

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 192**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/65** (2007.01)

**A61K 47/55** (2007.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 31/4745** (2006.01)

**A61K 31/407** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2015** **PCT/US2015/033509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015** **WO15187540**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2015** **E 15803150 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 3152223**

54 Título: **Conjugado de mitomicina**

30 Prioridad:

**03.06.2014 US 201462007159 P**

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

**28.09.2021**

73 Titular/es:

**JIARAY PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**The Grand Pavilion Commercial Center, Oleander**  
**Way, 802 West Bay Road, P.O. Box 32052**  
**Grand Cayman, KY1-1208, KY**

72 Inventor/es:

**CHU, SHAOSONG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 857 192 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conjugado de mitomicina

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados péptido-fármaco y composiciones farmacéuticas que incluyen los conjugados específicos de tumores. La invención se refiere además al uso de tales conjugados y composiciones como agentes antitumorales para el tratamiento del cáncer en mamíferos, particularmente humanos.

## 10 Antecedentes y técnica relacionada

Las células cancerosas a menudo sobreexpresan ciertas proteasas en comparación con las células normales. Esto ha impulsado esfuerzos para apuntar a las células cancerosas enlazando un agente terapéutico citotóxico con un péptido que escinde una proteasa tumoral, para liberar el fármaco citotóxico cerca o dentro de las células cancerosas a la vez que conserva o afecta menos sustancialmente a las células normales.

La Patente de Estados Unidos N° 6.214.345 divulga conjugados de fármaco-péptido específicos de tumores que incluyen un conector autoinmolante y se activan selectivamente en el sitio de un tumor, en donde el fármaco puede ser mitomicina o doxorubicina y el conector autoinmolante es alcohol *p*-aminobencílico.

Las células que expresan asparaginasas son objetivos atractivos para el enfoque del conjugado péptido-fármaco, ya que muchos tumores sobreexpresan estas proteasas. Una como la paraginasa, legumaína, ha atraído especial atención a este respecto (Wu et al, Cancer Research 2006; 66: 970- 980; Liu et al, Cancer Research 2003; 63: 2957-2964; Bajjuri et al, ChemMedChem. 2011; 6, 54-59).

La mitomicina, la doxorubicina y la camptotecina han atraído la atención como fármacos empleados en terapias de conjugados péptido-fármaco. La Patente de Estados Unidos N° 7.608.591; Solicitud Publicada de Estados Unidos 20110300147; La Solicitud Publicada de Estados Unidos 20090175873; y la Patente de Estados Unidos N° 8.314.060 divulgan ejemplos de conjugados péptido-fármaco que se dirigen a la legumaína con fármacos que incluyen doxorubicina.

Estos enfoques previos han implicado generalmente la modificación química de la fracción del fármaco, lo que puede afectar adversamente a la eficacia del fármaco. El acoplamiento de péptidos directamente (a través del grupo carboxilo C-terminal) al átomo de aziridina N de la mitomicina produce una amida secundaria, un grupo funcional que típicamente no está sujeto al ataque de proteasas. Además, los estudios sobre mitomicina indican la función de un grupo NH en el anillo de aziridina para la actividad biológica. Por tanto, hay una necesidad de conjugados mejorados que dirijan fármacos antitumorales como la mitomicina a células tumorales que expresan legumaína y otras asparaginasas.

## 40 Breve descripción de los dibujos

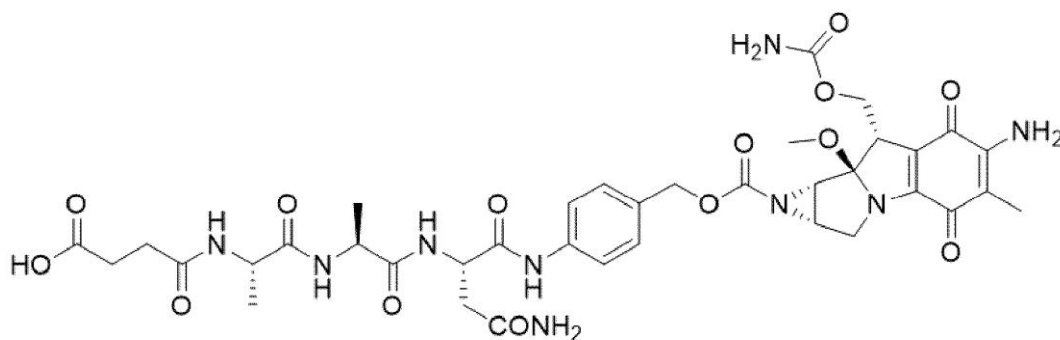
La Fig. 1 es un gráfico que muestra la velocidad de descomposición del ácido N<sup>α</sup>-succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [conjugado 8 en la presente] como una función del tiempo cuando se expone al plasma humano.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el peso corporal de ratones Balb/c en función del tiempo después administración de ácido N<sup>α</sup>-succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la curva de crecimiento tumoral del modelo de cáncer de colon singénico CT-26 subcutáneo en ratones Balb/c después de la administración de ácido N<sup>α</sup>-succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina.

## 55 Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado péptido-fármaco que es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende por lo menos un péptido-fármaco de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado péptido-fármaco de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar el cáncer en un mamífero.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en un método de tratar el cáncer en un mamífero.

Ciertas realizaciones de la divulgación son conjugados de péptido-fármaco, que comprenden, generalmente: 1) una fracción de péptido que puede escindirse mediante proteasas celulares, unido a 2) un conector autoinmolante, en particular la fracción p-aminobencil carbamoilo o p-aminobencil carbonato, que a su vez se une a 3) una fracción de fármaco citotóxica. En estas realizaciones, la fracción conectora se une a un residuo de asparagina, en cuya posición se produce la escisión proteolítica.

En realizaciones de la divulgación, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura de la Fórmula 1 siguiente:

R-Y-Z-Asn-Conector-D (Fórmula I)

en donde

R comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de

- i) un grupo acilo, un grupo carbamoilo, un grupo sulfonilo, grupo fosforilo o un grupo alquilo derivado de un ácido carboxílico C<sub>1</sub> a aproximadamente C<sub>20</sub> lineal, ramificado o alicíclico, opcionalmente sustituido con de uno a aproximadamente cinco grupos hidroxilo, amina, carboxilo, sulfónico o fosforilo,
- ii) un péptido con de uno a aproximadamente cincuenta residuos de L- o D-aminoácidos, y
- iii) un polietilenglicol con un peso molecular de 400 a aproximadamente 40.000;

Y es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Ser, Leu, Arg, Pro, Val, Tyr, Phe;

Z es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Asn y Pro;

Asn es un residuo de asparagina;

El conector es una fracción de p-aminobencil carbamoilo o una fracción de p-aminobencil carbonato;

D es una fracción de fármaco antitumoral unida a la fracción conectora, en donde el fármaco se selecciona del grupo que consiste de mitomicina, doxorubicina, aminopterina, actinomicina, bleomicina, 9-amino-camptotecina, N<sup>8</sup>-acetil espermidina, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, tallisomicina, citarabina, etopósido, camptotecina, taxol, esperamicina, podofilotoxina, anguidina, vincristina, vinblastina, morfolina-doxorubicina, n-(5,5-diacetoxi-pentil)doxorubicina, y derivados de los mismos.

En realizaciones de la divulgación de Fórmula I:

R comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de

i) un grupo acilo derivado de un ácido carboxílico de C<sub>1</sub> hasta aproximadamente C<sub>20</sub> lineal, ramificado o alicíclico, opcionalmente sustituido con de uno a aproximadamente cinco grupos hidroxilo, amina, carboxilo, sulfónico o fosforilo,

5 ii) un péptido con de uno a aproximadamente cincuenta residuos de L-aminoácidos, y

iii) un polietilenglicol con un peso molecular de 400 a aproximadamente 40.000;

10 Y es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Ser, Leu, Arg, Pro, Val, Tyr, Phe;

Z es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Asn y Pro;

15 Asn es un residuo de asparagina;

El conector es una fracción de p-aminobencilcarbamoilo;

20 D es una fracción de fármaco antitumoral, en donde el fármaco se selecciona del grupo que consiste de mitomicina y doxorubicina.

En otras realizaciones de la divulgación de la Fórmula I:

R comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de

25 i) un grupo acilo, un grupo carbamoilo, un grupo sulfonilo, un grupo fosforilo o un grupo alquilo derivado de un ácido carboxílico de C<sub>1</sub> hasta aproximadamente C<sub>20</sub> lineal, ramificado o alicíclico, opcionalmente sustituido con de uno a aproximadamente cinco grupos hidroxilo, amina, carboxilo, sulfónico o fosforilo,

30 ii) un péptido con de uno a aproximadamente cincuenta residuos de L- o D-aminoácidos, y

iii) un polietilenglicol con un peso molecular de 400 a aproximadamente 40.000;

35 Y es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Ser, Leu, Arg, Pro, Val, Tyr, Phe;

Z es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Asn y Pro;

Asn es un residuo de asparagina;

40 El conector es una fracción de p-aminobencil carbonato; y

D es una fracción de fármaco antitumoral unida a la fracción conectora y en donde el fármaco es camptotecina.

45 En realizaciones adicionales la divulgación comprende un conjugado de péptido-fármaco dimérico de la fórmula mostrada en la Fórmula II:

D'-Conector-Asn-Z-Y-R'-Y-Z-Asn-Conector-D (Fórmula II)

50 En donde D y D' son fracciones de fármaco citotóxicas que son iguales o diferentes entre sí y se seleccionan independientemente del grupo que consiste de mitomicina, doxorubicina, aminopterina, actinomicina, bleomicina, 9-amino-camptotecina, N<sup>8</sup>-acetil espermidina, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, talisomicina, citarabina, etopósido, camptotecina, taxol, esperamicina, podofilotoxina, anguidina, vincristina, vinblastina, morfolina-doxorubicina, n-(5,5-diacetoxi-pentil)doxorubicina y derivados de los mismos;

55 El conector es una fracción de p-aminobencil carbamato o una fracción de p-aminobencil carbonato, en donde los conectores pueden ser iguales o diferentes;

R' comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de

60 i) un grupo bis-funcional seleccionado de un grupo acilo, un grupo carbamoilo, un grupo sulfonilo, grupo fosforilo o un grupo alquilo derivado de un ácido carboxílico de C<sub>1</sub> a aproximadamente C<sub>2</sub> lineal, ramificado o alicíclico, opcionalmente sustituido con de uno a aproximadamente cinco grupos hidroxilo, amina, carboxilo, sulfónico o fosforilo,

65 ii) un péptido con de uno a aproximadamente cincuenta residuos de L o D-aminoácidos, y

iii) un polietilenglicol con un peso molecular de 400 a aproximadamente 40.000; y

Y es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Ser, Leu, Arg, Pro, Val, Tyr, Phe; Asn es un residuo de asparagina; y

Z es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Thr, Asn y Pro.

Como se apreciará, los conjugados de Fórmula II son esencialmente versiones diméricas de los conjugados de Fórmula I, que pueden dirigirse a dos moléculas de fármaco citotóxico por conjugado a las células o tejido objetivo.

Realizaciones adicionales de la divulgación comprenden una composición farmacéutica que comprende por lo menos un conjugado de péptido-fármaco de Fórmula I o Fórmula II en por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Realizaciones adicionales de la divulgación comprenden un método para tratar el cáncer en un mamífero, que puede ser un humano, que comprende administrar una cantidad eficaz antitumoral del conjugado o composición farmacéutica de la invención.

### Descripción detallada de la invención

"Mitomicina", como se usa aquí, se refiere a miembros de la familia de fármacos que contienen aziridina aislados de *Streptomyces caespitosus* o *Streptomyces lavendulae*, e incluye específicamente mitomicina C y mitomicina A.

"Doxorubicina", como se usa aquí, se refiere a miembros de la familia de antraciclinas derivadas de la bacteria de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, e incluye doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina e idarrubicina.

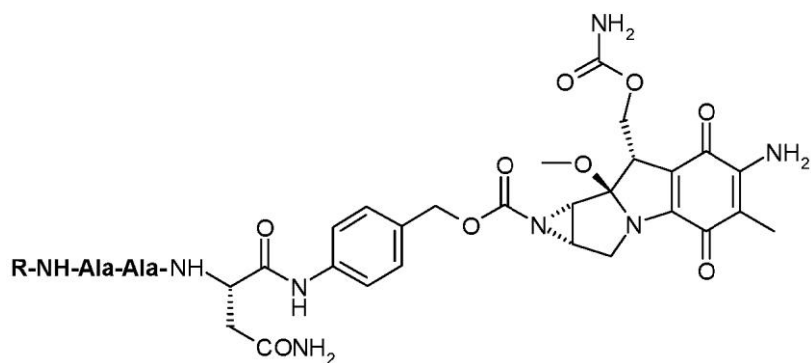
"Camptotecina" como se usa aquí se refiere a miembros de la familia de alcaloides aislados de *Camptotheca acuminata* y sus derivados químicos, e incluye camptotecina, irinotecán, topotecán y rubitecán.

La presente divulgación proporciona conjugados péptido-fármaco específicos de tumores que comprenden una fracción de péptido, un conector autoinmolante que es p-aminobencil-carbamoilo o p-aminobencil-carbonato (dependiendo del tipo de grupo funcional contenido en el fármaco al que se une el conector autoinmolante) y una fracción de fármaco citotóxica. Los conjugados actúan como profármacos en el sentido de que el conjugado es sustancialmente inactivo y no tóxico. La fracción de péptido puede escindirse selectivamente mediante una enzima proteasa in vivo para liberar la fracción conectora autoinmolante/fármaco citotóxico. Tras tal escisión enzimática, el conector autoinmolante se hidroliza espontáneamente para producir el fármaco libre en su forma activa, pero más dirigido al medio objetivo, como el sitio de un tumor en un paciente humano. De esta manera, el fármaco citotóxico se dirige a un sitio particular que necesita tratamiento, mientras que se reduce el daño celular y tisular en sitios distintos del sitio objetivo.

La fracción de fármaco citotóxica tiene un grupo funcional químicamente reactivo por medio del cual la estructura principal del fármaco se une covalentemente al conector autoinmolante. El grupo funcional que une el fármaco citotóxico al conector autoinmolante es tal que, tras la hidrólisis del conector autoinmolante, el fármaco citotóxico se libera de forma citotóxicamente activa. Dicho grupo funcional puede incluir, por ejemplo, una amina primaria, una amina secundaria o hidroxilo. Los fármacos citotóxicos incluyen mitomicina, doxorubicina, aminopterina, actinomicina, bleomicina, 9-amino-camptotecina, N<sup>8</sup>-acetil espermidina, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, talisomicina, citarabina, etopósido, camptotecina, taxol, esperamicina, podofilotoxina, anguidina, vincristina, vinblastina, morfina-doxorubicina, n-(5,5-diacetoxi-pentil)doxorubicina y derivados de los mismos. Las realizaciones de la divulgación se basan en doxorubicina y/o camptotecina. El conjugado péptido-fármaco de la invención se basa en la mitomicina.

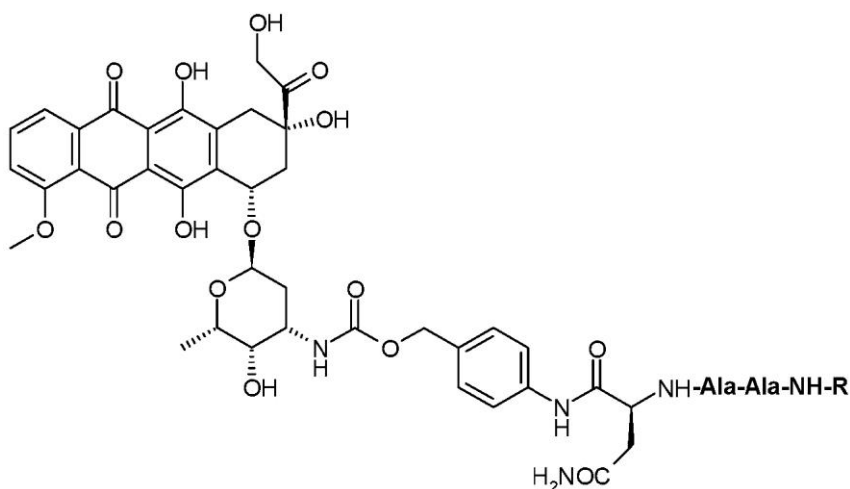
En realizaciones específicas de la divulgación en las que el fármaco (D) es mitomicina, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura que se muestra en la Fórmula III (en donde R se define como antes y Ala es un residuo de alanina):

Formula III



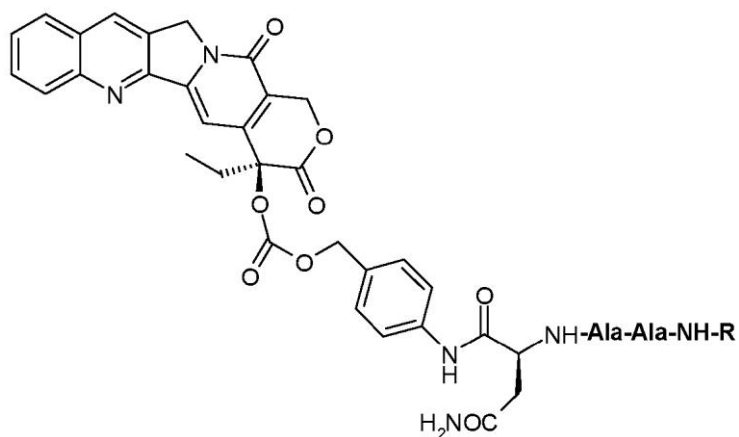
En realizaciones específicas de la divulgación en las que el fármaco (D) es doxorubicina, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura que se muestra en la Fórmula IV (en donde R se define como antes y Ala es un residuo de alanina):

Formula IV



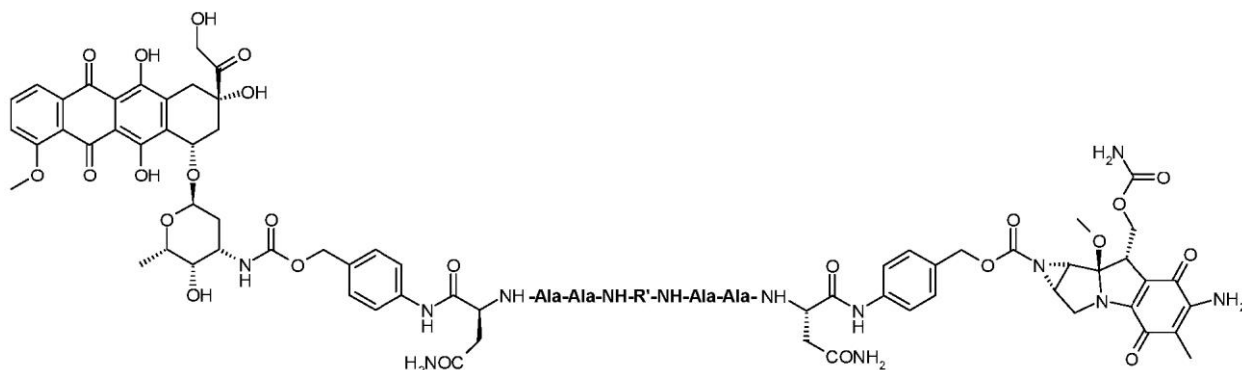
En realizaciones específicas de la divulgación en las que el fármaco (D) es camptotecina, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura que se muestra en la Fórmula V (en donde R, se define como antes y Ala es un residuo de alanina):

Formula V



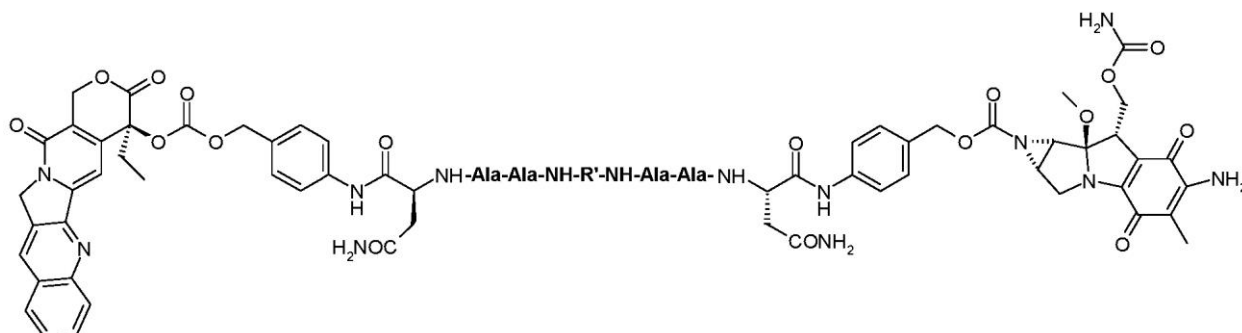
En realizaciones específicas de la divulgación de conjugados diméricos en los que el fármaco (D) es mitomicina y el fármaco (D') es doxorubicina, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura que se muestra en la Fórmula VI (en donde R' se define como antes y Ala es un residuo de alanina)

Formula VI



En realizaciones específicas de la divulgación de conjugados diméricos en los que el fármaco (D) es mitomicina y el fármaco (D') es camptotecina, los conjugados péptido-fármaco tienen la estructura que se muestra en la Fórmula VII (en donde R' se define como antes y Ala es un residuo de alanina)

Formula VII



Un conjugado de la invención es N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin. Los conjugados de la divulgación incluyen:

- Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin;
- N<sup>α</sup>-acetamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin;
- N<sup>α</sup>-butiramida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin;
- N<sup>α</sup>-hexanamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin;
- N<sup>α</sup>-[(2-amida-2-oxoetoxi) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin; y
- N<sup>α</sup>-[(2-amida-2-oxoetoxi)(metil) amino] ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomycin; Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina;
- N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina;
- N<sup>α</sup>-acetamida-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina;
- N<sup>α</sup>-butiramida-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina; y
- N<sup>α</sup>-hexanamida-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina;
- N<sup>α</sup>-[(2-amida-2-oxoetoxi) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina; y N<sup>α</sup>-[(2-amida-2-oxoetoxi)(metil)amino] ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina; en donde PABC es una fracción conectora de p-aminobencil carbamoilo.

Otros conjugados de la divulgación incluyen:

- Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina;
- N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina;
- N<sup>α</sup>-[(2-amida-2-oxoetoxi) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina; y

N<sup>α</sup>-[-((2-amida-2-oxoetoxi)(metil) amino) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina

En donde PABC es una fracción de p-aminobencil carbonato.

5 Los conjugados diméricos de la divulgación incluyen:

N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>4</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina -succinamida;  
 N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina-bis(O<sup>α</sup>)-acetamida;  
 N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicin-bis(N<sup>α</sup>-metil)-acetamida;  
 10 N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>4</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-succinamida;  
 N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-bis(O<sup>α</sup>)-acetamida; y  
 N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-bis(N<sup>α</sup>-metil)-acetamida.

En donde PABC es una fracción conectora de p-aminobencil carbamoilo o p-aminobencil carbonato.

#### 15 Preparación de conjugados péptido-fármaco

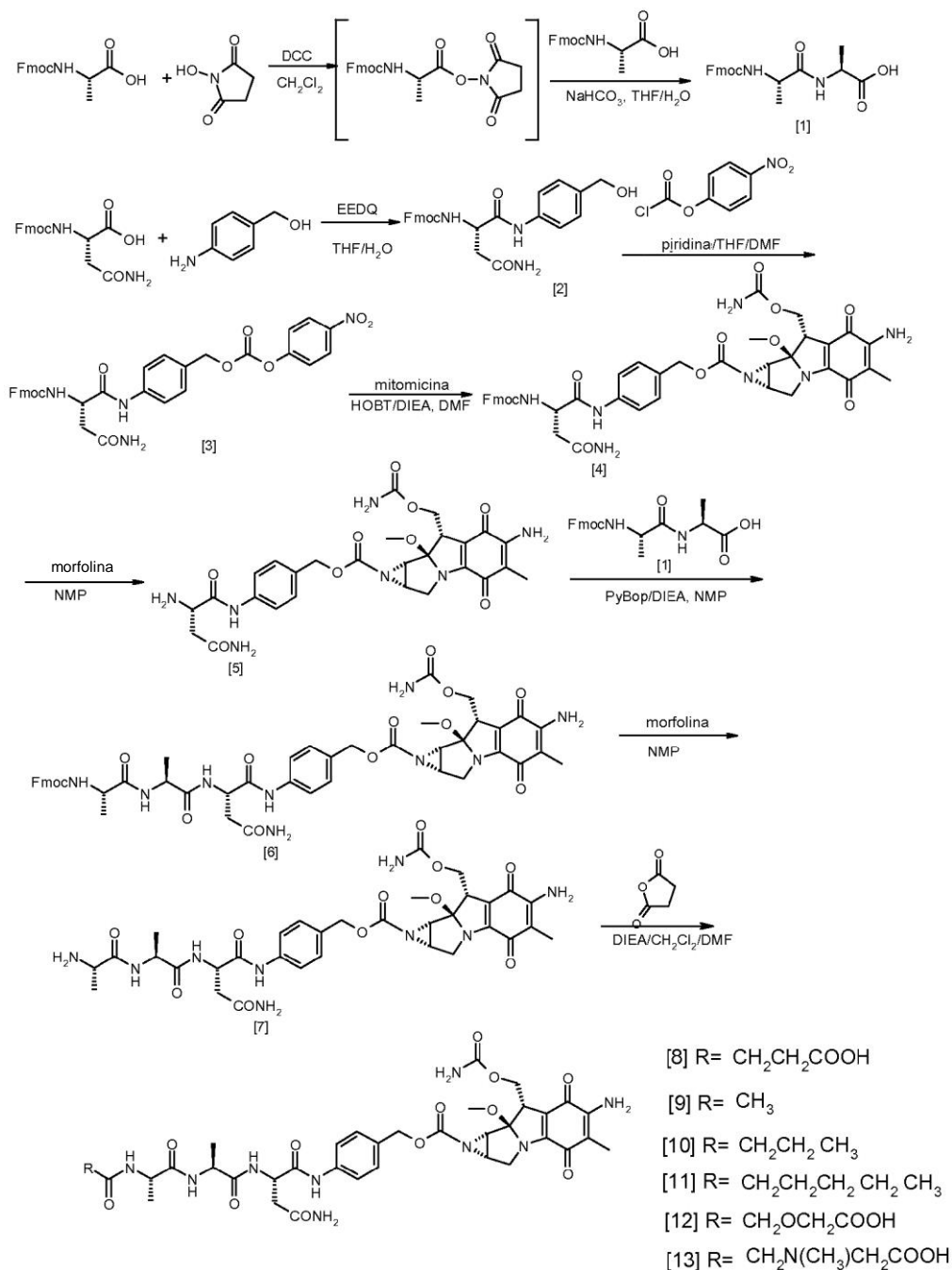
En general, los conjugados péptido-fármaco de Fórmula I y Fórmula II pueden prepararse usando materiales disponibles y técnicas de síntesis orgánica convencionales. Por ejemplo, los fármacos citotóxicos del tipo descrito están disponibles comercialmente y su síntesis se describe en la bibliografía científica.

Generalmente, los conjugados péptido-fármaco de la presente invención pueden construirse uniendo covalentemente la fracción de fármaco a la secuencia del péptido a través del conector autoinmolante. Las vías sintéticas específicas de preparación que se muestran a continuación son ejemplos de las que pueden utilizarse.

25 El esquema de síntesis 1 muestra una vía sintética para producir conjugados de péptido-mitomicina:

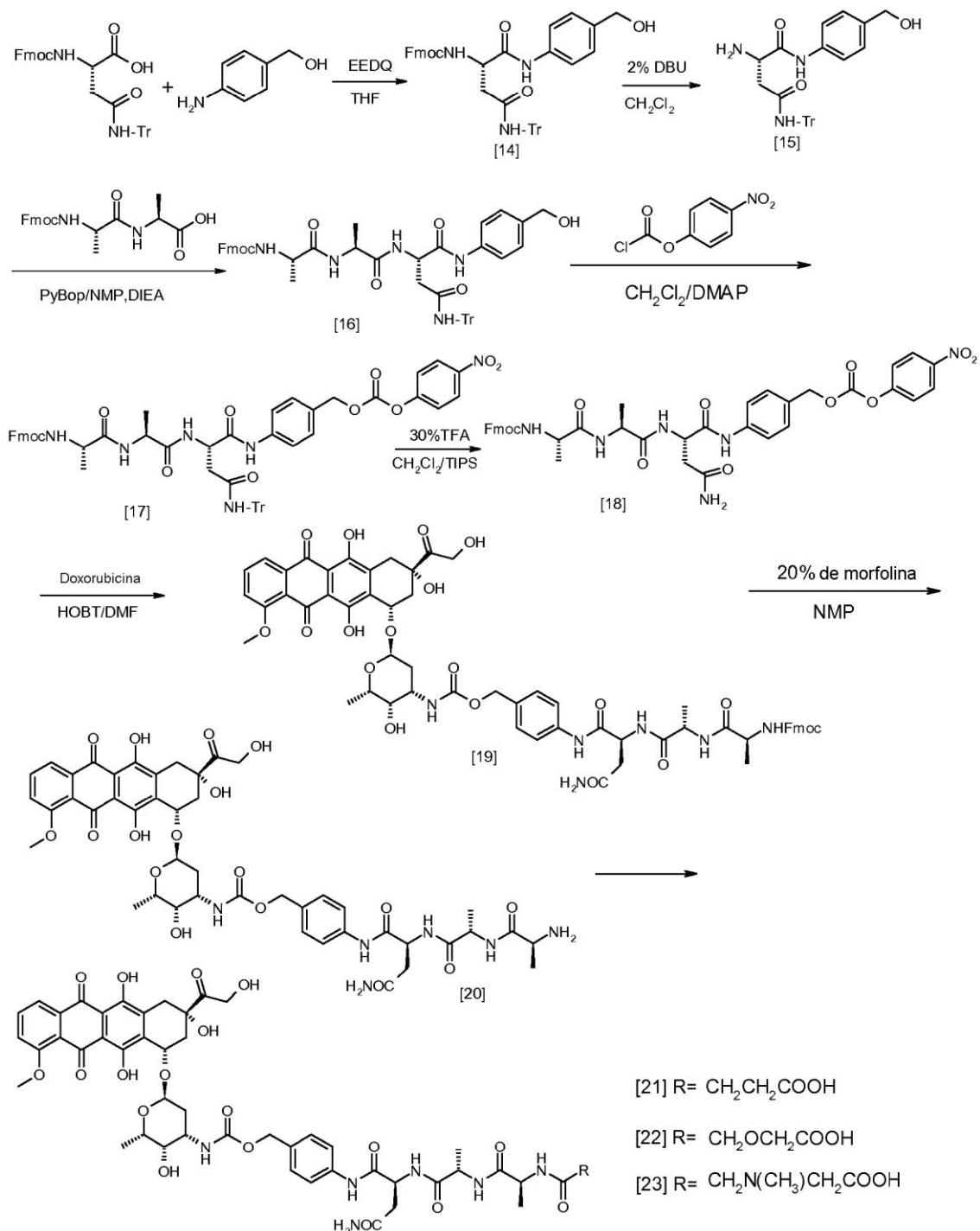


Esquema de Síntesis 1



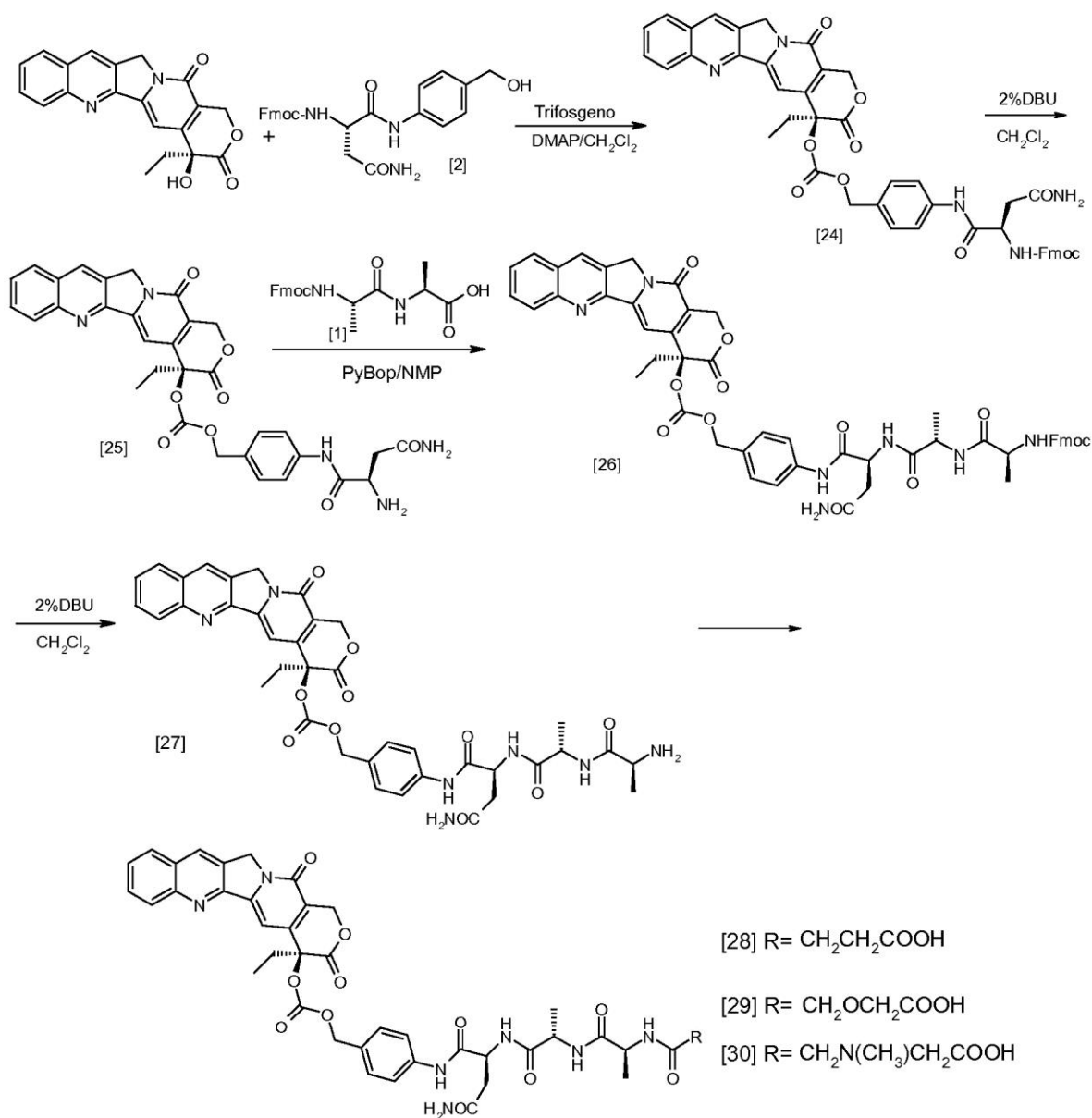
El esquema de síntesis 2 muestra una vía sintética para producir conjugados de péptido-doxorubicina:

Esquema de Síntesis 2



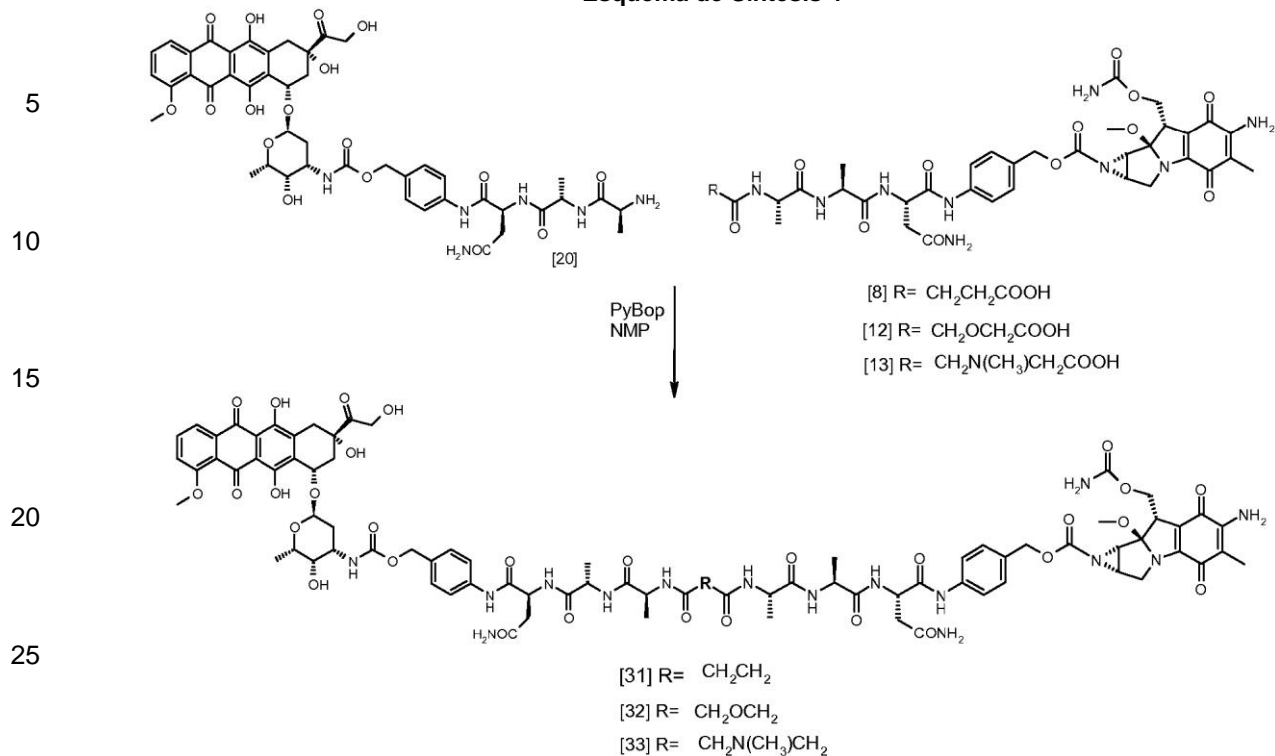
El esquema de síntesis 3 muestra una vía sintética para producir conjugados de péptido-camptotecina:

Esquema de Síntesis 3



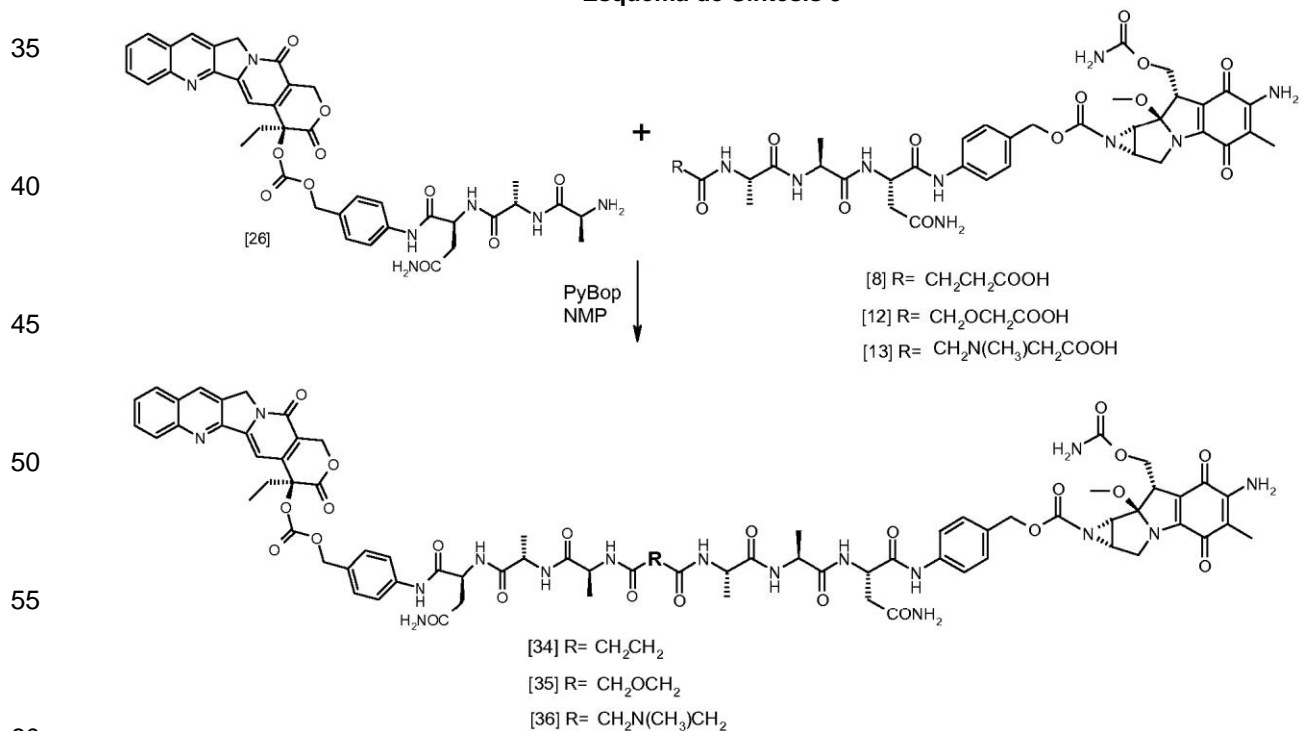
El esquema de síntesis 4 muestra una vía sintética para producir conjugados de doxorubicina-péptido-mitomicina (conjugado dimérico):

**Esquema de Síntesis 4**



El esquema de síntesis 5 muestra una vía sintética para producir conjugados de camptotecina-péptido-mitomicina (conjugados diméricos):

**Esquema de Síntesis 5**



En general para las reacciones de síntesis descritas:

a) Se emplearon métodos estándar de síntesis de péptidos para la deportación de Fmoc y tritilo y el acoplamiento de péptidos;

b) El conector autoinmolante se unió a amino ácido haciendo reaccionar N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn o N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn protegido con tritilo con alcohol p-aminobencílico, usando EEDQ como reactivo de acoplamiento en la mezcla de solventes orgánicos/acuosos;

c) El carbonato activado de alcohol p-aminobencílico podría obtenerse haciendo reaccionar cloroformiato de p-nitrofenilo con N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PAB-OH o N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-N-Tritilo-Asn-PAB-OH;

d) Se obtuvieron conjugados péptido-fármaco de mitomicina y doxorubicina haciendo reaccionar con el carbonato activado correspondiente de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-PNP o N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-PNP en DMF en presencia de HOBt;

e) Para la síntesis de conjugados de camptotecina, la camptotecina se hizo reaccionar con trifosgeno para proporcionar cloroformiato de camptotecina in situ, que luego se acopló con N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PAB-OH para obtener el N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-camptotecina correspondiente;

f) Los conjugados péptido-fármaco finales se obtuvieron mediante acilación con varios anhídridos, cloruros de acilo o ácidos carboxílicos mediante métodos de acoplamiento de péptidos.

Los conjugados finales sintetizados pueden purificarse mediante varios métodos que incluyen cromatografía en columna de sílice, HPLC, cromatografía de intercambio iónico, precipitación de ácido/base y cristalización.

Los conjugados finales pueden caracterizarse por <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS, LC/MS, UV/VIS, y/o IR.

Muchos de los conjugados divulgados pueden existir como clorhidrato u otras sales. Los expertos en química médica apreciarán que la elección de la sal no es crítica, y pueden prepararse otras sales farmacéuticamente aceptables mediante métodos bien conocidos y pueden utilizarse en la preparación de composiciones farmacéuticas. Ver, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Salts : Properties, Selection and Use. (P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth, eds.) International Union of Pure and Applied Chemistry, Wiley-VCH 2002 y L.D. Bighley, S.M. Berge, D.C. Monkhouse, in "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que no solo pueden producirse y usarse una variedad de sales, sino que también pueden producirse hidratos, solvatos y polimorfos a partir de los conjugados divulgados en la presente. Además, también pueden producirse fácilmente varias variantes isotópicamente sustituidas (mediante, por ejemplo, sustitución de deuterio por hidrógeno, <sup>13</sup>C por carbono, <sup>15</sup>N por nitrógeno). Tales derivados se contemplan dentro del alcance de esta divulgación.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, uno o más de los conjugados se combinan con por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable. "Portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a compuestos biocompatibles que son adecuados para una vía de administración particular de una sustancia farmacológicamente eficaz. Incluyen agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolalidad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de la penetración cutánea. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro, ed., 18ª edición, 1990). La elección particular de portadores depende de la terapia específica que se contempla. Varias formulaciones para composiciones farmacéuticas y componentes de las mismas se describen en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2014/0057844.

La selección de la fracción de fármaco citotóxico en los conjugados está guiada por el tipo de cáncer a tratar. Para el tratamiento de un tipo específico de cáncer o tumor, la fracción de fármaco citotóxico debe basarse en un fármaco citotóxico eficaz para tratar dicho tipo de cáncer. Por ejemplo, los conjugados de fármacos basados en mitomicina pueden usarse para tratar cánceres de acuerdo con, o guiados por, protocolos de administración de mitomicina que se conocen y recomiendan actualmente en la técnica.

El conjugado y las composiciones de la invención pueden usarse en métodos para tratar diferentes tipos de cánceres, incluyendo pero no limitados a, cáncer de vejiga, cánceres de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de intestino; cáncer de piel y cáncer de próstata.

Las vías de administración incluyen inyección, administración oral, administración bucal, administración parenteral, inhalación y administración rectal.

La dosificación del conjugado a administrar, y las vías y regímenes particulares de administración, dependen del tipo de cáncer a tratar y de las circunstancias de las condiciones particulares del cáncer, pero pueden

ser determinados por los expertos en la técnica.

El conjugado de la invención puede usarse en combinación con otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos. Por ejemplo, una terapia que usa el conjugado de la invención puede usarse en combinación con radioterapia. Los ejemplos que siguen ilustran ciertas realizaciones de la invención.

## EJEMPLOS

### Actividad biológica

Se probaron conjugados péptido-fármaco representativos de la presente invención en sistemas tanto in vitro como in vivo para determinar su actividad biológica. En estas pruebas, se determinó la potencia de los conjugados de los fármacos citotóxicos midiendo la citotoxicidad de los conjugados frente a células de origen canceroso humano. Un experto en la técnica reconocerá que cualquier línea celular tumoral que exprese las proteasas asociadas al tumor deseadas (proteasas que escinden los conjugados de la invención para liberar el fármaco en forma activa) podría usarse en lugar de las líneas celulares tumorales específicas usadas en el siguiente análisis. A continuación se describen pruebas representativas usadas y los resultados obtenidos.

#### Prueba I

##### *Estabilidad del plasma humano*

Se diluyeron 20  $\mu$ l de conjugado de péptido-fármaco 500  $\mu$ M N<sup>o</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [en la presente compuesto 8] en solución madre de DMSO a 1 ml con plasma humano (concentración final: 10  $\mu$ M, 2% de DMSO), y la mezcla se incubó a 37° C. Se retiraron alícuotas de 100  $\mu$ l en los puntos temporales de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 horas y se diluyeron con 400  $\mu$ l de acetonitrilo frío que contenía tolbutamida (200 ng/ml) como estándar interno. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 4 minutos. Se diluyeron 100  $\mu$ l de los sobrenadantes anteriores con 300  $\mu$ l de agua de HPLC de ácido fórmico al 0,1% y se tomaron 10  $\mu$ l para análisis LC/MS/MS (columna: C-18; fase móvil: ácido fórmico al 0,1% en agua/ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo; transición iónica: ion Q1 (m/z) = 840,5, ion Q2 (m/z) = 462,2). Como se muestra en la Figura 1, el conjugado péptido-fármaco es relativamente estable en el plasma humano con una vida media mayor de 15 horas ( $T_{1/2} > 15$  h). Se detectó menos del 2% de fármaco mitomicina libre.

#### Prueba II

##### *Ensayo de citotoxicidad in vitro*

Los cultivos monocapa de células de carcinoma humano se recogieron usando tripsina-EDTA, y las células se contaron y se volvieron a suspender a  $1 \times 10^5$ /ml en RPMI-1640 o DMEM que contenía FBS al 10%. Se añadieron células (0,1 ml/pocillo) a cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37° C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Se retiró el medio de las placas y se añadieron diluciones en serie de mitomicina o conjugados en medio (concentración final de DMSO <0,1%) a los pocillos. Todas las diluciones se realizaron por triplicado. Las células tratadas con el fármaco se incubaron durante otras 72 horas a 37° C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%. Se añadieron 50  $\mu$ l de TCA frío (50%, p/vol) a cada pocillo y se incubaron las placas a 4° C durante 1 hora. Las placas se lavaron con agua del grifo lenta tres veces y se secaron a temperatura ambiente. Se añadieron 50  $\mu$ l de solución de sulforrodamina B (0,4%, p/vol) a cada pocillo y las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se aclararon con una solución de ácido acético (1%, vol/vol) para eliminar el colorante no unido y se secaron a temperatura ambiente. Se añadieron 200  $\mu$ l de solución base Tris 10 mM a cada pocillo y las placas se agitaron en un agitador giratorio durante 15 minutos para solubilizar el colorante unido a proteínas. Se midió la densidad óptica de los pocillos a 510 nm en un lector de microplacas, y se calculó la IC<sub>50</sub> mediante GraphPad a partir de tres experimentos separados por triplicado en cada experimento y se expresa como media (Tabla 1).

Tabla 1 IC<sub>50</sub> (μM, n=3)

Muestra	HCT116	HepG2
Mitomicina	0.116	0.143
N <sup>α</sup> -ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [compuesto 8] (conjugado péptido-fármaco de la invención)	6.65	2.48
N <sup>α</sup> -acetamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [compuesto 9]	5.37	4.17
N <sup>α</sup> -butiramida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [compuesto 10]	8.85	8.16
N <sup>α</sup> -hexanamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [compuesto 11]	5.95	4.91

Los ensayos de líneas celulares de carcinoma humano HCT116 y HepG2 revelan que la citotoxicidad de los conjugados péptido-fármaco se redujo de 76 a 17 veces en comparación con el fármaco original mitomicina, dependiendo de las diferentes líneas celulares tumorales. La proteasa asociada a tumores legumaina se sobreexpresa en el microambiente tumoral del tumor sólido en condiciones hipóxicas y ácidas. Sin embargo, se ha informado con anterioridad de algún nivel de expresión de legumaina de tanto la línea celular HCT116 como la HepG2 en cultivo celular, lo que puede dar como resultado la actividad residual del conjugado péptido-fármaco como se observa en este ensayo.

### Prueba III

#### *Dosis máxima tolerada in vivo (MTD) en ratones Balb/c*

Se evaluaron por separado la tolerabilidad de la mitomicina y su conjugado péptido-fármaco N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [compuesto 8] como agente individual en ratones Balb/c. Los resultados de los pesos corporales en diferentes grupos en diferentes puntos temporales después del tratamiento se muestran en la Figura 2.

En el grupo de dosis de mitomicina de 10 mg/kg, una vez por semana, se observó la muerte del animal. En el grupo de 5 mg/kg, los ratones mostraron comportamientos de piloerección y retraso. En el grupo de mitomicina de 5 mg/kg se observó pérdida de peso corporal (>15%). Por otra parte, no se observó apariencia y peso corporal anormales (<10%) para el conjugado péptido-fármaco N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] en los grupos de dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, una vez a la semana, tres inyecciones en total durante 24 días. El estudio de toxicidad murina reveló que el conjugado péptido-fármaco N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] es mucho menos tóxico que el fármaco original mitomicina in vivo. La dosis máxima tolerada en ratones (MTD) de conjugado péptido-fármaco aumenta por lo menos 20 veces en comparación con el fármaco original mitomicina.

### Prueba IV

#### *Actividad antitumoral in vivo*

El efecto tumoricida del conjugado de péptido-fármaco N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] se evaluó en un modelo de cáncer de colon singénico CT-26 subcutáneo en ratones Balb/c. Cada ratón se inoculó por vía subcutánea en la región del flanco derecho con células tumorales CT-26 (5x10<sup>5</sup>) en 0,1 ml de PBS. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó aproximadamente 180 mm<sup>3</sup> (después de aproximadamente 10 días), los ratones con tumor CT-26 se trataron mediante administración intravenosa con: vehículo (2% de DMA y 98% de 2HP-β-CD al 40%), mitomicina (2 mg/kg; 5 mg/kg, QW) y conjugado N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] (25 mg/kg; 50 mg/kg, QW) durante tres semanas, total de tres inyecciones por ratón. La curva de crecimiento tumoral del modelo CT-26 se muestra en la Fig.3.

Como se ha informado anteriormente, aunque las células CT-26 tienen una expresión débil de la proteasa legumaina asociada a tumores in vitro, se expresa abundantemente in vivo en TME en la superficie de células endoteliales viables y macrófagos asociados a tumores en el microambiente de tumores sólidos CT-26, ya que la expresión de legumaina se induce en condiciones de hipoxia y estrés. El conjugado de activación específica de legumaina N<sup>α</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] demostró una fuerte eficacia antitumoral en el modelo de cáncer de colon singénico CT-26 subcutáneo en ratones Balb/c como se muestra en la Fig. 3. A una dosis de 50 mg/kg, que es mucho más baja que su MTD, el conjugado inhibe significativamente el crecimiento del tumor frente al control no tratado (T/C = 36,4%, p <0,01). Mientras que en su dosis de MTD (5 mg/kg), el fármaco original mitomicina demostró un efecto de inhibición del crecimiento tumoral mucho más débil (T/C = 50,4%). Por lo tanto, los experimentos in vivo muestran que el conjugado péptido-mitomicina de la presente invención producen actividad antitumoral con mayor potencia y menos toxicidad para el huésped que el fármaco original mitomicina.

## Ejemplos de síntesis

Ejemplo 15 Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala [1]

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala (1,58 g, 5,0 mmoles), N-hidroxil succinimida (0,63 g, 5,5 mmoles) y DCC (1,03 g, 5,0 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) a 5° C durante 6 horas. Se filtró la DCU y se concentró el filtrado. El residuo se volvió a disolver en THF (50 ml) y se mantuvo en el frigorífico (4° C) durante la noche. Se filtró más DCU y se añadió la solución de THF a una solución de alanina (0,99 g, 7,5 mmoles) y NaHCO<sub>3</sub> (1,68 g, 20 mmoles) en THF/H<sub>2</sub>O al 25% (80 ml). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 25° C durante 5 horas. El THF se eliminó por concentración y la suspensión acuosa se ajustó a pH 4 con HCl concentrado. La suspensión acuosa se agitó a 25° C durante otras 3 horas y el precipitado se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con agua desalinizada y se secó al vacío sobre KOH para dar un producto sólido blanco (1,77 g, rendimiento del 83,7%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 383

Ejemplo 220 Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PAB-OH [2]

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn (1,77 g, 5,0 mmoles), alcohol p-aminobencílico (0,86 g, 7,0 mmoles) y EEDQ (1,48 g, 6 mmoles) en THF/H<sub>2</sub>O (100/20 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió una cantidad adicional de EEDQ (0,61 g, 2,5 mmoles) y se agitó durante otras 24 horas. El THF se eliminó por concentración y la suspensión del residuo se diluyó con solución acuosa de NaOH/NaHCO<sub>3</sub> (2/8 g, 200 ml) y se agitó durante 3 horas. El precipitado se recogió por filtración, se enjuagó con agua y se volvió a suspender en ácido cítrico al 10% (150 ml). El precipitado se recogió por filtración, se enjuagó con ácido cítrico al 10% seguido de agua desalinizada y se secó al vacío. El sólido obtenido anteriormente se trituro en acetato de etilo (100 ml). El sólido se recogió por filtración y se secó al vacío para dar un producto blanquecino (0,95 g, 40% de rendimiento).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 460

Ejemplo 335 Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-PNP [3]

Se trató N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PAB-OH [2] (0,75 g, 1,6 mmoles) en THF/DMF seco (50/5 ml) a temperatura ambiente con cloroformiato de p-nitrofenilo (0,4 g, 2,0 mmoles) y piridina (0,15 g, 2,0 mmol). Después de 16 horas, se añadió una cantidad adicional de cloroformiato de p-nitrofenilo (0,2 g, 1,0 mmoles) y la solución de la reacción se agitó durante otras 6 horas. La solución anterior se diluyó con acetato de etilo (250 ml) y se lavó con ácido cítrico al 5% (2 x 100 ml) seguido de salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta la sequedad. El residuo se trituro en EA/Hexano al 50% y el sólido se recogió por filtración para dar un producto de color amarillento (0,8 g, rendimiento del 81%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 625

Ejemplo 445 Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-mitomicina [4]

Se trataron N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-PNP [3] (624 mg, 1,0 mmoles) y mitomicina (400 mg, 1,2 mmoles) en DMF seco (15 ml) a temperatura ambiente con HOBT (675 mg, 5,0 mmoles) y DIEA (650 mg, 5,0 mmoles) durante 4 horas. La mezcla de la reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó tres veces con NaOH/NaHCO<sub>3</sub> (1/4 g, 200 ml) seguido de salmuera. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró hasta la sequedad a presión reducida. El residuo se trituro en acetato de etilo/hexano al 50% (50 ml) y el sólido se recogió por filtración, se enjuagó con acetato de etilo/hexano y se secó al vacío para dar un producto púrpura (635 mg, rendimiento del 76,3%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 820

Ejemplo 5

## 60 Preparación de Asn-PABC-mitomicina [5]

Se trató N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-mitomicina [4] (624 mg, 0,76 mmoles) con morfolina/NMP al 20% (15 ml) a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió acetato de etilo/hexano al 50% (100 ml) y se eliminó el sobrenadante. El proceso anterior se repitió dos veces. El residuo se volvió a disolver en metanol (25 ml) y el disolvente se evaporó a presión reducida hasta la sequedad. El residuo se trituro en acetato de etilo/hexano al 50% (100 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó con



acetato de etilo/hexano y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (440 mg, 95,6% de rendimiento).  
LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 598

#### Ejemplo 6

##### *Preparación de N<sup>ε</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [6]*

Se trataron Asn-PABC-mitomicina [5] (440 mg, 0,73 mmoles) y N<sup>ε</sup>-Fmoc-Ala-Ala [1] (286 mg, 0,75 mmoles) en NMP (15 ml) con PyBop (390 mg, 0,75 mmoles) y DIEA (585 mg, 4,5 mmoles) a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de la reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml). La solución orgánica se lavó con ácido cítrico al 5% (3x100 ml), salmuera y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo se trituró en acetato de etilo/hexano al 50% (100 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se recogió por filtración y se volvió a suspender en acetato de etilo (50 ml) y se sonicó. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (530 mg, 75,4% de brillo).  
LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 962

#### Ejemplo 7

##### *Preparación de Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [7]*

Se trató N<sup>ε</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [6] (481 mg, 0,5 mmoles) en morfina/NMP al 20% (10 ml) a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió acetato de etilo/hexano al 50% (150 ml) y se agitó durante 1 hora. Se eliminó el sobrenadante y el residuo se trituró en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml). El sólido se recogió por filtración y se volvió a disolver en metanol (20 ml). El solvente se evaporó a presión reducida y el residuo se trituró en acetato de etilo. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (277 mg, rendimiento del 75%).  
LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 740

#### Ejemplo 8

##### *Preparación de N<sup>ε</sup>-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8]*

Se trató Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [7] (260 mg, 0,35 mmoles) en DMA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2/6 ml) a temperatura ambiente con anhídrido succínico (50 mg, 0,5 mmoles) y DIEA (130 mg, 1,0 mmoles). La mezcla de la reacción se agitó durante la noche. A la mezcla de la reacción anterior, se le añadió éter etílico (100 ml) y se agitó durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces. El residuo se trituró en HOAc/acetato de etilo al 2% (50 ml) y el sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (265 mg, rendimiento del 90%).  
LC/MC: (M-H) = 838

#### Ejemplo 9

##### *Preparación de N<sup>ε</sup>-acetamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [9]*

Se trató Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [7] (37 mg, 0,05 mmoles) en DMA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/3 ml) a temperatura ambiente con anhídrido acético (10 mg, 0,1 mmoles) y DIEA (13 mg, 0,1 mmoles). Después de 30 minutos, se añadió éter etílico (50 ml) y se agitó durante 60 minutos. El sólido blando se recogió por filtración, se enjuagó con éteres etílicos y se volvió a disolver en metanol (5 ml). El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trituró en acetato de etilo/hexano al 50% (10 ml) y el sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo/hexano, se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (35 mg, rendimiento del 90%).  
LC/MC: (MH)<sup>+</sup> = 780; (M+Na)<sup>+</sup> = 805

#### Ejemplo 10

##### *Preparación de N<sup>ε</sup>-butiramida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [10]*

Se trató Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [7] (37 mg, 0,05 mmoles) en DMA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/3 ml) a temperatura ambiente con cloruro de butirilo (6,3 mg, 0,06 mmoles) y DIEA (13 mg, 0,1 mmoles). Después de 30 minutos, se añadió éter etílico (50 ml) y se agitó durante 60 minutos. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó con éteres etílicos y se volvió a disolver en metanol (5 ml). El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trituró en acetato de etilo (10 ml). El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (27 mg, rendimiento del 67%).  
LC/MC: (MH)<sup>+</sup> = 808; (M+Na)<sup>+</sup> = 833.

Ejemplo 11*Preparación de N<sup>6</sup>-hexanamida-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [11]*

- 5 Se trató Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [7] (37 mg, 0,05 mmoles) en DMA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/3 ml) a temperatura ambiente con cloruro de hexanoilo (9,0 mg, 0,06 mmoles) y DIEA (13 mg, 0,1 mmoles). Después de 30 minutos, se añadió éter etílico (50 ml) y se agitó durante 60 minutos. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó con éteres etílicos y se volvió a disolver en metanol (5 ml). El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trituró en acetato de etilo/hexano al 50% (10 ml). El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color púrpura (27 mg, 67% de rendimiento).
- 10 LC/MC: (MH)<sup>+</sup>=836; (M+Na)<sup>+</sup>=860

Ejemplo 12

- 15 *Preparación de N<sup>6</sup>-[-(2-amida-2-oxoetoxi) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [12]*

- Se trató Ala-Ala-Asn-PANC-mitomicina [7] (295 mg, 0,4 mmoles) en THF/DMF (4/0,5 ml) con 1,4-dioxano-2,6-diona (70 mg, 0,6 mmoles) y DIEA (60 mg, 0,5 mmoles) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió lentamente éter etílico (10 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min. Se eliminó el solvente y el residuo se trituró y se sonicó en ácido acético al 1% en acetato de etilo. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color oscuro (276 mg, rendimiento del 80%).
- 20 LC/MC: (M-H)<sup>-</sup> = 854

Ejemplo 13

- 25 *Preparación de N<sup>6</sup>-[-(2-amida-2-oxoetoxi)(metil) amino] ácido acético-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [13]*

- Se trató Ala-Ala-Asn-PANC-mitomicina [7] (295 mg, 0,4 mmoles) en THF/DMF (4/0,5 ml) con 4-metilmorfolina-2,6-diona (77 mg, 0,6 mmoles) y DIEA (130 mg, 1,0 mmol) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió lentamente éter etílico (10 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min. Se eliminó el solvente y el residuo se trituró y se sonicó en ácido acético al 1% en acetato de etilo. El sólido se recogió por filtración, se enjuagó concienzudamente con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto de color oscuro (339 mg, rendimiento del 97%).
- 30 LC/MS: (M-H)<sup>-</sup> = 867

Ejemplo 14*Preparación de N<sup>6</sup>-Fmoc-Asn(N-tritilo)-PAB-OH [14]*

- 40 Se agitó una solución de N<sup>6</sup>-Fmoc-Asn(N-tritilo) ((1,49 g, 2,5 mmoles), alcohol p-aminobencílico (0,37 g, 3,0 mmoles) y EEDQ (0,74 g, 3 mmoles) en THF (50 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió una cantidad adicional de EEDQ (0,25 g, 1,0 mmol) y se agitó durante otras 6 horas. La solución de la reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml), se lavó con HCl 0,1 N tres veces y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solución de acetato se filtró a través de un lecho corto de sílice, se enjuagó con acetato de etilo y se concentró hasta la sequedad. El residuo se trituró en éter etílico, se filtró, se enjuagó con éter etílico y se secó al vacío para dar un sólido blanco (1,65 g, rendimiento del 93%).
- 45 LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 702

Ejemplo 15*Preparación de Asn(N-tritilo)-PAB-OH [15]*

- A una solución de N<sup>6</sup>-Fmoc-Asn(N-tritilo)-Pab-OH [14] (1,6 g, 2,28mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) se le añadió DBU (1 ml). La solución de la reacción se agitó durante 15 min. La solución de la reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml), se lavó con salmuera dos veces y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró hasta la sequedad. El residuo se trituró en hexano/éter etílico (1/1). El sólido se recogió por filtración, se enjuagó con éter etílico y se secó al vacío para dar un producto blanco (1 g, rendimiento del 100%).
- 55 LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 480

Ejemplo 16*Preparación de N<sup>6</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn(N-tritilo)-PAB-OH [16]*

- 60 Se agitó una solución de Asn(N-tritilo)-PAB-OH [15] (0,72 g, 1,5 mmoles), N<sup>6</sup>-Fmoc-Ala-Ala [1] (0,57 g, 1,5 mmol), PyBop (0,94 g, 1,8 mmoles) y DIEA (1,17 g, 9,0 mmoles) en NMP (20 ml) a temperatura ambiente durante 1
- 65

hora. A la reacción anterior, se le añadió lentamente una solución acuosa de ácido cítrico al 5% (150 ml) a temperatura de agua con hielo y se agitó durante 2 horas. El precipitado se recogió mediante filtración y se enjuagó con una solución de ácido cítrico al 5%, seguido de agua desalinizada. El sólido se volvió a suspender en solución de NaHCO<sub>3</sub> acuosa, se trituró, se filtró, se enjuagó con agua desalinizada y se secó al vacío sobre KOH para dar un

producto blanco (1,1 g, rendimiento del 87%).  
LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 845

#### Ejemplo 17

##### *Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn(N-tritilo)-PABC-PNP [17]*

Se agitó una solución de reacción de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn(N-tritilo)-PAB-OH [16] (1,1 g, 1,3 mmol), cloroformato de p-nitrofenilo (0,31 g, 1,6 mmol) y piridina (0,13 g, 1,6 mmoles) en THF seco a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió una cantidad adicional de cloroformato de p-nitrofenilo (0,2 g, 1,0 mmol) y piridina (0,08 g, 1,0 mmol) y se agitó durante otras 4 horas. La solución anterior se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con una solución de ácido cítrico al 5% (3 x 100 ml), seguido de salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró hasta la sequedad. El residuo se trituró en éter etílico, se filtró, se enjuagó con éter etílico y se secó al vacío para dar un producto blanquecino (1,1 g, rendimiento del 83%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1010

#### Ejemplo 18

##### *Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-PNP [18]*

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn(N-tritilo)-PABC-PNP [17] (l.Og, 1 mmole) y TIPS (2.5 ml) en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6/24 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. A la solución de la reacción anterior, se le añadió lentamente éter etílico (150 ml) y la suspensión se agitó durante 1 hora. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con éter etílico. El sólido se trituró en acetato de etilo, se filtró, se enjuagó con acetato de etilo y se secó al vacío para dar un producto blanquecino (0,75 g, rendimiento del 97%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 767

#### Ejemplo 19

##### *Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [19]*

Se agitó una solución de reacción de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-PNP [18] (383 mg, 0,5 mmoles), sal de clorhidrato de doxorubicina (348 mg, 0,6 mmoles), HOBT (202 mg, 1,5 mmoles) y DIEA (325 mg, 2,5 mmoles) en DMF seca (5 ml) en un lugar oscuro durante la noche. A la solución anterior, se añadió lentamente ácido cítrico al 5% (100 ml) a temperatura de agua con hielo y se agitó durante 1 hora. El precipitado se recogió por filtración, se enjuagó con ácido cítrico al 5%, seguido de agua desalinizada. El sólido se volvió a suspender en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> y se agitó durante 30 min. Se recogió el sólido, se enjuagó concienzudamente con solución de NaHCO<sub>3</sub>, seguido de agua desalinizada. El sólido se volvió a suspender en isopropanol, metanol/acetato de etilo al 10%, se trituró, se filtró y se secó al vacío para dar un producto rojo oscuro (550 mg, rendimiento del 94%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1171

#### Ejemplo 20

##### *Preparación de Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [20]*

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [19] (500 mg, 0,42 mmoles) en morfolina/NMP al 20% (5 ml) durante 1 hora. A la solución de reacción anterior, se le añadió lentamente éter etílico (50 ml) y la suspensión resultante se agitó durante 30 min. Se vertió el éter etílico (se repitió tres veces). El residuo se trituró en acetato de etilo, metanol/acetato de etilo al 20%. El sólido se recogió por filtración y se secó al vacío. El sólido se volvió a suspender en agua, se sonicó, se filtró y se secó al vacío sobre KOH para dar un producto rojo oscuro (320 mg, rendimiento del 80%).

LC/MC: (MH)<sup>+</sup> = 949

Se usaron métodos similares para la preparación de los Ejemplos 8, 12 y 13 para la preparación de los Ejemplos 21, 22 y 23 a partir del compuesto [20].

#### Ejemplo 21

##### *N<sup>α</sup>-ácido succinámico- Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [21]*

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1049

Ejemplo 22

N<sup>α</sup>-[-(2-amida-2-oxoetoxi) ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [22]

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1065

Ejemplo 23

N<sup>α</sup>-[-(2-amida-2-oxoetoxi)(metil) amino] ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [23]

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1078

Ejemplo 24

Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-camptotecina [24]

A una suspensión de camptotecina (348 mg, 1 mmol) y DAMP (366 mg, 3 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 ml), se le añadió trifosgeno (100 mg, 0,33 mmoles) a temperatura de agua con hielo con agitación. Después de 20 min, se añadió una suspensión de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PAB-OH [2] (459mg, 1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 ml) a la mezcla de la reacción anterior y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mezcla de la reacción resultante se le añadió cloroformato de p-nitrofenilo (100 mg, 0,5 mmoles), seguido de una cantidad adicional de DAMP (60 mg, 0,5 mmoles) y la mezcla de la reacción se agitó durante otras 4 horas. Después de la concentración, el residuo resultante se trituró con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo al 25%, se filtró, se enjuagó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo al 25% y se secó al vacío. El sólido se suspendió en NaHCO<sub>3</sub> acuoso, se sonicó, se filtró, se enjuagó concienzudamente con una NaHCO<sub>3</sub> acuoso, seguido de ácido cítrico al 5%, agua desalinizada y se secó al vacío sobre KOH para dar un producto amarillento (763 mg, rendimiento del 91%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 834

Ejemplo 25

Preparación de Asn-PABC-camptotecina [25]

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Asn-PABC-camptotecina [24] (500 mg, 0,6 mmoles) en DBU/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 2% (15 ml) durante 20 min. Se añadió lentamente éter etílico (80 ml) a la solución de la reacción anterior y se agitó durante 30 min. El precipitado se trituró, se recogió por filtración y se enjuagó concienzudamente con éter etílico. El sólido se volvió a triturar en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo al 20%, se filtró y se secó. El sólido se volvió a suspender en NaHCO<sub>3</sub> acuoso, se trituró, se filtró, se enjuagó con agua desalinizada y se secó al vacío sobre KOH para dar un producto de color amarillento (295 mg, rendimiento del 80%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 612

Ejemplo 26

Preparación de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [26]

Se agitó una solución de H<sub>2</sub>N-Asn-PABC-camptotecina [25] (244 mg, 0,4 mmol), N<sup>α</sup>-Ala-Ala [1] (190 mg, 0,5 mmol), PyBop (260 mg, 0,5 mmol) y DIEA (325 mg, 2,5 mmoles) en NMP (5 ml) durante 1 hora. A la solución de la reacción anterior se le añadió lentamente ácido cítrico al 5% (50 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 30 min. El precipitado se recogió por filtración, se enjuagó con ácido cítrico al 5%, seguido de agua desalinizada y se secó al vacío sobre KOH. El sólido se trituró en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo al 15%, se sonicó, se filtró y se secó para dar un producto gris (274 mg, rendimiento del 70%).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 976

Ejemplo 27

Preparación de Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [27]

Se agitó una solución de N<sup>α</sup>-Fmoc-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [26] (487 mg, 0,5 mmoles) en DBU/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 2% (10 ml) durante 10 min. A la solución de la reacción anterior, se le añadió lentamente éter etílico (50 ml) y se agitó durante 30 min. Se recogió el precipitado y se enjuagó con éter. El sólido se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetato de etilo al 20%, se trituró, se filtró, se enjuagó con acetato de etilo y se secó para dar un producto de color gris (290 mg, 77% de rendimiento).

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 754

Se usaron métodos similares para la preparación de los Ejemplos 8, 12 y 13 para la preparación de los

Ejemplos 28, 29 y 30 a partir del compuesto [27].

#### Ejemplo 28

5 *N<sup>α</sup>*-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [28]

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 854

#### Ejemplo 29

10

*N<sup>α</sup>*-[-(2-amida-2-oxoetoxi)ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [29]

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 870

15 Ejemplo 30

*N<sup>α</sup>*-[-(2-amida-2-oxoetoxi)(metil)amino]ácido acético]-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina [30]

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 883

20

#### Ejemplo 31

*Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>4</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina-succinamida [31]*

25

Se agitó una solución de *N<sup>α</sup>*-ácido succinámico-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina [8] (85 mg, 0,1 mmole), Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina [20] (104 mg, 0,11 mmoles), PyBop (62 mg, 0,12 mmoles) y DIEA (78 mg, 0,6 mmoles) en NMP (2 ml) durante 1 hora. Se añadió éter etílico (20 ml) y la mezcla resultante se agitó y se sonicó. Se vertió el éter (se repitió dos veces) y se trituró el residuo en metanol, se filtró y se secó para dar un producto de color oscuro (100 mg, rendimiento del 57%)

30 LC/MS: (MH)<sup>+</sup>=1770

#### Ejemplo 32

*Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina-bis(O<sup>a</sup>)-acetamida [32]*

35

Se usaron métodos similares a los de la preparación del Ejemplo 31 para la preparación del Ejemplo 32, a partir del compuesto [20] y el compuesto [12].

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1786

40 Ejemplo 33

*Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-doxorubicina-bis(N<sup>α</sup>-metil) -acetamida [33]*

45 Se usaron métodos similares a los de la preparación del Ejemplo 31 para la preparación del Ejemplo 33, a partir del compuesto [20] y el compuesto [13].

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1799

#### Ejemplo 34

50 *Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>4</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-succinamida [34]*

Se usaron métodos similares a los de la preparación del Ejemplo 31 para la preparación del Ejemplo 34, a partir del compuesto [27] y el compuesto [8].

LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1575

55

#### Ejemplo 35

*Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-bis(O<sup>a</sup>)-acetamida [35]*

60 Se usaron métodos similares a los de la preparación del Ejemplo 31 para la preparación del Ejemplo 34, a partir del compuesto [27] y el compuesto [12].

LC/MS: (MH)<sup>+</sup>=1591

#### Ejemplo 36

65

*Preparación de N<sup>1</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-mitomicina, N<sup>5</sup>-Ala-Ala-Asn-PABC-camptotecina-bis(N<sup>1</sup>-metil)-acetamida [36]*

Se usaron métodos similares a los de la preparación del Ejemplo 31 para la preparación del Ejemplo 34, a partir del compuesto [27] y el compuesto [13].

5 LC/MS: (MH)<sup>+</sup> = 1604

Abreviaturas usadas en los ejemplos:

10 DCC = diciclohexilcarbodiimida  
 DCM = diclorometano  
 DCU = diciclohexilurea  
 DIEA = diisopropiletilamina  
 DMA = dimetilacetamida  
 15 DMEM = medio de Eagle modificado de Dulbecco  
 DMF = N,N-dimetilformamida  
 DMSO = dimetilsulfóxido  
 EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida  
 EDTA = N,N',N'',N''',N''''-ácido etilendiaminotetraacético  
 20 FBS = suero fetal bovino  
 Fmoc = fluorenilmetoxicarbamoilo  
 HATU = hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido  
 HOBT = N-hidroxibenzotriazol  
 HPLC = cromatografía líquida de alta presión  
 IR = espectroscopia infrarroja  
 25 LC/MS = cromatografía líquida/espectrometría de masas  
 MS = espectrometría de masas  
 MTD = dosis máxima tolerada  
 NMP = N-metilpirrolidinona  
 NMR = resonancia magnética nuclear  
 30 PABC = *p*-aminobencilcarbamoilo  
 PBS = solución salina tamponada con fosfato  
 Py = piridina  
 QW = por semana  
 TCA = ácido tricloroacético  
 35 Tr = tritilo, trifenilmetilo  
 UV/VIS = espectroscopia ultravioleta/visible

40

45

50

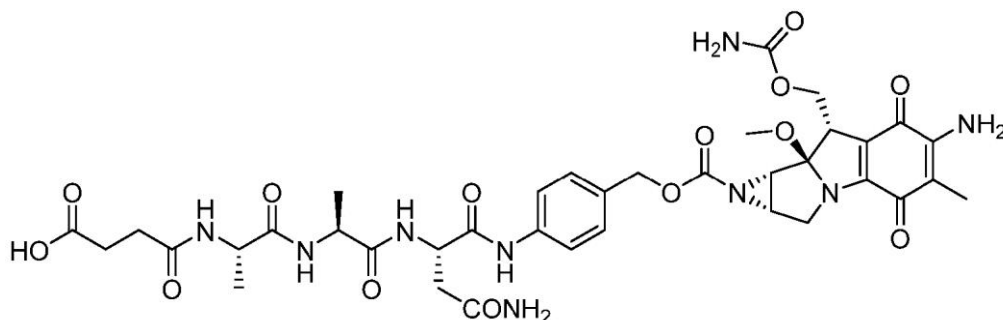
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado péptido-fármaco que es:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende por lo menos un conjugado péptido-fármaco de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, envasada como una o más dosificaciones individuales.

4. Un conjugado péptido-fármaco de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar un cáncer en un mamífero.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para su uso en un método para tratar cáncer en un mamífero.

6. El conjugado péptido-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es un tumor sólido.

7. El conjugado péptido-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de intestino, cáncer de piel o cáncer de próstata.

8. El conjugado péptido-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es cáncer de colon.

9. El conjugado péptido-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, 6, 7 u 8, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, 6, 7, u 8, en donde el conjugado péptido-fármaco se usa en combinación con otros agentes terapéuticos.

10. El conjugado péptido-fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, 6, 7 u 8, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, 6, 7, u 8, en donde el conjugado péptido-fármaco se usa en combinación con radioterapia.

Fig. 1

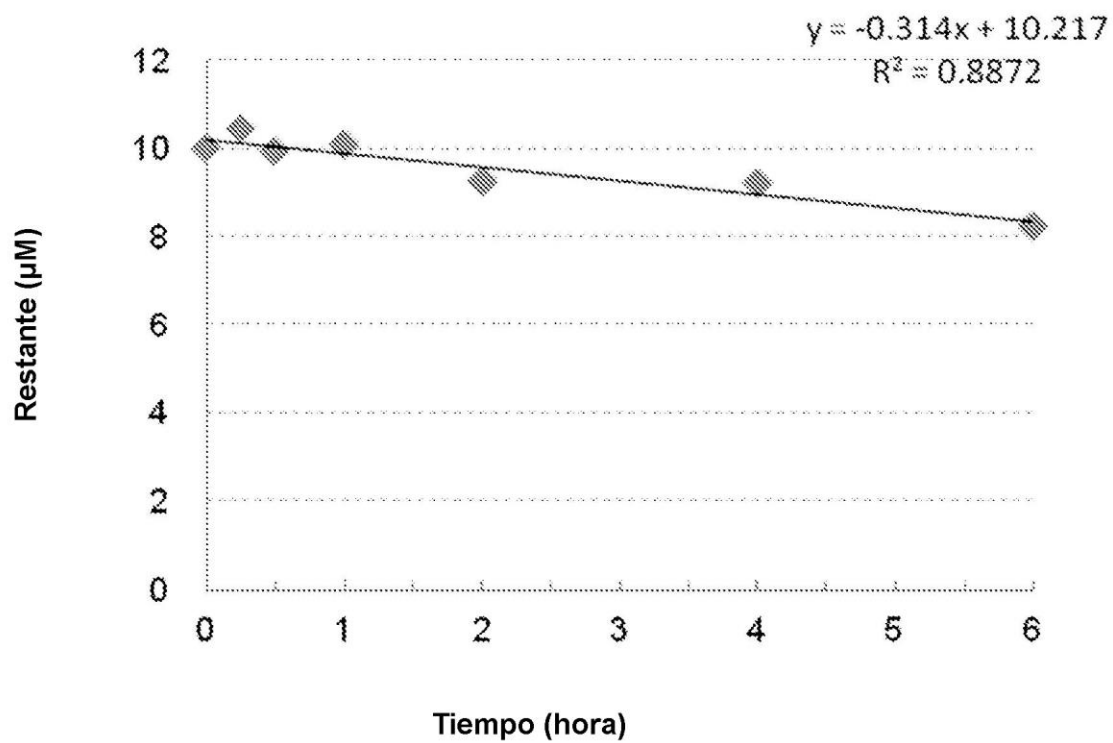




Fig. 2

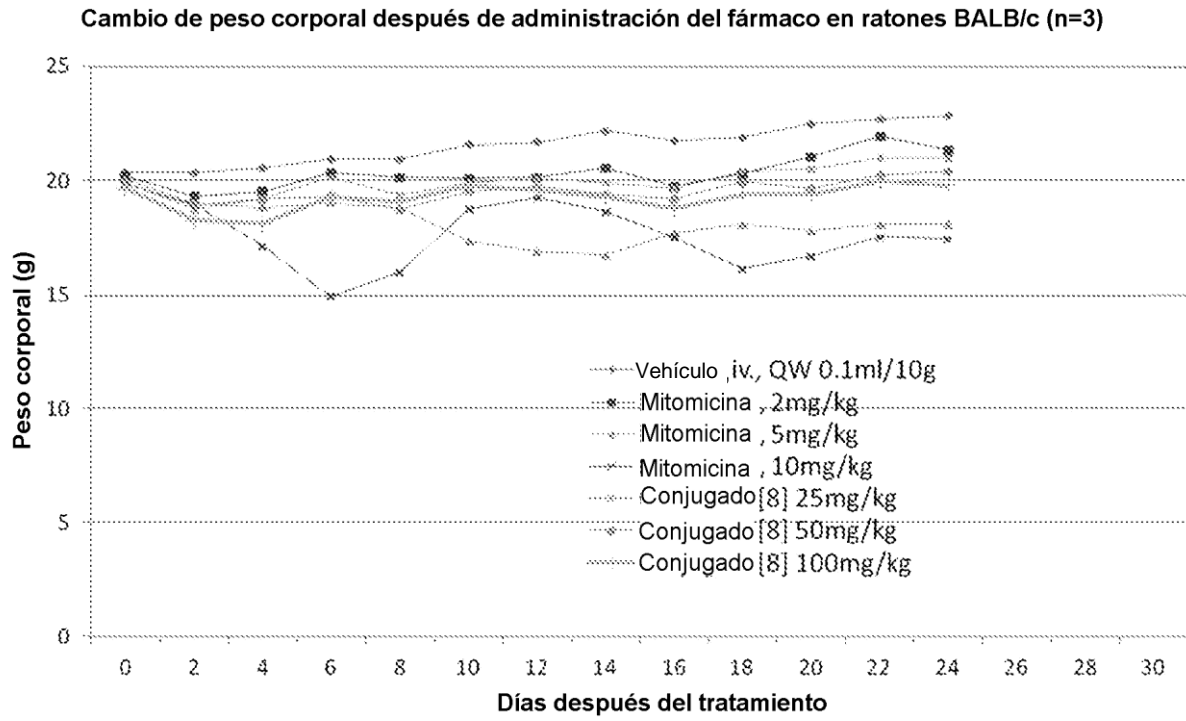


Fig. 3

