 ml, 0,44 mmol) disueltos en N-metilpirrolidona (1,7 molar) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche.

El disolvente se separó con un evaporador rotatorio, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml) y se
35 extrajo 3 veces con agua. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se separó con un evaporador rotato-

44
rio. El residuo se disolvió en ácido trifluoroacético/diclorometano (1:4, 25 ml) y se dejó que reaccionara durante 1 hora. El disolvente se separó con un evaporador rotatorio y el aceite resultante se secó con una corriente de nitrógeno.

- 5 El producto bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa aplicando un gradiente de acetonitrilo/agua. El producto dio datos analíticos satisfactorios (RMN y espectro de masas).

A continuación, se midió la liberación de MNA libre a
10 partir de los péptidos en un fluorímetro Cytofluor (PerSeptive Biosystems, Inc.) utilizando el conjunto de filtros de 355 nm de excitación/405 nm de emisión. Se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima (valores K_m y k_{cat} de Michaelis-Menten) utilizando métodos conocidos en la técnica
15 (véase, por ejemplo, Yun, S.L. y Suelter, C. H. (1977). A simple method for calculating K_m and V from a single enzyme reaction progress curve. Biochim. Biophys. Acta 480(1), 1-13) con enzima PAF α derivada de extractos de membrana de las células transfectadas con 293-I/2 en el Ejemplo 2.

20

25

30

35

Tabla 1: Valores K_m y k_{cat} para la escisión catalizada por PAF α de conjugados de 4-metoxi- β -naftilamida (MNA)-péptidos seleccionados

Sustratos	K_M	K_{cat}	K_{cat}/K_M
	[μ M]	[s ⁻¹]	$\times 10^4$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
Chg-Pro-MNA	75	53.7	71.6
Hyn-Pro-MNA	69	27.4	39.7
Pro-Pro-MNA	154	49.5	32.1
Val-Pro-MNA	95	27.7	29.2
Met-Pro-MNA	127	27.9	22.0

5

Arg-Pro-MNA	278	50.6	18.2
trans-Hyp-Pro-MNA	254	37.9	14.9
Gln-Pro-MNA	273	40.5	14.8
Ala-Pro-MNA	267	35.7	13.4
Lys-Pro-MNA	530	57.1	10.8
Ile-Pro-MNA	43	12.6	8.8
Met(O)-Pro-MNA	378	26.9	7.1
Ser-Pro-MNA	872	28.3	3.3

Chg = ciclohexilglicina, Hyn = 6-hidroxinorleucina, trans-Hyp = trans-4-hidroxiprolina

10

Ejemplo 11: Especificidad de péptidos acoplados a MNA en

cuanto a PAF α frente a DPP-IV

Entre los miembros de la familia de serina-oligopeptidasa específicos de prolilo conocidos, la enzima más estrechamente relacionada con PAF α es DPP-IV. Dado que DPP-IV activa se encuentra en el plasma y en muchos tipos de células diferentes, es necesaria la optimización de la selectividad relativa (opcional) de compuestos peptídicos profármaco para PAF α en comparación con DPP-IV para reducir una conversión indeseable del profármaco en los sitios que no sea el tumor (por ejemplo en el plasma). Para identificar péptidos específicos en cuanto a PAF α , la escisión de péptidos acoplados a MNA por parte de PAF α se comparó con la capacidad de DPP-IV de escindir los mismos conjugados de péptidos. La liberación de MNA libre se midió según se describe en el Ejemplo 9. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Comparación de la selectividad de escisión de conjugados de MNA-péptido por parte de PAF α y DPP-IV

	Especificidad de escisión	
	PAF	DPP IV
Ala-Pro-MNA	+	+
Z-Gly-Pro-MNA	+	-
Z-Pro-Ala-Gly-Pro-MNA	+	-

+ indica que la enzima era capaz de escindir el sustrato
- indica carencia de escisión

Ejemplo 12: actividad de PAF α en muestras de tumores

Actividad enzimática de PAF α medida en muestras de tumores humanos. Placas ELISA (análisis con enzima unida a inmunosorbente) de noventa y seis pocillos (Costar, Corning,

NY) se revistieron durante una noche a 4°C con 1 µg/ml de anticuerpo F19 o anticuerpo testigo en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Los pocillos se aclararon a continuación con tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,1%, pH 7,4) y los sitios de unión en exceso se bloquearon con tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 5% en PBS, pH 7,4) durante 1 hora a la temperatura ambiente. La actividad de PAFα se midió en tejido tumoral (símbolos en negro) o tejido testigo normal apareado (correspondiente a símbolos en blanco) a partir de extractos de membrana enriquecidos con Concanavalina A (figura 5a). Las muestras de tumores incluían cáncer de pecho (▼, ■), de colon (●), colon metastasizado al hígado (◆) y de pulmón (▲, +). Los extractos se añadieron a placas revestidas con F19 y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se separó el material no unido, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado y se analizó la actividad de la enzima PAFα utilizando 100 µl de Ala-Pro-AFC según se describe (documento WO 97/34927) durante una hora a 37°C. Se midieron las primeras dos fracciones de Concanavalina A de cada extracto, y cada valor se representó individualmente. De cada valor se sustrajo la fluorescencia de fondo (medida utilizando placas testigos revestidas con anticuerpos).

La confirmación bioquímica independiente de la actividad enzimática de PAFα y su masa molecular aparente en extractos de tumores se obtuvieron marcando los extractos de tejido antes mencionados con fluorofosfato de diisopropilo marcado con ¹⁴C (DFP; NEN-DuPont, Colonia, Alemania). Se sabe que DFP se une covalente e irreversiblemente a serinas de sitio activo de muchas serina-proteasas, evitando con ello una catálisis ulterior (Hayashi, R., Bai, Y. y Hata, T. (1975). Further confirmation of carboxypeptidase Y as a metal-free enzyme having a reactive serine residue. J. Biochem. 77(6), 1313-1318; Wahlby, S. y Engstrom, L. (1968). Studies on Streptomyces griseus protease. II. The amino acid sequence around the reactive serine residue of DFP-sensitive compo-

nents with esterase activity. Biochim. Biophys. Acta 151(2), 402-408). En la figura 5b se muestra el marcaje con ^{14}C -DFP de PAF α inmunopurificada a partir de un tumor (T) correspondiente a una muestra de colon ● de la figura 5a. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (259), 680-685) and subsequent autoradiography (Park, J. E., Draper, R.K. y Brown, W. J. (1991). Biosynthesis of lysosomal enzymes in cells of the End3 complementation group conditionally defective in endosomal acidification. Somatic Cell Mol. Genet. 17(2), 137-150) de estas muestras reveló la presencia de una proteína de 95 kD marcada, presente en la muestra de cáncer de colon. No se observaron bandas radiomarcadas en el inmunoprecipitado (N) testigo apareado normal ni con el anticuerpo testigo. La masa molecular aparente de la proteína marcada con ^{14}C e inmunopurificada que se observa en la figura 5b concuerda con los informes previos para PAF α (Rettig, W.J., Su, S.L., Fortunato, S.R., Scanlan, M.J., Mohan Raj, B.K., Garin-Chesa, P., Healey, J.H. y Old, L.J. (1994). Fibroblast activation protein: Purification, epitope mapping and induction by growth factors. Int. J. Cancer 58(3), 385-392; documento WO 97/34927).

25 Ejemplo 13: Preparación de oligopéptidos protegidos

Oligopéptidos protegidos se prepararon en solución de acuerdo con los protocolos del estado de la técnica (por ejemplo, M. Bodanszky y A. Bodanszky, "The practice of Peptide Synthesis", 2ª edición, Springer, Nueva York, 1994) o mediante síntesis en fase sólida en un sintetizador de péptidos automatizado de Applied Biosystems modelo 430A. La desprotección y separación del oligopéptido a partir del soporte de resina se lograron mediante el tratamiento con mezclas de ácido trifluoroacético y, frecuentemente, utilizando aditivos de barrido. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida a alta presión preparativa

sobre columnas de sílice C18 de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso al 0,1%/acetonitrilo. La identidad y homogeneidad de los péptidos se confirmaron mediante cromatografía líquida a alta presión y análisis de espectro de masas. Los oligopéptidos que se prepararon por este método se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Oligopéptidos

Z-Gly-Pro-OH
Z-Pro-Ala-Gly-Pro-OH
Fmoc-Pro-Ala-Gly-Pro-OH
Fmoc-Chg-Pro-OH
Fmoc-Nle-Pro-OH
Fmoc-Hyn-Pro-OH

10

15

20

Fmoc-Pro-Pro-OH
Fmoc-Ser-Ala-Hyn-Pro-OH
Fmoc-Ser-Ala-Nle-Pro-OH
Fmoc-Ser-Ala-Chg-Pro-OH
Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH
Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH
Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH
Ser-Glu-Asn-Arg-Lys-Val-Pro-OH
Gly-Tyr-Ser-Arg-Met-Pro-OH
Gln-Gly-Tyr-Ser-Arg-Met-Pro-OH
Gly-Gly-Gly-Trp-Pro-OH
Asn-Arg-Lys-Val-Pro-OH
Glu-Asn-Arg-Lys-Val-Pro-OH
Ser-Glu-Asn-Arg-Lys-Val-Pro-OH
Ala-His-Met-His-Pro-OH
Tyr-Ala-Phe-His-Pro-OH
Ser-Tyr-Ala-Phe-His-Pro-OH
Leu-Asn-Leu-Tyr-Met-Pro-OH
Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH
Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH
Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Glu-Pro-OH

Z es benciloxicarbonilo

Fmoc es 9-fluorenilmetoxicarbonilo

Chg es L-ciclohexilglicilo

Nle es L-norleucinilo

5 Hyn es L-6-hidroxinorleucinilo

Ejemplo 14: Preparación de Fmoc-Pro-Ala-Gly-Pro-Dox

Fmoc-Pro-Ala-Gly-Pro-OH (44 mg, 0,078 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (10 ml) y el pH se ajustó a 7,5 mediante N,N-diisopropiletilamina. Se añadió N-hidroxisuccinimida (1M en DMF, 78 μ l, 0,078 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Bajo agitación, se añadió diciclohexilcarbodiimida (1M en DMF, 87 μ l, 0,087 mmol) y la solución se agitó a 0°C durante 1 h.

15 Doxorubicina * HCl (25 mg, 0,043 mmol) se disolvió en 20 ml de DMF anhidra y se añadió N,N-diisopropiletilamina (8,2 μ l, 0,048 mmol). Esta mezcla se introdujo a través de una jeringa en el péptido activado. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 48 h.

El disolvente se separó a continuación y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%.

25 HPLC analítica >90%; ES-MS 1110,5 (M+Na⁺); 674,4

Ejemplo 15: Preparación de H-Pro-Ala-Gly-Pro-Dox

Fmoc-PAGP-Dox (preparado en el ejemplo 14, 44 mg, 0,040 mmol) se disolvió en THF/dietilamina (2:1, 20 ml) a 0°C y se agitó durante 2 h. El disolvente se separó a continuación y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%.

HPLC analítica >90%; ES-MS 866,6 [M+H]⁺; 452,4

35

Ejemplo 16: Preparación de H-Chg-Pro-Dox

Fmoc-Chg-Pro-OH (44 mg, 0,096 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (10 ml) y el pH se ajustó a 7,5 mediante N,N-diisopropiletilamina. Se añadió N-hidroxisuccinimida (1M en DMF, 96 µl, 0,096 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Bajo agitación, se añadió diciclohexilcarbodiimida (1M en DMF, 107 µl, 0,107 mmol) y la solución se agitó a 0°C durante 1 h.

Doxorrubicina * HCl (31 mg, 0,053 mmol) se disolvió en 20 ml de DMF anhidra y se añadió N,N-diisopropiletilamina (10 µl, 0,059 mmol). Esta mezcla se introdujo a través de una jeringa en el péptido activado. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 48 h.

El disolvente se separó a continuación y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%.

El producto liofilizado se disolvió en THF/dietilamina (2:1, 20 ml) a 0°C y se agitó durante 2 h. El disolvente se eliminó y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%.

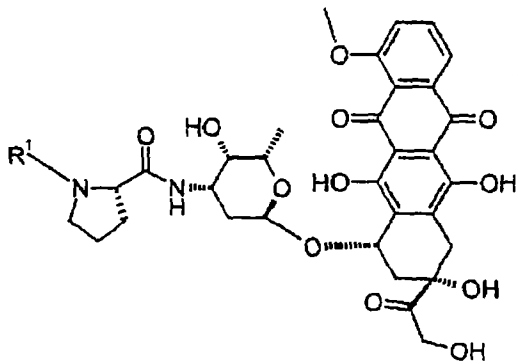
HPLC analítica >90%; ES-MS 780,2 (M+H⁺); 366,4

La siguiente tabla muestra los conjugados de péptido-doxorrubicina que han sido preparados análogamente e incluye los datos de escisión por parte de PAF (después de 20 h).

30

35

Tabla 4



5

10

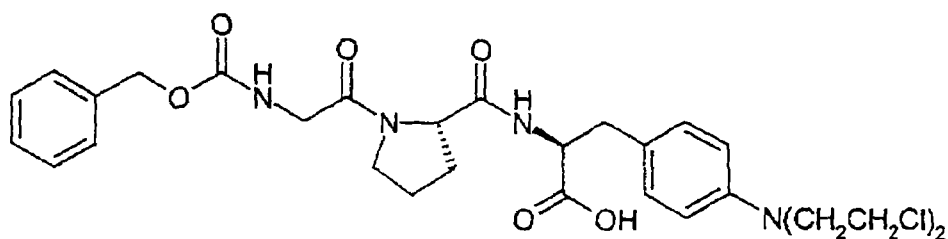
15

20

R ¹	Escisión por PAF
Z-Gly-	> 95%
Z-Pro-Ala-Gly-	> 95%
Fmoc-Pro-Ala-Gly-	> 95%
H-Pro-Ala-Gly-	ca. 11%
H-Chg-	> 95%
H-Nle-	> 95%
H-Hyn-	> 95%

Z es benciloxycarbonilo
Fmoc es 9-fluorenilmtoxycarbonilo
Chg es L-ciclohexilglicilo
Nle es L-norleucinilo
Hyn es L-6-hidroxinorleucinilo

Ejemplo 17: Preparación de N-Cbz-Gly-Pro-melfalan



N-Cbz-Gly-Pro-OH (22 mg, 0,072 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida anhidra (8 ml) y el pH se ajustó a 7,5 mediante N,N-diisopropiletilamina. Se añadió N-hidroxisuccinimida (1M en DMF, 72 μ l, 0,072 mmol) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Bajo agitación, se añadió diciclohexilcarbodiimida (1M en DMF, 67 μ l, 0,67 mmol) y la solución se agitó a 0°C durante 2 h.

Melfalan (14,7 mg, 0,048 mmol) se disolvió en 30 ml de DMF anhidra y se añadió N,N-diisopropiletilamina (12,3 μ l, 0,072 mmol). Esta mezcla se introdujo a través de una jeringa en el péptido activado. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h.

El disolvente se separó a continuación y el producto se purificó por RP-HPLC preparativa sobre C18 utilizando un gradiente de agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1%.

Datos analíticos: HPLC >90%; ES-MS 593,0 [(M+H)⁺].

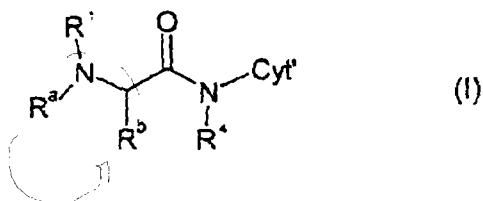
20

25

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I)

5



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 representa un grupo aminoalcanoílo u oligopeptidoílo, cuya función amino N-terminal puede estar fijada a un grupo de protección terminal;

15 R^a y R^b , junto con el grupo N-C interyacente, forman un anillo heterocíclico de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido y opcionalmente condensado con benzo o ciclohexano, en el que uno o dos grupos CH_2 también pueden ser reemplazados por NH, O o S,

20 R^4 representa H, alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , arilo o heteroarilo; y

Cyt' representa el residuo de un compuesto citotóxico o citostático; con la condición de que estén excluidos,

25 N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutaminil-L-seril-
-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-
-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dio-
xo-1-naftacenil]-.alfa.-L-lixo-hexopiranos-3-il]-L-pro-
linamida; y

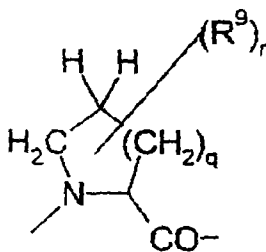
30 N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutaminil-L-seril-
-L-seril-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-
-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-me-
toxi-6,11-dioxo-1-naftacenil]-.alfa.-L-lixo-hexopiranos-
-3-il]-L-prolinamida.

2.- Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la
35 reivindicación 1, en donde

R^1 representa un residuo de fórmula Cg-A, Cg-B-A o

Cg-(D)_m-B-A, en que

- Cg representa un átomo de hidrógeno o un grupo de protección terminal, seleccionado del grupo que consiste en R⁵-CO-, R⁵-O-CO-, R⁵-NH-CO-, R⁵-SO₂- o R⁵-, en donde R⁵ es un grupo alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, arilo, aralquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;
- A, B y D, cada uno independientemente, representan restos derivados de ácidos aminocarboxílicos de la fórmula -[NR⁶-(X)_p-CO]-, en donde X representa CR⁷R⁸ y en donde R⁶, R⁷ y R⁸, cada uno independientemente, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido, y p es 1, 2, 3, 4, 5; o
- A, B y D, cada uno independientemente, representa restos derivados de ácidos aminocarboxílicos cíclicos de fórmula



- en donde
- R⁹ representa alquilo C₁-C₆, OH o NH₂,
- m es un número entero de 1 a 10;
- q es 0, 1 ó 2; y
- r es 0, 1 ó 2.

- 3.- Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el anillo heterocíclico formado por R^a, R^b y el N-C interyacente están sustituidos con R² y R³, en donde R² y R³, cada uno independientemente, representan un átomo de hidrógeno o halógeno o un grupo alquilo C₁-C₆, alquil C₁-C₆-amino, dialquil C₁-C₆-amino, alcoxi C₁-C₆, tiol, alquil C₁-C₆-tio, oxo, imino, fomilo, alcoxi C₁-C₆-carbonilo, amino-

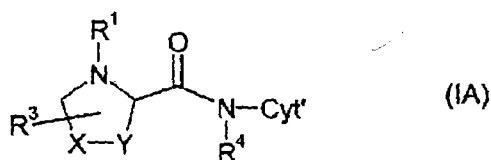
- 61 -

carbonilo, cicloalquilo C₃-C₆, arilo o heteroarilo.

4.- Un compuesto de fórmula IA

Foro de la

5

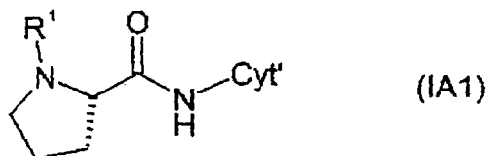


en donde R², R³, R⁴, Cyt' son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

R¹ representa un grupo aminoalcanoílo u oligopeptidoílo, y X-Y representa CHR²-CH₃, CR²=CH, NH-CH₂, CH₂-NH, -CR²-, CH₂-CHR²-CH₂; con la condición de que R¹ represente un grupo aminoalcanoílo, di- o tri-peptidoílo, o R¹ represente un oligopeptidoílo que tiene más de tres restos aminoácido que no contiene una secuencia de aminoácidos Gln-Ser, en el caso de que X-Y represente un grupo CH₂-CH₂.

5.- Un compuesto seleccionado de fórmula IA1

20

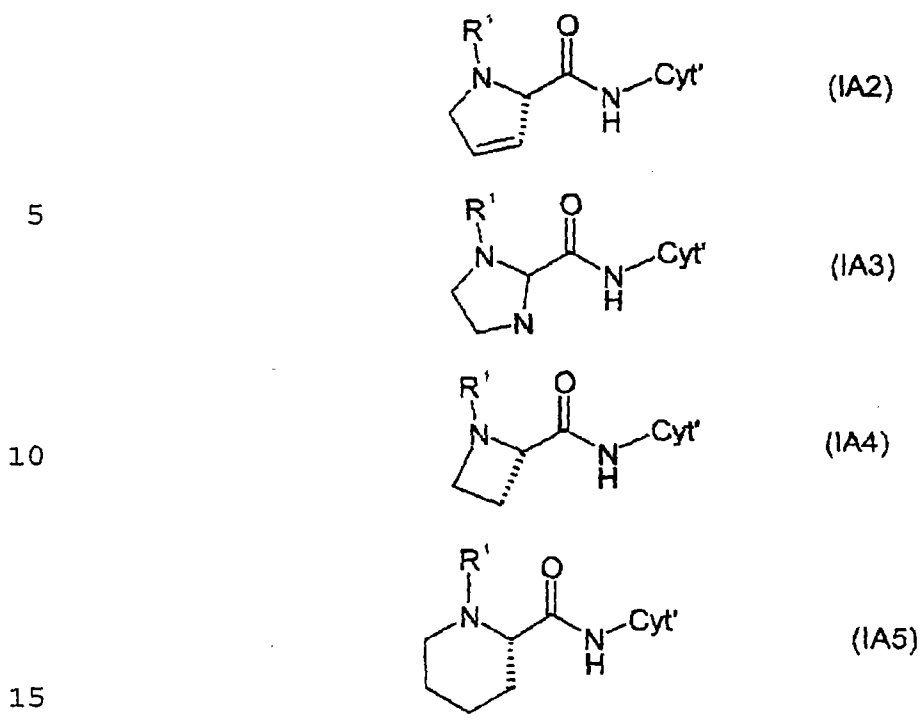


en donde R¹ representa un grupo aminoalcanoílo, di- o tri-peptidoílo y Cyt' es como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

6.- Un compuesto seleccionado de las fórmulas IA2, IA3, IA4 y IA5

30

35



en donde R¹ y Cyt' se definen en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R¹ representa un grupo aminoalcanoílo o un grupo oligopeptidoílo, que se derivan de glicina (Gly), o las formas D o L de alanina (Ala)², valina (Val)³, leucina (Leu)⁴, isoleucina (Ile)⁵, fenilalanina (Phe)⁶, tirosina (Tyr)⁷, triptófano (Trp)⁸, cisteína (Cys)⁹, metionina (Met)¹⁰, serina (Ser)¹¹, treonina (Thr)¹², lisina (Lys)¹³, arginina (Arg)¹⁴, histidina (His)¹⁵, ácido aspártico (Asp)¹⁶, ácido glutámico (Glu)¹⁷, asparagina (Asn)¹⁸, glutamina (Gln)¹⁹, prolina (Pro)²⁰, trans-4-hidroxi-prolina (Hyp)²¹, 5-hidroxi-lisina (Hyl)²², norleucina (Nle)²³, 5-hidroxinorleucina (Hyn)²⁴, 6-hidroxinorleucina, ornitina o ciclohexilglicina (Chg), con la condición de que estén excluidos grupos oligopeptidoílo con más de tres unidades aminoácido, en donde un grupo Gln está directamente enlazado a un grupo Ser.

8.- Un compuesto de fórmula I de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la unidad A se deriva de L-prolina, glicina, L-norleucina, L-ciclohexilgli-

cina, L-5-hidroxinorleucina, L-6-hidroxinorleucina, L-6-hidroxilisina, L-arginina o L-lisina.

9.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde R¹ es un grupo
5 seleccionado de las fórmulas (1) a (34):

I		II		I	
H-Chg	(1)	H-Tle	(18)		
H-Lys	(2)	H-Hyl	(19)		
H-Nle	(3)	H-Hse	(20) ?		
H-Ala	(4)	Cg-Gly	(21)		
H-Hyn	(5)	Cg-Nle			
		(22)			
H-Pro	(6)	Cg-Val			
		(23)			
H-Phg	(7)	Cg-Met	(24)		
H-Gln	(8)	H-Xxx-Lys	(25)		
H-trans-Hyp	(9)	H-Xxx-Hyn	(26)		
H-Val	(10)	H-Xxx-Pro	(27)		
H-Cha ?	(11)	H-Xxx-His	(28)		
H-Met	(12)	H-Xxx-Met	(29)		

10

15

H-Nva	(13)	H-Xxx-Ala	(30)
H-Met(O)	(14)	Cg-Xxx-Hyn	(31)
H-β-Cpa	(15)	Cg-Xxx-Ala-Gly	(32)
H-Ile	(16)	Cg-(Xxx) _m -Xxx-Ala-Gly	(33)
H-Ser	(17)	Cg-(Xaa) _m -Xaa-Gly	(34)

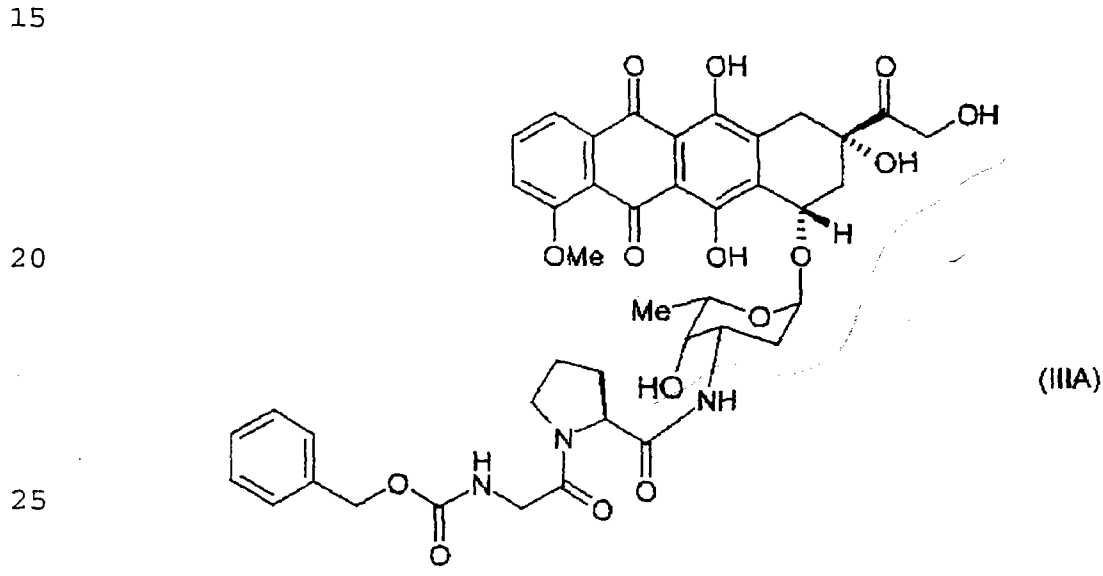
en donde

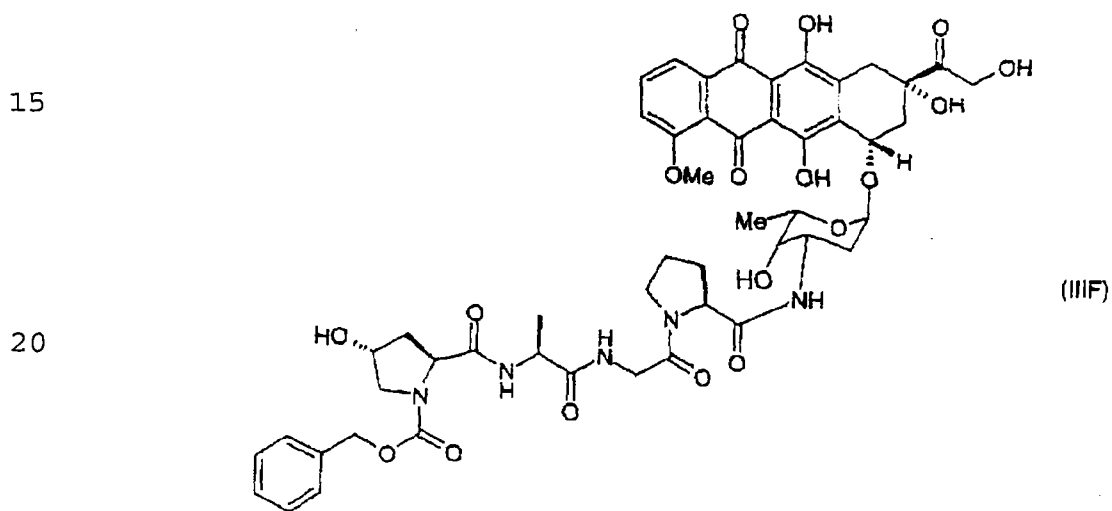
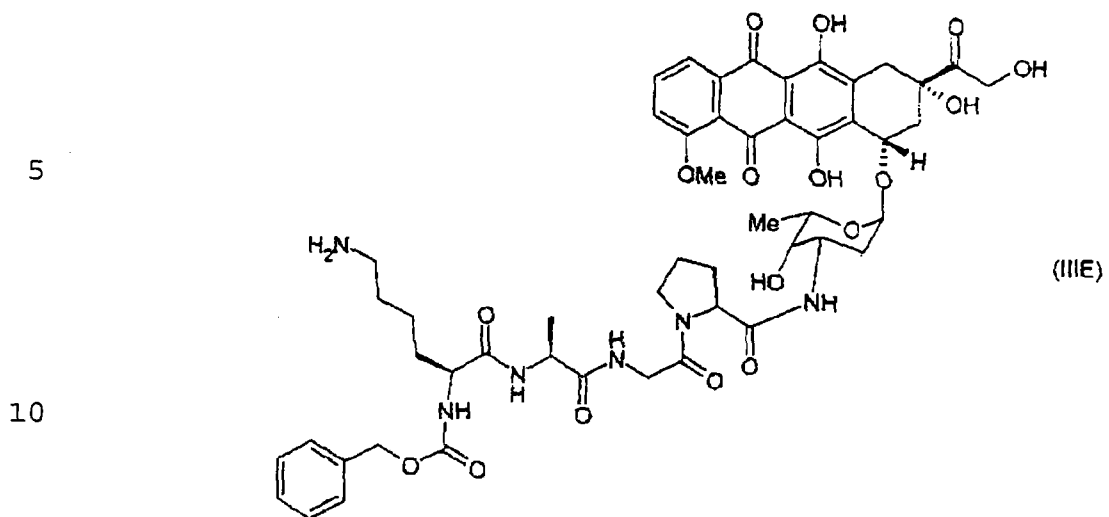
Cg representa un átomo de hidrógeno o un grupo de protección terminal seleccionado de benzoiloxicarbonilo, fenilacetilo, fenilmetilsulfonilo y bencilaminocarbonilo; Xaa representa un resto derivado de un ácido aminocarboxílico; y m es un número entero de 1 a 6.

10.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los restos ácido aminoalcanoico existen en la configuración (L).

11.- Un compuesto de un cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde H₂N-Cyt' es un derivado de antraciclina.

12.- Un compuesto de la reivindicación 11, seleccionado de las fórmulas (IIIA) a (IIIF):





25

13.- Un profármaco que es capaz de ser convertido en un fármaco mediante la acción catalítica de PAF α , teniendo dicho profármaco un sitio de escisión que es reconocido por PAF α , y siendo dicho fármaco citotóxico o citostático en condiciones fisiológicas.

14.- El profármaco de la reivindicación 13, que comprende una parte oligómera que comprende hasta 13 residuos aminocarboxílicos y una parte citotóxica o citostática, en donde el residuo aminocarboxílico C-terminal de la parte oligómera es un aminoácido cíclico de 3 a 7 miembros opcio-

nalmente sustituido y opcionalmente condensado con benzo o ciclohexano, y la función carboxi C-terminal está enlazada a la parte citotóxica o citostática mediante un enlace amida.

15.- El profármaco de la reivindicación 14, en donde el
5 residuo aminocarboxílico C-terminal se selecciona de D-prolina, L-prolina, D-hidroxiprolina y L-hidroxiprolina.

16.- El profármaco de la reivindicación 15, en donde la parte oligómera comprende dos, tres o cuatro residuos ácido aminocarboxílico.

10 17.- El profármaco de la reivindicación 14, 15 ó 16, en donde la función amino N-terminal está protegida por un grupo de protección terminal.

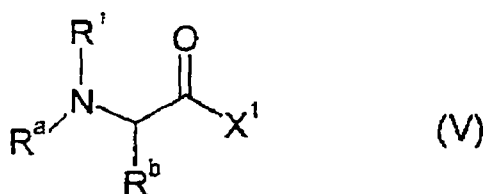
→ 18.- Un compuesto de una cualquiera de las reivindica-
ciones precedentes para uso médico. ✓

15 19.- Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 20.- Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.

21.- Un procedimiento para la producción de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (V)

25



30

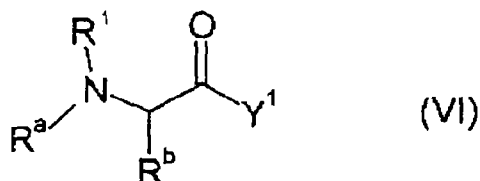
en donde R^1 , R^a y R^b son como se definen en la reivindicación 1, X^1 representa OH o un grupo lábil² que es adecuado para ser sustituido con un grupo amino,

35 se hace reaccionar con un compuesto $\text{HN}(\text{R}^1) - \text{Cyt}'$, en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático,

y R⁴ es como se define en la reivindicación 1.

22.- Un procedimiento para la producción de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (VI)

5



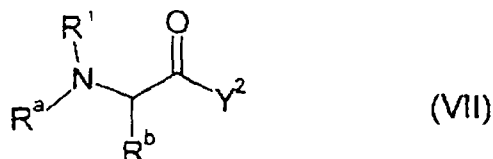
10

en donde R¹, R^a y R^b son como se definen en la reivindicación 1, Y¹ representa L-COX², en donde L es un residuo de enlazador, y X² representa OH o un grupo lábil que es adecuado para ser sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxilo, se hace reaccionar con un compuesto H₂N-Cyt' o con un compuesto HO-Cyt', en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático.

15

23.- Procedimiento para la producción de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque un compuesto de la fórmula general (VII)

20



25

en donde R¹, R^a y R^b son como se definen en la reivindicación 1, Y² es de la fórmula L-OH o L-NH₂, en donde L es un residuo de enlazador,

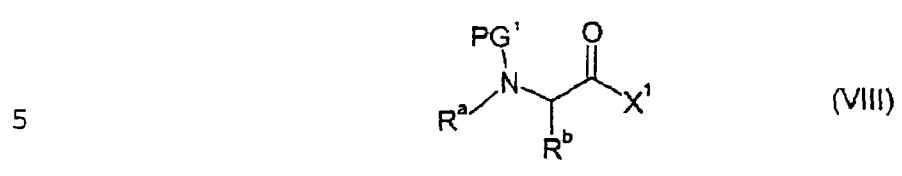
30

se hace reaccionar con un compuesto X³OC-Cyt', en donde X³ puede ser OH o un grupo lábil que es adecuado para ser sustituido con un grupo amino o un grupo hidroxilo, y en donde Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático.

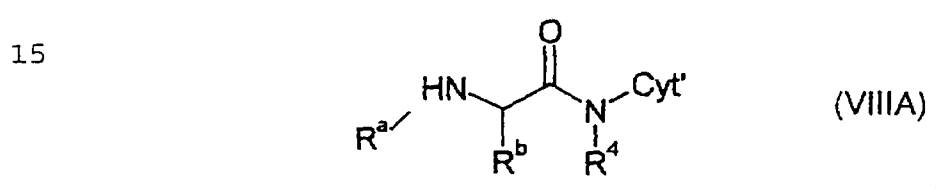
35

24.- Procedimiento para la producción de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado

porque un compuesto de la fórmula general (VIII)



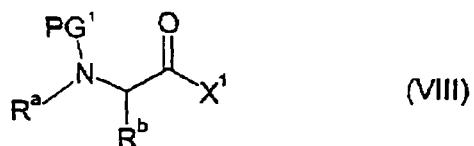
en donde PG¹ es un grupo protector y los otros sustituyentes
10 tienen el significado según se describe anteriormente,
se hace reaccionar con un compuesto HN(R⁴)-Cyt', en donde
Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático;
a continuación, el grupo protector PG¹ se separa y el
compuesto resultante de fórmula (VIII A)



se hace reaccionar subsiguientemente con un compuesto PG²-A-
20 -X⁴, en donde
PG² es un grupo protector y X⁴ representa OH o un grupo lábil
adecuado para ser sustituido con un grupo amino;
y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son
necesarias, hasta que se obtenga el compuesto completo.

25 25.- Procedimiento para la producción de un compuesto de
una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado
porque un compuesto de fórmula PG³-N(R⁴)-L-COX³, en donde
PG³ es un grupo protector y los otros sustituyentes tienen el
significado según se describe anteriormente,

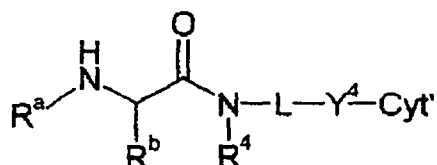
30 se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula Y⁴-Cyt', en
donde
Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático;
e Y⁴ representa H₂N o HO;
a continuación se separa el grupo protector PG³; y el com-
35 puesto HN(R⁴)-L-Y⁴-Cyt' resultante se hace reaccionar con un
compuesto de la fórmula (VIII)



5

a continuación se separa el grupo protector PG^1 y el compuesto resultante de fórmula

10



15

se hace reaccionar a continuación con un compuesto $\text{PG}^4\text{-A-X}^4$, en donde

PG^4 es un grupo de protección, y X^4 puede ser OH, o un grupo lábil adecuado para ser sustituido con un grupo amino; y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son necesarias, hasta que se obtenga la molécula completa.

20

26.- Procedimiento para la producción de un compuesto de fórmula (I), caracterizado porque un compuesto de fórmula $\text{PG}^5\text{-N(R}^4\text{)-L-Y}^5$, en donde

PG^5 representa un grupo protector, Y^5 representa OH o NH_2 , y los sustituyentes tienen el significado según se describe anteriormente,

25

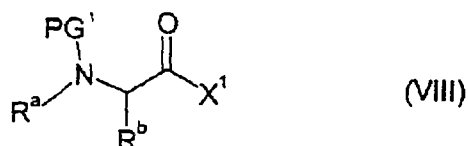
se hace reaccionar con un compuesto de fórmula $\text{X}^5\text{OC-Cyt}'$, en donde

Cyt' es el residuo de un compuesto citotóxico o citostático, y X^5 es OH o un grupo lábil adecuado;

30

a continuación se separa el grupo protector PG^5 ; y el compuesto $\text{HN(R}^4\text{)-L-Y}^5\text{-CO-Cyt}'$ resultante se hace reaccionar con un compuesto de la fórmula (VIII)

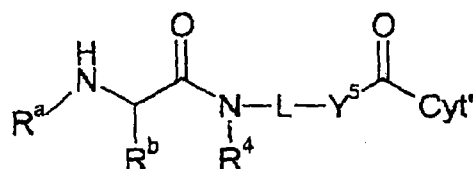
35



5

a continuación se separa el grupo protector y el compuesto resultante

10



15

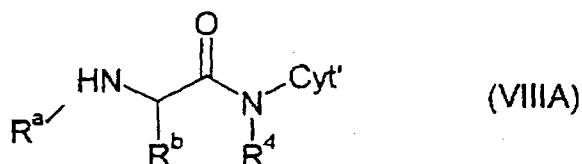
se hace reaccionar a continuación con un compuesto $\text{PG}^2\text{-A-X}^4$, en donde

PG^2 es un grupo protector, y X^4 representa OH, o un grupo lábil adecuado para ser sustituido con un grupo amino; y se llevan a cabo etapas de acoplamiento adicionales, si son necesarias, hasta que se obtenga la molécula completa.

20

— 27.- Un compuesto de fórmula VIIIA —

25



en donde R^a , R^b , R^4 y Cyt^1 son como se definen en la reivindicación 1.

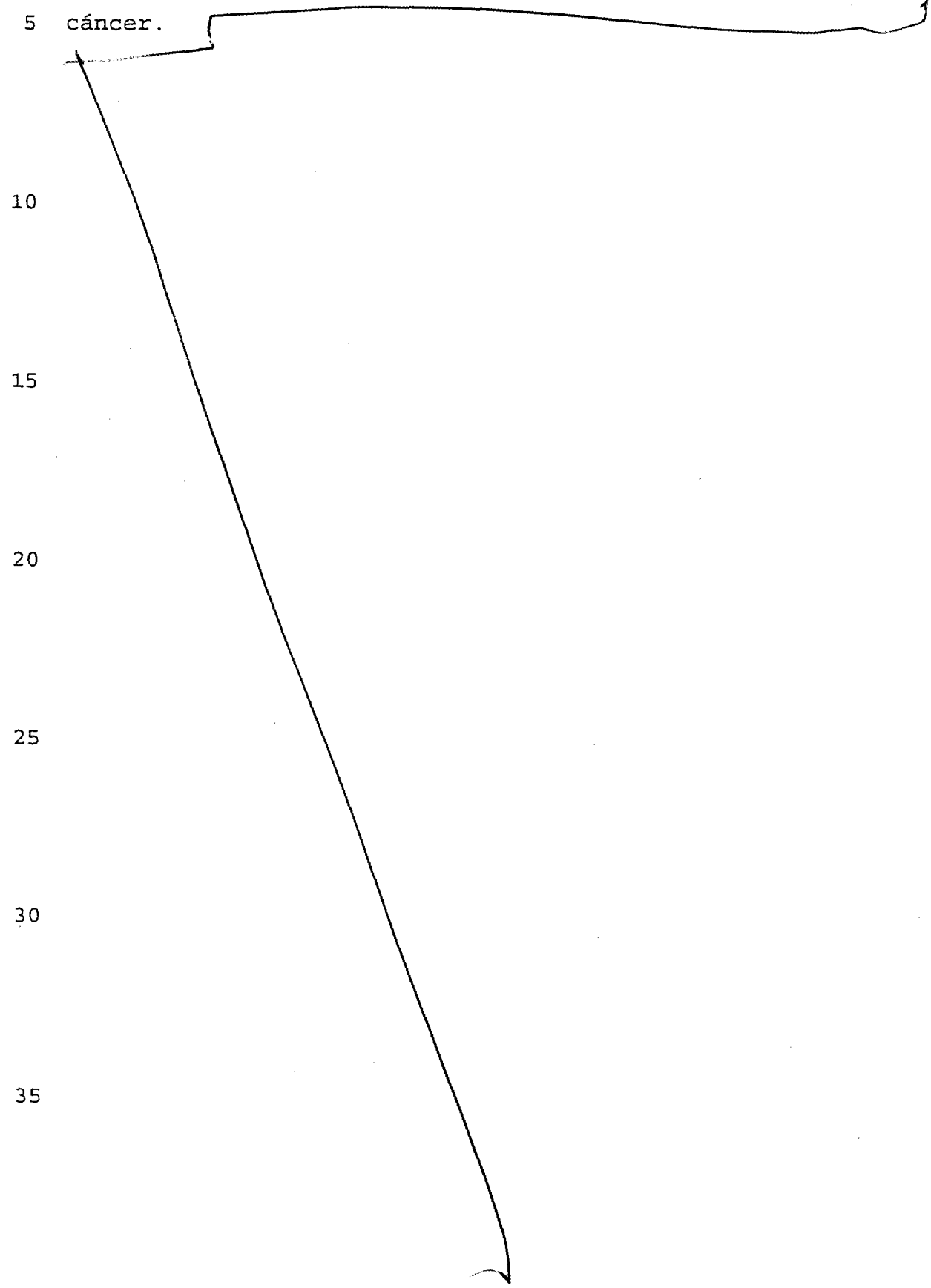
30

6/ 28.- Método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 a un paciente.

35

1/ 29.- Método para el tratamiento del cáncer, en donde un profármaco se administra a un paciente, en donde dicho profármaco es capaz de ser convertido en un fármaco citotóxico o citostático por una actividad enzimática, siendo dicha actividad enzimática la actividad de $\text{PAF}\alpha$.

30.- Uso de un profármaco capaz de ser convertido en un fármaco citotóxico o citostático por una actividad enzimática, siendo dicha actividad enzimática la actividad de PAF α , para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del



Resumen

La invención se refiere a un profármaco que es capaz de
5 ser convertido en un fármaco por la acción catalítica de
proteína de activación de fibroblastos humana (PAF α),
teniendo dicho profármaco un sitio de escisión que es
reconocido por PAF α , y siendo dicho fármaco citotóxico o
citostático en condiciones fisiológicas.

10

15

20

25

30

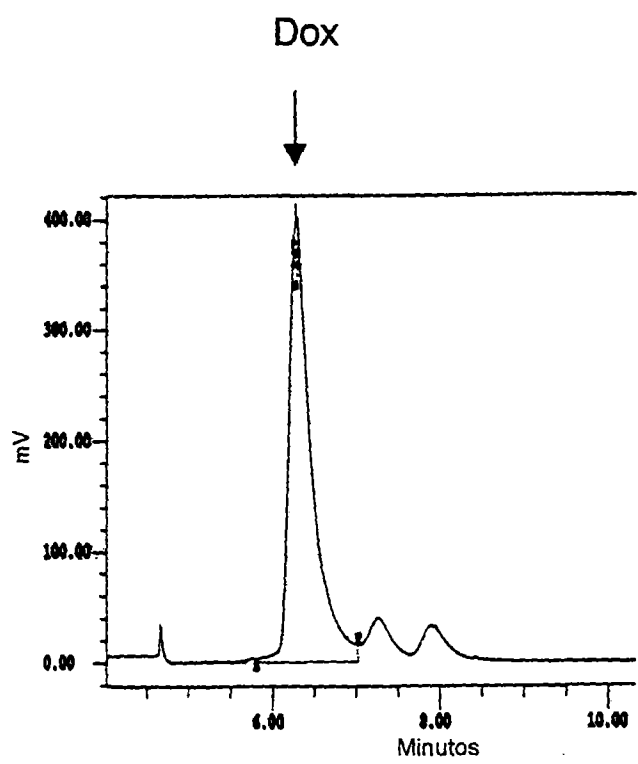
35

7X

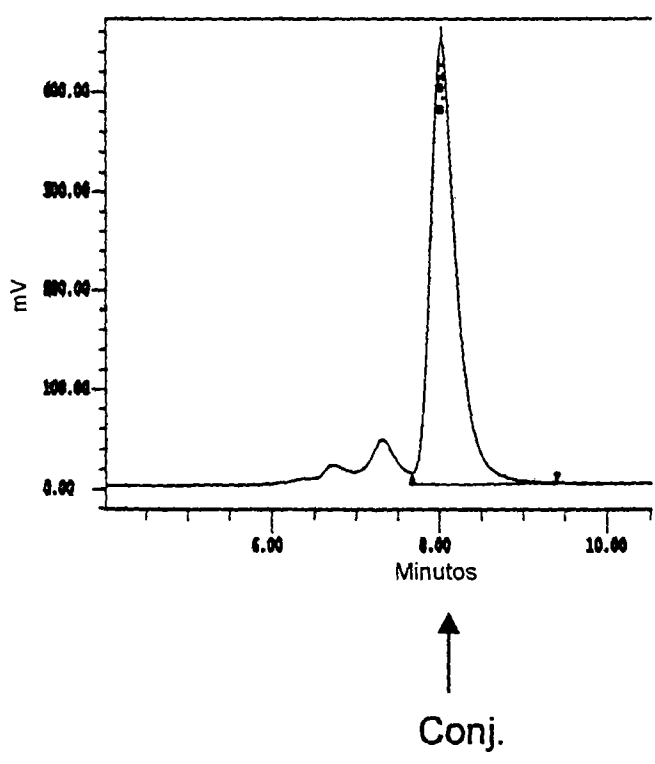
1/5

Figura 1

Z-Gly-Pro-Dox
+ CD8FAP



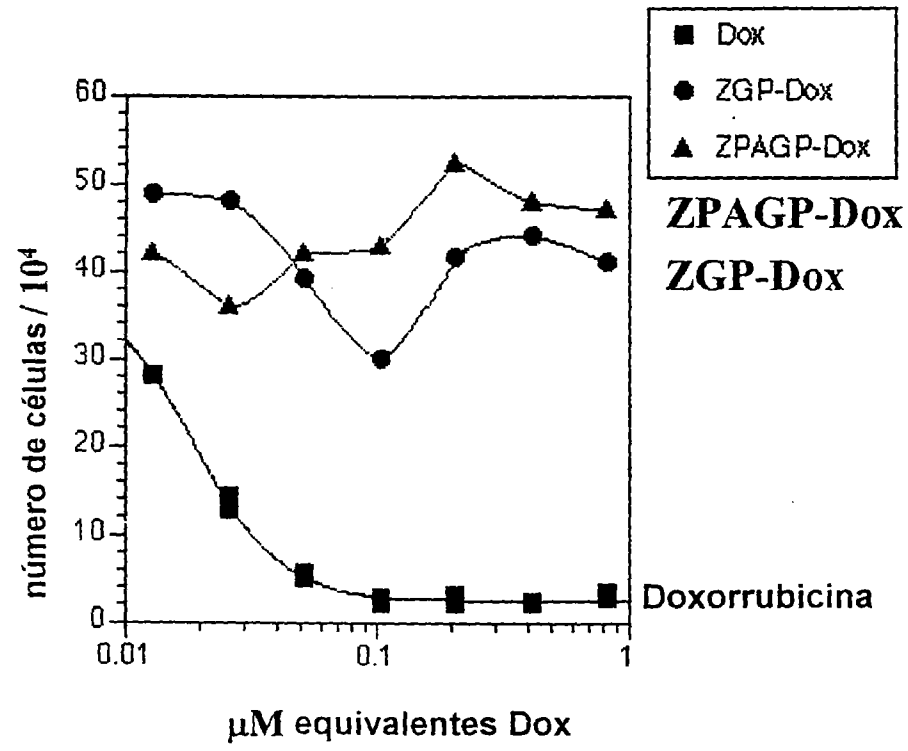
Z-Gly-Pro-Dox
+ tampón



75

2/5

Figura 2



3/5

Figura 3

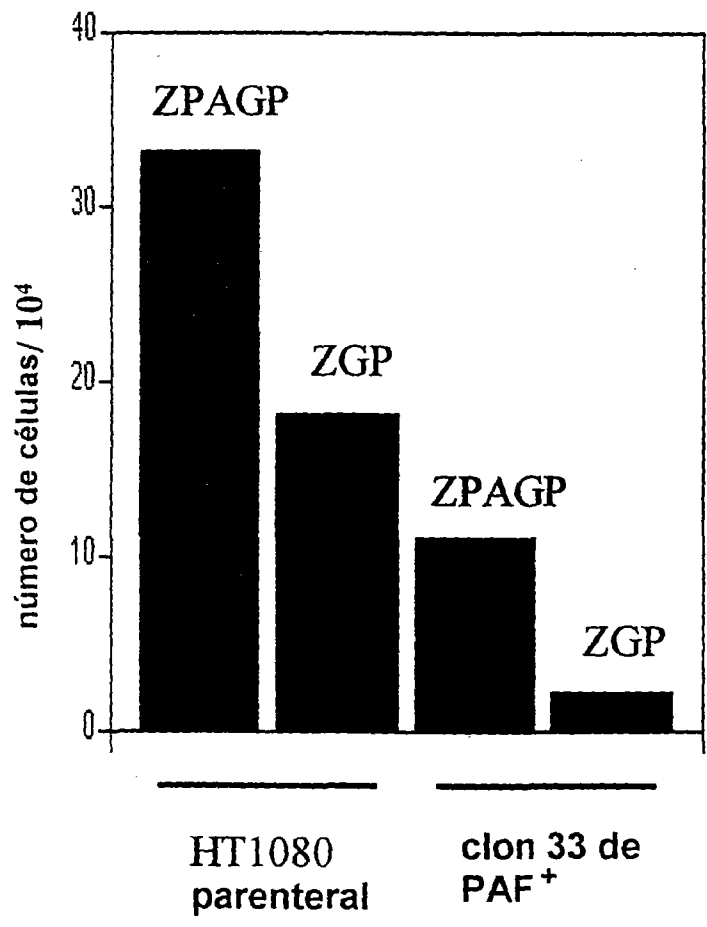
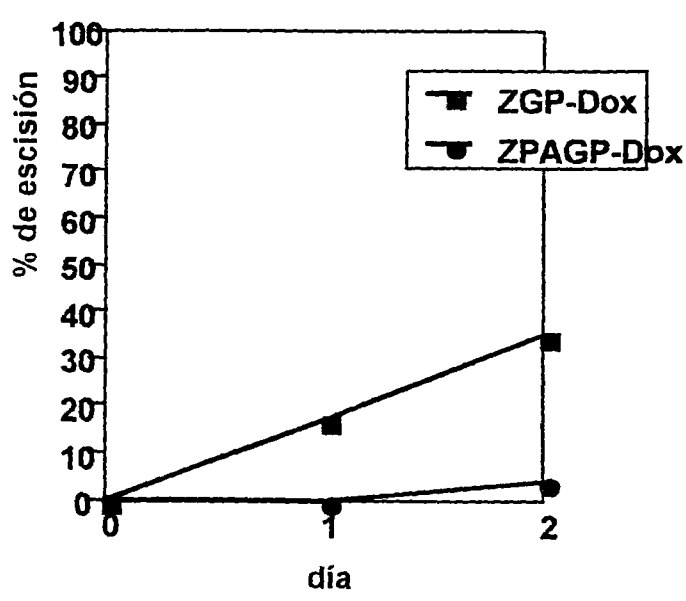


Figura 4

plasma humano



plasma de ratón

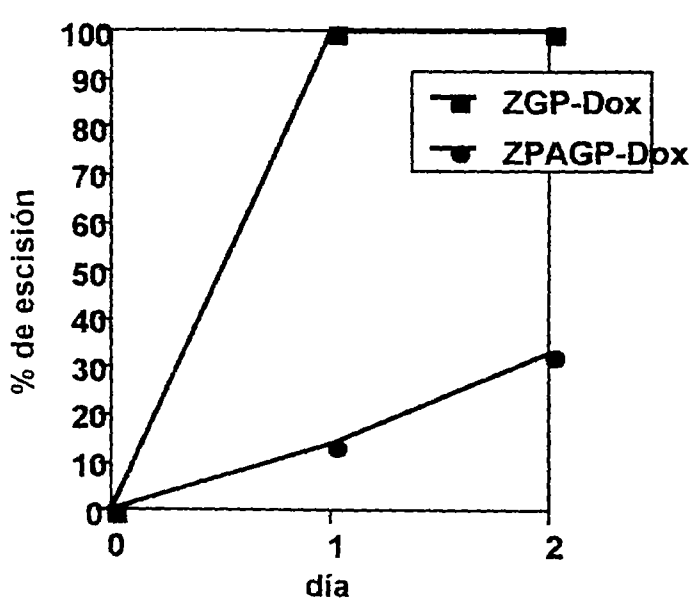
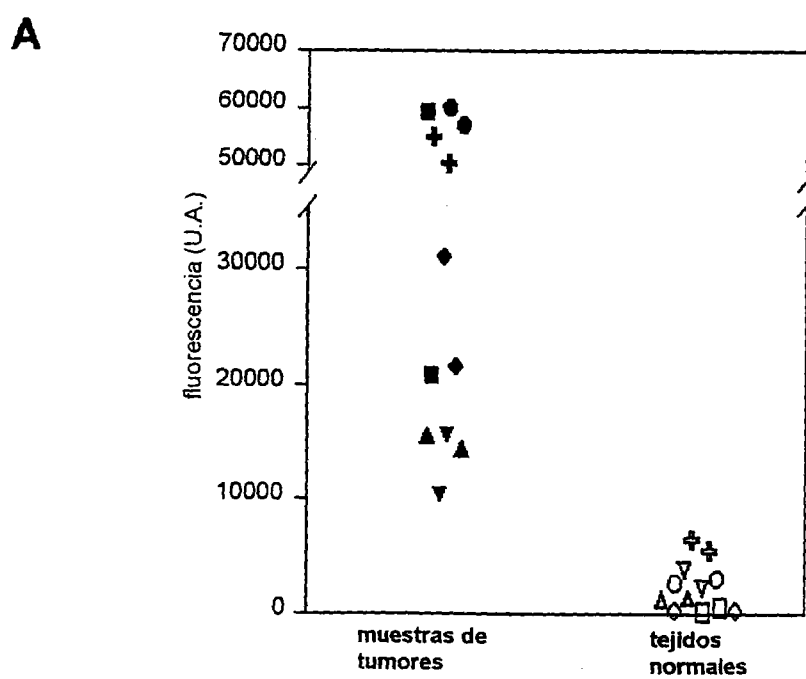


Figura 5





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Fürstenberger Str. 223, 60323 Frankfurt am Main, R.F.A.
Teléfono: 49-69-5963050 * Fax: 49-69-5962080

10903
00569
79
0276

LA SUSCRITA CONSUL GENERAL DE COLOMBIA EN FRANKFURT AM MAIN

CERTIFICA

Que el señor Dr. Hanns Paul Tüttenberg ejercía las funciones de Representante del Presidente del Tribunal Regional en Mainz en la fecha indicada y su firma corresponde a la registrada en esta Oficina Consular.

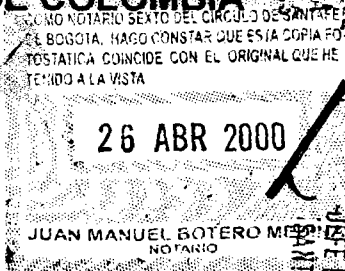
Que la empresa Boehringer Ingelheim Pharma KG; es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República Federal de Alemania y cumple su objeto conforme a las mismas.

Que los señores Dr. Dieter Laudien y Dr. Heinz Gerd Kläs, quienes en su calidad de apoderados, y cuya firma fue autenticada ante el Notario señor Alfred Fuchs, son sus representantes legales en este país.

Frankfurt am Main, Abril 30, 1998

Teresita Garcia Romero
TERESITA GARCIA ROMERO
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA

Derechos cancelados:
Impuesto de Timbre: US\$ 6.00
Fondo Rotatorio: US\$ 100.00



LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Luz Arriaga de Herber
Resolución No.599 Minjusticia

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
141058
141058
98 MAY 11 AM 11:32
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
NO SE ASUME
Jefe de Legalizaciones
SANTA FE DE BOGOTÁ D.C.

CONSISTE
• TRA

EXTERIORES
MINISTERIO DE DEFENSA

141028

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOGRÁFICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

26 ABR 2000

JUAN MANUEL ESTERO MEHINE
NOTARIO

REPRODUCCION DEL TEXTO
NO SE VERIFICA

23 MAR 19 11:35

RECEPCIONADO



111035-Co

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen und Embleme. 80

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

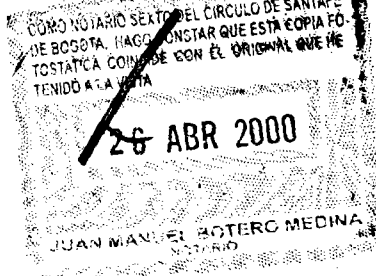
Boehringer Ingelheim Pharma KG
wohnhaft in / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein
Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal, en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unseren) Prozeßbevollmächtigten (Germán CAVELIER zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER oder aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmustern, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Gemüsearten und



Weiter →

acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, den freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen Unlauterem Wettbewerb, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen Konzessionen von Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf- und verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtlichen Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy February 25th, 1998

in/en Ingelheim am Rhein

Boehringer Ingelheim Pharma KG

ppa.

ppa.

Unterschrift

Firma

Dr. Laudien

Dr. Kläs

LEGALIZACION

BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.

UR.Nr.

449: 26-ABR 2000

Vorstehende, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

JUAN MANUEL BOYERO MEDINA
NOTARIO

1. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl. Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,
2. Herrn Dr. Heinz Gerd K l ä s, Dipl. Chemiker, wohnhaft in 55599 Gau Bickelheim, Ludwig-Jahn-Str.16,

mir bekannt,

beglaubige ich hiermit.

Ingelheim am Rhein, den 25. Februar 1998/hö



N o t a r

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

910 E 1

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des
Notars Alfred Fuchs in Ingelheim am Rhein
und die Echtheit des beigedrückten Dienst-
stempels werden hierdurch bestätigt.
Zugleich wird bescheinigt, daß der Vor-
genannte zur Vornahme der Amtshandlung
gesetzlich befugt war.

Mainz, den sechsten März
neunzehnhundertachtundneunzig
Der Präsident des Landgerichts

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)



den
zen
erb
heit
ung
von
und
hen
acht
ben
zen
ten
zu
die
zu

Kostenberechnung:
Gebühr für Legalisa-
tion
(Wert: DM 7.000,-)
JVKostO. v. 26.7.1967
BGBI. I S. 861
DM
Mainz, den 6. MRZ. 1998

[Signature]
Amtsinspektor

ung
sie
die
eck
den

COMO NOTARIO SEKTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FO-
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA
26 ABR 2000
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

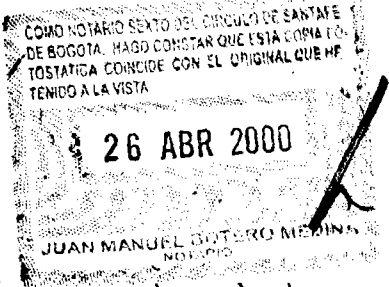
TRADUCCION OFICIAL No. 6543

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente

(A continuación de un documento escrito en español y alemán, por medio del cual los señores Dr. Dieter Ludien y Dr. Heinz Gerd Kläs, obrando en nombre de la firma Boehringer Ingelheim Pharma KG, domiciliada en Ingelheim am Rhein, Alemania, nombran como representantes y otorgan poder a favor de GERMAN CAVELIER, tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa 831, EMILIO FERRERO, tpa 31929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciliados en la Carrera 4° No. 72-35, Bogotá:)

Dado y firmado el 25 de febrero de 1998 en Ingelheim am Rhein, RFA.

Protocolo notarial No. 891/98



Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puesta ante mí por los señores

- 1. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Químico
domiciliado en 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

LUZ APARICA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
[Signature]
Resolución No.599 Minjusticia

2. Dr. Heinz Gerd Kläs,~, Dipl. Químico

domiciliado en 55599 Gau Bickelheim,

Ludwig-Jahn-Str. 16

a quienes conozco en persona.

Ingelheim am Rhein, 25 de febrero de 1998/jö

Fdo.: firma ilegible

Notario

(sello redondo en tinta:)

Alfred Fuche - Notario de Ingelheim am Rhein

Costas

Derechos de legalización

Valor: DM 5.000)

JVKosto de 26.7.1967

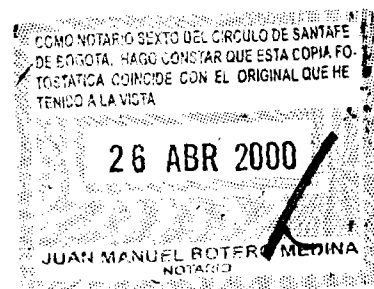
BGBI. I Pag. 861

DM 20,-

Mainz, 8 de marzo de 1998

Fdo.: firma ilegible

Inspector



LUZ ARMACA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
[Signature]
Resolución No.599 Minjusticia

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del notario Alfred Fuchs, de Ingelheim am Rhein, y la del sello oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto oficial.

Mainz, 6 de marzo de mil novecientos noventa y ocho

El Presidente del Tribunal Regional

Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hans Paul Tüttenberg)

(sello redondo en tinta:)

Tribunal Regional de Mainz

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Frankfurt am Main bajo el No. 0276 del 30 de abril de 1998 y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 141058 del 14 de mayo de 1998.

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.
Santafé de Bogotá, 10 de julio de 1998.

LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Resolución No.599 Minjusticia

13010

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S)

[Handwritten signature]

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA SANTIPE DE BOGOTA.

14 JUL 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 JUL 15 PM 12:17

JEFE DE LEGALIZACIONES
SECRETARIA DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

661949
CUTIA FIRMA MARCELO EN EL
DOCUMENTO DESDEPENIA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTACOMIA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
26 ABR 2000
JUAN MANUEL ROTERO MEDINA
NOTARIO

EN TRADUCCION FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.
Santafé de Bogotá, 10 de Julio de 1998.

LUIS...
...

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG

Poder conferido el: 25-02-98

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,


GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

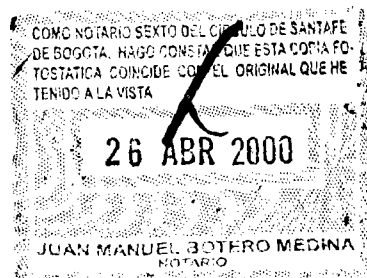
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:


EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



13 folios 86 y 87 son folios *2020128.
*junio 22/2000.

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Santafé de Bogotá D. C.

10 JUN. 1998

Ante mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA

Comprobadura, persona, persona,

[Firma manuscrita]

Identificación (C.C.) (C.C.)

2877924

438019

y la(s) Libreta(s) Min. de Ed.

832 - 31929

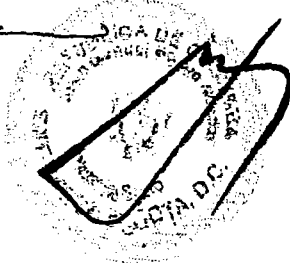
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FO-
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA

26 ABR. 2000

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]



**EXTRACTO PARA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

(21) No.SOLICITUD:	(51) INT.CL:	A61K 037/000
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN:	(71) SOLICITANTE:	BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG
(30) PRIORIDAD:	SI	
(31) No.DE SOLICITUD:	60/134.136	(72) INVENTOR(ES):
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN:	14 - V - 1999	1- Dr. John-Edward PARK 2- Dr. Wolfgang J. RETTIG 3- Dr. Martin LENTER 4- Dr. Stefan PETERS (*)
(33) PAÍS:	DE.	(74) APODERADO:
		EMILIO FERRERO

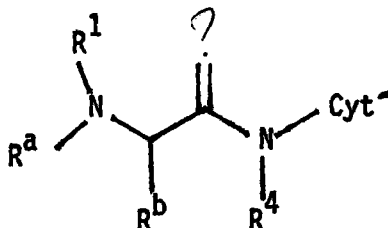
(54) TÍTULO: **COMPUESTOS ANTI-TUMORALES ACTIVADOS POR PAF**

(*) 5- Dr. Pilar GARIN-CHESA, 6-Dr.Jürgen MACK, 7- Dr. Dietmar LEIPERT, 8- Dr. Raymond A. FIRESTONE.

(57) RESUMEN:

REIVINDICACION

1. Un compuesto de fórmula (I)



R¹ O una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde representa un grupo aminoalcanoilo u oligopeptidoilo, cuya función amino N-terminal puede estar fijada a un grupo de protección terminal,

R^a y R^b, junto con el grupo N-C interyacente, forman un anillo heterocíclico de 3 a 7 miembros, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido y opcionalmente condensado con benzo o ciclohexano, en el que uno o dos grupos CH₂ también pueden ser reemplazados por NH, O o S,

R⁴ representa H, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₈, arilo o heteroarilo; y Cyt⁺ representa el residuo de un compuesto citotóxico o citostático; con la condición de que estén excluidos

N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutaminil-L-seril-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftacenil]-. Alfa.-L-lixo-hexopiramos-3-il]-L-prolinamida, y

N2-acetil-L-homoarginil-L-tirosil-L-glutaminil-L-seril-L-seril-N-[2,3,6-tridesoxi-1-O-[(1S,3S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-3,5,12-trihidroxi-3-(hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1-naftacenil]-. alfa.-L-lixo-hexopiranos-3-il]-L-prolinamida.

NOTA: FAVOR NO PUBLICAR ANTES DE LOS 18 MESES A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACION DE LA SOLICITUD.

de la cual se reivindica prioridad.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00034117 00000000

Folios: 09

Fecha (AMD): 2000-05-11 17:11:00

Trámite : 002 PATENTES A : REGISTRO 411 PRESENTE

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 24,258
FECHA : ABRIL 13 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	US. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	940465	17,210,000.00

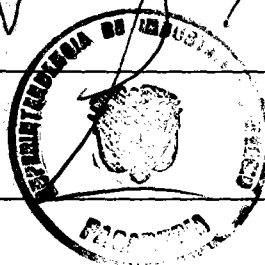
***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Libro 10903-209-1-1

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia



90
85

Industria y Comercio

SUBSECRETARÍA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
N C I A

REQUISITOS MINIMOS PARA

Radicación: 00034117 00010000
Fecha (AMD): 2000-05-11 17:14:00
Trámite: 001 PATENTES D REGISTRO ALL PRESENTAR
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante
- Nombre e identificación del Inventor
- Título o nombre de la Invención
- Descripción
- Reivindicaciones
- Resumen
- Comprobante de Pago

[]
[]
[]
[]
[] 60.
[] 73.
[] 89.

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario
- Nombre e identificación del inventor o diseñador
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- Representación gráfica
- Comprobante de pago

[]
[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430
2000-05-15

EXPEDIENTE 2000-34117

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y en la Resolución No. 002 del 4 de Enero del 2000).

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

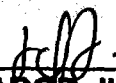
OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 15 de Mayo del 2000


EXAMINADOR JURIDICO.

1º EXAMEN DE FORMA

Radicación nº 00-34117

CONCEPTO TÉCNICO Nº 947

IPC:A61K 38/04

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94. |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94. |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☐ NO ☒ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 20 junio de 2000

202012

1º EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO N° 94¹

Radicación n° 00-34117

IPC: A61K 38/04

- -El título debe estar acorde con el capítulo reivindicatorio y descriptivo, los cuales se refieren a derivados de una estructura química principal.
- -En la reivindicación 1, no es clara en las partes donde R¹ representa un grupo amino alcanoilo u oligo peptidoilo, porque estos términos no son suficientes para determinar inequívocamente a una estructura específica de un sustituyente; tampoco es claro lo que puede significar Cyt¹ porque esta definido negativamente, o sea se enuncia lo que no significa, cuando lo correcto es definirlo en términos técnicos precisos e inequívocos, para que quede clara y perfectamente establecido su significado, además los términos residuo de compuesto citotóxico técnicamente no significan un sustituyente específico o claramente definido.
- -La reivindicación 5 no es clara en la parte donde el sustituyente se define Cyt¹ ya que no ha sido definido claramente en las reivindicaciones precedentes.
- -La reivindicación 6 contiene los mismos defectos formales de las reivindicaciones precedentes.
- -La reivindicación en la reivindicación 9 no se sabe que se quiere significar con los grupos de fórmulas (11) H-Cha, (13) H-Nva, (20) H-Hse, (25) a (33) en la parte -Xxx-
- -La reivindicación 11 no es consecuente con las reivindicaciones de las cuales se supone dependiente, porque ninguna de las reivindicaciones se refiere a H₂N-Cyt¹.
- -Las reivindicaciones 13 a 17 no son claras porque se refiere a un "profarmaco" el cual no esta definido clara e inequívocamente, porque se esta definiendo un compuesto en parámetros que no lo delimitan ni definen ningún compuesto de manera inequívoca.
- -La reivindicación 27, no es clara en las partes donde R¹ representa un grupo amino alcanoilo u oligo peptidoilo, porque estos términos no son suficientes para determinar inequívocamente a una estructura específica de un sustituyente; tampoco es claro lo que puede significar Cyt¹ porque esta definido negativamente, o sea se enuncia lo que no significa, cuando lo correcto es definirlo en términos técnicos precisos e inequívocos, para que quede clara y perfectamente establecido su significado.

además los términos residuo de compuesto citotóxico técnicamente no significan un sustituyente específico o claramente definido, debido a que en la reivindicación 1, de la cual es dependiente no esta definidos los sustituyentes en referencia. *92*

- -Se debe adjuntar los artes finales de la estructura química principal junto con las tarjetas y el extracto para publicación debidamente diligenciados.

202012

Santa Fe de Bogotá D.C., 19 de mayo de 2000.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-34117

AUTO 1508

2130
2000-07-06

LA JEFE DE DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor EMILIO FERRERO como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, aplicable de conformidad con lo dispuesto en el artículo 56 de la misma Decisión, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complementé los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 04 JUL 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

[Signature]
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C. *06 JUL 2000* *[Signature]* notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA