

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 618**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/02** (2006.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2018 PCT/US2018/063376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019 WO19108974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2018 E 18822212 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023 EP 3717503**

54 Título: **Profármacos de derivados de auristatina E que se unen a la albúmina**

30 Prioridad:

**30.11.2017 US 201762592721 P**

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

**29.05.2024**

73 Titular/es:

**LADRX CORPORATION (100.0%)  
11726 San Vicente Blvd., Suite 650  
Los Angeles, CA 90049, US**

72 Inventor/es:

**KRATZ, FELIX;  
ABU AJAJ, KHALID;  
WARNECKE, ANNA;  
NOLLMANN, FRIEDERIKE I.;  
KOESTER, STEPHAN DAVID;  
GARCIA FERNANDEZ, JAVIER;  
PES, LARA;  
WALTER, HEIDI-KRISTIN;  
MAGNUSSON, JOHANNES PALL;  
CHERCHEJA, SERGHEI;  
PEREZ GALAN, PATRICIA;  
MEDDA, FEDERICO y  
DAUM, STEFFEN JOSEF**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 970 618 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

Profármacos de derivados de auristatina E que se unen a la albúmina

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE. UU. 62/592.721 presentada el 30 de noviembre de 2017.

**Antecedentes**

- 10 Los fármacos antineoplásicos de bajo peso molecular suelen tener un margen terapéutico restringido que limita su eficacia clínica. Estos compuestos de bajo peso molecular muestran una alta tendencia a penetrar en los tejidos corporales por difusión, produciendo una biodistribución uniforme. Por lo tanto, solo llegan al lugar de acción pequeñas cantidades del fármaco y, debido a la distribución sobre los tejidos sanos del cuerpo, dichos fármacos dan lugar a efectos secundarios problemáticos.

- 15 Estas desventajas son particularmente críticas para aquellos fármacos que son altamente citotóxicos y tienen un margen terapéutico muy limitado. Las auristatinas son fármacos a base de péptidos que se unen a la tubulina, y los ejemplos representativos como la dolastatina 10, dolastatina 15, auristatina PE, auristatina E o la auristatina F presentan efectos altamente citotóxicos. En los ensayos clínicos de fase 1 y 2 con dolastatina 10, la dolastatina 15 y la auristatina PE han dado lugar a una toxicidad sistémica inaceptable, así como a una falta de actividad antitumoral, por lo que se suspendieron (E. A. Perez *et al.*, *Invest. New Drugs*, 23:257-261 (2005); M. von Mehren *et al.*, *Sarcoma*, 8:107-111 (2004); R. S. Marks *et al.*, *Am. J. Clin. Oncol.*, 26:336-337 (2003)).

- 20 La administración de fármacos en oncología es un enfoque que tiene el potencial de aumentar el limitado índice terapéutico de los agentes altamente citotóxicos. En la mayoría de los sistemas de administración de fármacos, el fármaco citotóxico se une al portador a través de un espaciador que incorpora un punto de ruptura predeterminado que permite que el fármaco unido se libere en el sitio diana celular (F. Kratz *et al.*, *ChemMedChem*, 3:20-53 (2008)).

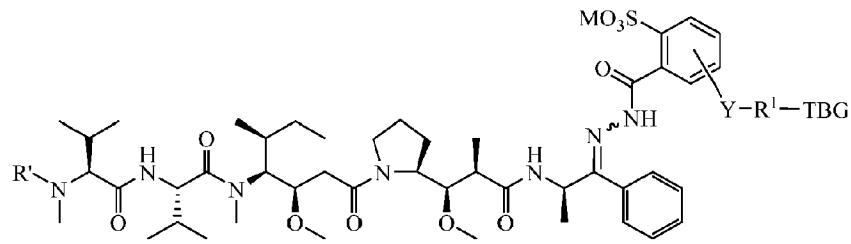
- 30 La albúmina o sus conjugados farmacológicos presentan una semivida marcadamente prolongada en la circulación sistémica de hasta 19 días. Un enfoque especialmente atractivo es desarrollar profármacos de agentes altamente citotóxicos que se unan covalentemente a la albúmina sérica circulante que sirve como portador macromolecular tras su administración. Debido a 1.) una permeabilidad elevada de las macromoléculas a través de las paredes de los vasos malignos, del tejido infectado o inflamado junto con un sistema de drenaje linfático intacto y 2.) la expresión de proteínas que se unen a la albúmina en los endotelios tumorales y dentro del intersticio tumoral, los conjugados de albúmina-fármaco transportan la sustancia terapéuticamente eficaz al sitio diana (es decir, al tumor) donde se libera el agente altamente citotóxico (documento US 7.387.771; F. Kratz, *J. Control. Release*, 132: 171-183 (2008); F. Kratz, U. Beyer, *Drug Delivery*, 5:281-299 (1998)). K. Temmings, *Bioconj. Chem.*, 17: 1385-1394 (2006) divulga auristatinas unidas a la albúmina.

- 40 Sin embargo, al diseñar sistemas de administración de fármacos con agentes altamente citotóxicos, se debe lograr un equilibrio fundamental entre preservar las propiedades dirigidas del portador del fármaco y, al mismo tiempo, permitir una liberación controlada del fármaco citotóxico y evitar su liberación prematura en la circulación sanguínea o de manera sistemática. Los sistemas de administración de fármacos sensibles a los ácidos deberían tener suficiente estabilidad en el torrente circulatorio y, aún así, permitir una liberación eficaz del fármaco en el sitio del tumor de una manera dependiente del pH (F. Kratz *et al.*, *ChemMedChem*, 3:20-53 (2008)).

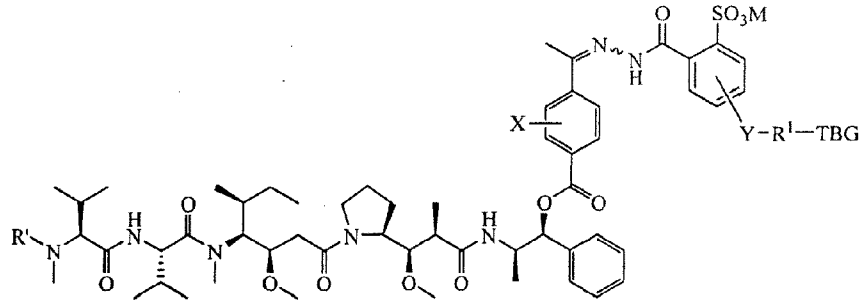
- 50 Para los fármacos altamente citotóxicos con valores de  $Cl_{50}$  contra células tumorales en el intervalo picomolar, como la clase de auristatinas a base de péptidos de bajo peso molecular, que no pueden administrarse debido a su insolubilidad en agua y su margen terapéutico muy limitado, existe la necesidad de sistemas eficaces de administración y liberación de fármacos para lograr una administración y liberación más eficaz y controlada de estos fármacos tan potentes. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas más eficaces y/o más tolerables de profármacos de derivados de auristatina E que se unen a la albúmina que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades malignas.

**55 Sumario**

La presente divulgación proporciona un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o II:



Fórmula I



Fórmula II

5

o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero E (del alemán *entgegen* = opuesto), isómero Z (del alemán *zusammen* = juntos), enantiómero R, enantiómero S, diastereómero, isómero (D), isómero (L), estereoisómero, mezclas racémicas u otras mezclas de los mismos; en donde:

10

R' es H o -CH<sub>3</sub>,

M es H o un contraión farmacéuticamente aceptable;

Y está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O- y -O-C(O)-;

15

R<sup>1</sup> está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido, en donde opcionalmente hasta seis átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están sustituidos cada uno independientemente con -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; X es H o se selecciona entre halógeno (p. ej., -F, -Cl, -Br o -I), -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, -OR<sup>2</sup>, -NHCOR<sup>2</sup> y -OCOR<sup>2</sup>, en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan cada uno independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

20

TBG es un grupo de unión a tiol seleccionado entre un grupo maleimida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetamida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetato opcionalmente sustituido, un grupo piridiltio opcionalmente sustituido, un grupo isotiocianato opcionalmente sustituido, un grupo vinilcarbonilo opcionalmente sustituido, un grupo aziridina opcionalmente sustituido, un grupo disulfuro opcionalmente sustituido y un grupo acetileno opcionalmente sustituido.

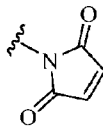
25

En algunas realizaciones, R' es -CH<sub>3</sub>. En otras realizaciones, R' es H.

En algunas realizaciones, TBG se selecciona entre un grupo maleimida opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, TBG es un grupo maleimida de fórmula:

30



En algunas realizaciones, Y es -NH-C(O)-.

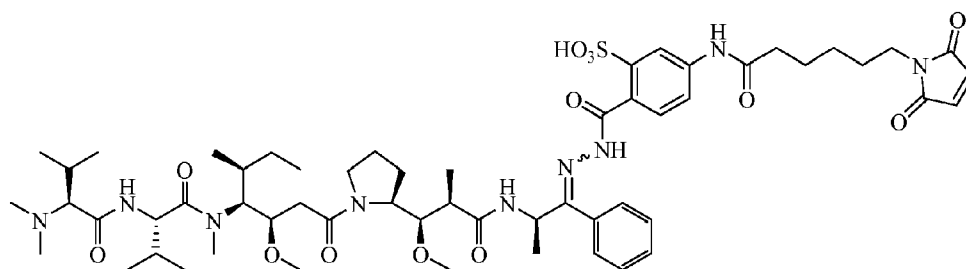
35

En algunas realizaciones, M es H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> opcionales sustituido. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>.

40

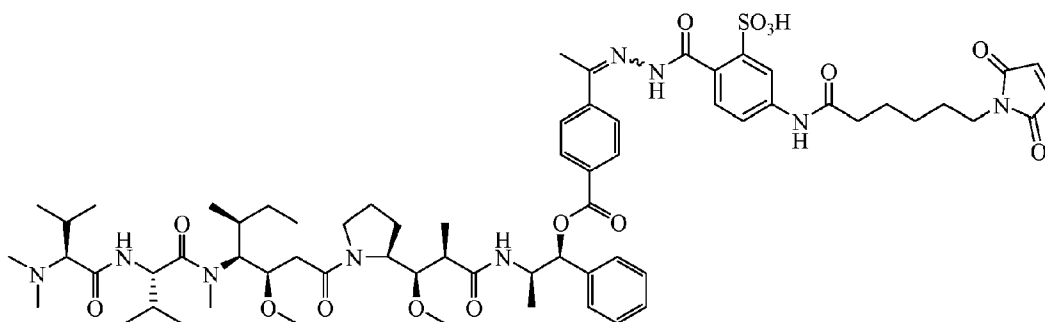
En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto que tiene la estructura de Fórmula III:



Fórmula III

En otras realizaciones, la divulgación proporciona un compuesto que tiene la estructura de Fórmula IV:

5



Fórmula IV

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se divulga en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona entre uno o más de un agente solubilizante, un agente encapsulante y un lioprotector. En otras realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable comprende uno o más de dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina y trimetil-β-ciclodextrina.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la composición, cuando se administra por vía intravenosa a un paciente, se une covalentemente de manera selectiva y rápida *in situ* a la albúmina endógena en la circulación sanguínea. En otras realizaciones, la composición, cuando se administra por vía intravenosa a un paciente, se une covalentemente de manera selectiva y rápida *in situ* a un grupo tiol de cisteína-34 de albúmina endógena en la circulación sanguínea.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad seleccionada entre cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos y otros microorganismos, que comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y se selecciona entre carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y melanoma. En algunas realizaciones, la administración es administración intravenosa.

La presente divulgación también proporciona un método para reducir la citotoxicidad de un compuesto que comprende administrar un compuesto o una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento a un paciente que lo necesita, en donde la administración produce una reducción de la citotoxicidad en comparación con una dosis equivalente de agente activo no modificado.

La presente divulgación proporciona además un método para aumentar la concentración de un metabolito de un compuesto en un tumor, que comprende la administración de un compuesto o una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento a un paciente que lo necesite, en donde el aumento se compara con una dosis equivalente de agente activo no modificado.

La presente divulgación proporciona un compuesto divulgado en el presente documento para usar como fármaco.

La presente divulgación también proporciona un compuesto como se divulga en el presente documento para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos u otros microorganismos.

45

La presente divulgación proporciona además el uso de un compuesto o una composición como se divulga en el presente documento en la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada entre cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos u otros microorganismos.

- 5
- Breve descripción de los dibujos**
- 10 La Figura 1 compara la estabilidad de AE-Ceto-Sulf07 (gráfica (a)) y AE-Ceto-EMCH (gráfica (b)) en el tampón de reconstitución (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,65, sacarosa al 5 % (p/v) y 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 2 % (2-HPβCD (p/v)).
- 15 La Figura 2 compara la estabilidad de AE-Éster-Sulf07 (gráfica (a)) y AE-Éster-EMCH (gráfica (b)) en el tampón de reconstitución (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,65, sacarosa al 5 % (p/v) y 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 4 % (2-HPβCD, (p/v)).
- La Figura 3 muestra la conjugación de AE-Ceto-Sulf07 con albúmina en plasma humano.
- La Figura 4 muestra la conjugación de AE-Éster-Sulf07 con albúmina en plasma humano.
- 20 La Figura 5 muestra la cinética de unión de AE-Ceto-Sulf07 a la albúmina en plasma humano.
- La Figura 6 muestra la cinética de unión de AE-Ceto-Sulf07 a albúmina en plasma murino.
- La Figura 7 muestra la cinética de unión de AE-Ceto-Sulf07 a albúmina en plasma de rata.
- 25 La Figura 8 muestra la cinética de unión de AE-Éster-Sulf07 a albúmina en plasma humano.
- La Figura 9 muestra la cinética de unión de AE-Éster-Sulf07 a albúmina en plasma murino hasta que se alcanzó el límite de cuantificación (LOQ) para el fármaco.
- 30 La Figura 10 muestra la cinética de unión de AE-Éster-Sulf07 a albúmina en plasma de rata hasta que se alcanzó el LOQ para el fármaco.
- La Figura 11 muestra la liberación dependiente del pH de AE-Ceto (pH 7,4 (gráfica (a)) y pH 4,1 (gráfica (b)) de AE-Ceto-Sulf07 unido a albúmina humana.
- 35 La Figura 12 muestra la liberación dependiente del pH de AE-Éster (pH 7,4 (gráfica (a)) y pH 4,1 (gráfica (b)) de AE-Éster-Sulf07 unido a albúmina humana.
- 40 La Figura 13 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de cáncer de melanoma maligno A375, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~134 mm<sup>3</sup>.
- 45 La Figura 14 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de cáncer de melanoma maligno A375, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~332 mm<sup>3</sup>.
- La Figura 15 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFA737, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~132 mm<sup>3</sup>.
- 50 La Figura 16 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFA737, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~330 mm<sup>3</sup>.
- 55 La Figura 17 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de carcinoma de ovario humano A2780, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~148 mm<sup>3</sup>.
- 60 La Figura 18 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Ceto-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de carcinoma de ovario humano A2780, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~351 mm<sup>3</sup>.
- 65 La Figura 19 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Éster-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de cáncer de células renales RXF631, siendo el volumen inicial del tumor de ~140 mm<sup>3</sup>.

La Figura 20 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Éster-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de cáncer de melanoma maligno A375, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~332 mm<sup>3</sup>.

5 La Figura 21 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Éster-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFA737, siendo la mediana del volumen tumoral inicial promedio de ~132 mm<sup>3</sup>.

10 La Figura 22 muestra el efecto antitumoral de auristatina E y AE-Éster-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de carcinoma de ovario humano A2780, siendo el volumen inicial del tumor de ~351 mm<sup>3</sup>.

La Figura 23 muestra el efecto antitumoral de AE-Éster-Sulf07, en comparación con el grupo de control en el modelo de carcinoma de ovario humano A2780, siendo el volumen inicial del tumor de ~148 mm<sup>3</sup>.

15 La Figura 24 muestra la degradación acelerada de formulaciones de auristatina liofilizada como la comparación de la estabilidad de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Ceto-EMCH.

20 La Figura 25 muestra la degradación acelerada de formulaciones de auristatina liofilizada como la comparación de la estabilidad de AE-Éster-Sulf07 y AE-Éster-EMCH.

### Descripción detallada

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente solicitud tendrán los significados que entiende normalmente la persona normalmente experta en la materia. En general, la nomenclatura relativa a técnicas de química, biología molecular, biología celular y del cáncer, inmunología, microbiología, farmacología y química de proteínas, que se describen en el presente documento, son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

### Definiciones

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprende" o sus variaciones, tal como "comprenden" o "que comprende", implica la inclusión de un número entero (o componente) indicado o un grupo de números enteros (o componentes) indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero (o componente) o grupo de números enteros (o componentes).

A lo largo de la solicitud, cuando se describe que un compuesto o composición tiene, incluye o comprende, componentes específicos, se contempla que dicho compuesto o composición también puede consistir esencialmente en, o consistir en, los componentes citados. Análogamente, cuando se describe que los métodos o procesos tienen, incluyen o comprenden etapas de proceso específicas, los procesos también pueden consistir esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, debe entenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar determinadas acciones es irrelevante siempre que los compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento sigan operativos. Asimismo, se pueden realizar dos o más etapas o acciones simultáneamente.

Las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen los plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "que incluye" se utiliza para significar "que incluye pero no limitado a". "Que incluye" y "que incluye pero no limitado a" se utilizan indistintamente.

El término "o" como se usa en el presente documento debe entenderse como "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Las expresiones "fármaco", "agente", "agente terapéutico", "agente terapéuticamente activo", "agente o fármaco citotóxico", "agente o fármaco altamente citotóxico" o "sustancia terapéuticamente eficaz" se utilizan para referirse a cualquier compuesto que produce un efecto farmacológico por sí solo o después de su conversión en el organismo en cuestión y, por tanto, también incluye los derivados de estas conversiones. El efecto farmacológico de los fármacos de la composición de acuerdo con la presente divulgación puede ser un único efecto, p. ej. un efecto citostático y/o citotóxico, o un amplio espectro de acciones farmacológicas, tal como un efecto inmunosupresor y antiflogístico al mismo tiempo.

Los términos "paciente" "sujeto", o "individuo" se usan de manera intercambiable y se refieren a un ser humano o a un animal no humano. Estos términos incluyen mamíferos como los seres humanos incluyen humanos, primates, animales de ganado (p. ej., bovinos y porcinos), animales de compañía (p. ej., caninos y felinos) y roedores (p. ej., ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el paciente o sujeto es un paciente o sujeto humano, como, por ejemplo, un paciente humano que tiene una afección que necesita tratamiento.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto animal, incluidos los seres humanos y mamíferos, p. ej., junto con uno o más portadores, excipientes o disolventes farmacéuticamente aceptables. Una composición de este tipo también puede contener diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, protectores y otros materiales bien conocidos en la materia. En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica abarca una composición que comprende el (los) principio(s) activo(s) y el (los) ingrediente(s) inerte(s) que constituyen el excipiente, portador o diluyente, así como cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de dos o más ingredientes cualesquiera o de la disociación de uno o más de los ingredientes o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación abarcan cualquier composición preparada mezclando un compuesto de la divulgación y uno o más excipientes, portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador no tóxico que puede administrarse a un paciente, junto con una sustancia terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento, y que no destruye la actividad farmacológica del agente. El término "excipiente" se refiere a un aditivo en una formulación o composición que no es un principio farmacéuticamente activo. En determinadas realizaciones, una sustancia "farmacéuticamente aceptable" es adecuada para usar en contacto con células, tejidos u órganos de animales o seres humanos sin provocar en un grado excesivo toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otras reacciones adversas, en la cantidad utilizada en la forma farmacéutica de acuerdo con la pauta posológica y proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. En determinadas realizaciones, una sustancia "farmacéuticamente aceptable" que es un componente de una composición farmacéutica es, adicionalmente, compatible con el (los) otro(s) ingrediente(s) de la composición. En determinadas realizaciones, las expresiones "excipiente farmacéuticamente aceptable", "portador farmacéuticamente aceptable" y "diluyente farmacéuticamente aceptable" abarcan, sin limitación, ingredientes inactivos farmacéuticamente aceptables, materiales, composiciones y vehículos, tales como cargas líquidas, cargas sólidas, diluyentes, excipientes, portadores, disolventes y materiales encapsulantes. Los portadores, diluyentes y excipientes también incluyen todos los medios de dispersión farmacéuticamente aceptables, recubrimientos, tampones, agentes isotónicos, estabilizantes, agentes retardantes de la absorción, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, adyuvantes, etc. Salvo en la medida en que cualquier excipiente, soporte o diluyente convencional sea incompatible con el principio activo, la presente divulgación abarca el uso de excipientes, portadores y diluyentes convencionales en composiciones farmacéuticas. Véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.<sup>a</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins (Filadelfia, Pensilvania, 2005); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5.<sup>a</sup> Ed., Rowe *et al.*, Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association (2005); Handbook of Pharmaceutical Additives, 3.<sup>a</sup> Ed., Ash and Ash, Eds., Gower Publishing Co. (2007); y Pharmaceutical Preformulation and Formulation, Gibson, Ed., CRC Press LLC (Boca Raton, Florida, 2004).

Las expresiones "cantidad farmacéuticamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad eficaz para tratar una enfermedad en un paciente, p. ej., efectuar una modificación beneficiosa y/o deseable en la salud general de un paciente que padece una enfermedad (p. ej., cáncer), tratamiento, curación, inhibición o mejora de una respuesta o condición fisiológica, etc. El efecto terapéutico completo no tiene que producirse necesariamente tras la administración de una dosis, y se puede producir tras la administración de una serie de dosis. Por tanto, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones. La cantidad eficaz precisa necesaria para un sujeto dependerá de, por ejemplo, el tamaño, salud y edad, naturaleza y extensión de la enfermedad, agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración, y el modo de administración. El profesional experimentado puede determinar fácilmente la cantidad eficaz para una situación dada mediante experimentación rutinaria. El profesional experimentado reconocerá que el tratamiento del cáncer incluye, pero no está limitado a, destruir células cancerosas, prevenir el crecimiento de nuevas células cancerosas, provocar la regresión del tumor (una disminución en el tamaño del tumor), provocar una disminución de la metástasis, mejorar las funciones vitales de un paciente, mejorar el bienestar del paciente, disminuir el dolor, mejorar el apetito, mejorar el peso del paciente y cualquier combinación de los mismos. Las expresiones "cantidad farmacéuticamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" también se refieren a la cantidad necesaria para mejorar los síntomas clínicos de un paciente. Los métodos terapéuticos o métodos de tratamiento del cáncer descritos en el presente documento no deben interpretarse ni limitarse de otro modo a "curar" el cáncer.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" incluye invertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos y patología subyacente de una afección de una manera tal que mejore o establezca una afección de un sujeto. Como se usa en el presente documento y se entiende bien en la técnica, el "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, aunque no de forma limitativa, el alivio, la mejora o la ralentización de la progresión, de uno o más síntomas o estados asociados con una afección, p. ej., cáncer, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del cuadro patológico, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o el alivio de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En el presente documento, se describen resultados clínicos beneficiosos ilustrativos.

"Administrar" o "administración de" una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto se puede llevar a cabo usando uno de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede administrar un compuesto o un agente, por vía intravenosa, por vía arterial, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía ocular, por vía sublingual, por vía oral (mediante ingestión), por vía intranasal (mediante inhalación), por vía intramedular, por vía intracerebral y por vía transdérmica (mediante absorción, p. ej., a través de un conducto cutáneo). También se puede introducir de manera apropiada un compuesto o agente mediante dispositivos recargables o biodegradables u otros dispositivos, p. ej., parches y bombas o formulaciones, que permiten la liberación prolongada, lenta o controlada del compuesto o agente. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados. En algunos aspectos, la administración incluye tanto la administración directa, incluida la autoadministración, y la administración indirecta, incluido el acto de prescribir un fármaco. Por ejemplo, como se utiliza en el presente documento, un médico que da instrucciones a un paciente para que se autoadministre un fármaco o para que otro se lo administre y/o que proporcione a un paciente una receta para un fármaco está administrando el fármaco al paciente. Cuando un método es parte de un régimen terapéutico que incluye más de un agente o modalidad de tratamiento, la divulgación contempla que los agentes pueden administrarse en el mismo momento o en momentos diferentes y mediante las mismas o diferentes vías de administración. Los métodos apropiados de administrar una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto también dependerán, por ejemplo, de la edad del sujeto, si el sujeto está activo o inactivo en el momento de la administración, si el sujeto tiene un deterioro cognitivo en el momento de la administración, el alcance del deterioro y las propiedades químicas y biológicas del compuesto o agente (p.ej., solubilidad, digestibilidad, biodisponibilidad, estabilidad y toxicidad).

El término "sustituido" se refiere a las moléculas que tienen sustituyentes que reemplazan a un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal de un compuesto químico. Se entenderá que el término "sustitución" o la expresión "sustituido con" incluyen la condición implícita de que cada sustitución esté conforme con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente, y de que la sustitución de como resultado un compuesto estable, p. ej., que no sufre transformación espontánea, tal como reordenamiento, ciclación, eliminación, etc. Como se utiliza en el presente documento, se contempla que el término "sustituido" incluya todos los sustituyentes admisibles de los compuestos orgánicos. En un amplio aspecto, los sustituyentes admisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes admisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferente para los compuestos orgánicos adecuados. A efectos de la presente divulgación, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente admisible de compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o tioformiato), un alcóxilo, un alquiltio, un aciloxi, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo o un resto aromático (p. ej., arilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) o heteroaromático (p. ej., heteroarilo).

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita a continuación puede suceder o no, de modo que la solicitud incluye casos en los que tiene lugar la circunstancia y casos en los que no. Por ejemplo, la expresión "opcionalmente sustituido" significa que un sustituyente distinto de hidrógeno puede o no estar presente en un átomo dado, y, por tanto, la solicitud incluye estructuras en las que está presente un sustituyente distinto de hidrógeno y estructuras en las que no está presente un sustituyente distinto de hidrógeno.

A menos que se indique específicamente como "no sustituido", se entiende que las referencias a las moléculas químicas en el presente documento incluyen las variantes sustituidas. Por ejemplo, la referencia a un grupo o resto "alquilo" incluye implícitamente variantes tanto sustituidas como no sustituidas. Algunos ejemplos de sustituyentes en los restos químicos incluyen, pero sin limitación, un resto de halógeno, hidroxilo, carbonilo (tal como carboxilo, alcóxicarbonilo, formilo o acilo), tiocarbonilo (tal como tioéster, tioacetato o tioformiato), alcóxilo, alquiltio, aciloxi, fosforilo, fosfato, fosfonato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, alquiltio, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterociclilo, aralquilo o arilo o heteroarilo.

"Arilo" indica un anillo de carbono aromático que tiene el número indicado de átomos de carbono, por ejemplo, de 6 a 12, o de 6 a 10 átomos de carbono, en el anillo. Los grupos arilo pueden ser monocíclicos o policíclicos (p. ej., bicíclico, tricíclico). En algunos casos, ambos anillos de un grupo arilo policíclico son aromáticos (p. ej., naftilo). En otros casos, los grupos arilo policíclicos pueden incluir un anillo no aromático (p. ej., cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo, heterocicloalqueno) condensados a un anillo aromático, siempre que el grupo arilo policíclico esté unido a la estructura original mediante un átomo en el anillo aromático. Por tanto, un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftalen-5-ilo (en donde el resto está unido a la estructura original mediante un átomo de carbono aromático) se considera un grupo arilo, mientras que 1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ilo (en donde el resto está unido a la estructura original mediante un átomo de carbono no aromático) no se considera un grupo arilo. Análogamente, un grupo 1,2,3,4-tetrahidroquinolin-8-ilo (en donde el resto está unido a la estructura original mediante un átomo de carbono aromático) se considera un grupo arilo, mientras que el grupo 1,2,3,4-tetrahidroquinolin-1-ilo (en donde el resto está unido a la estructura original mediante un átomo de nitrógeno no aromático) no se considera un grupo arilo. Sin embargo, el término "arilo" no

abarca ni se superpone con "heteroarilo", como se define en el presente documento, independientemente del punto de unión (p. ej., tanto quinolin-5-ilo como quinolin-2-ilo son grupos heteroarilo).

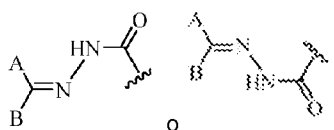
"Heteroarilo" indica un anillo aromático que contiene el número indicado de átomos del anillo (p. ej., heteroarilo de 5 a 12, o de 5 a 10 miembros) formado por uno o más heteroátomos (p. ej., 1, 2, 3 o 4 heteroátomos) seleccionados entre N, O, y S, y siendo los átomos restantes del anillo carbono. El heteroarilo de 5 miembros es un heteroarilo que tiene 5 átomos en el anillo. El heteroarilo de 6 miembros es un heteroarilo que tiene 6 átomos en el anillo. Los grupos heteroarilo no contienen átomos de S y O adyacentes. En algunas realizaciones, el número total de átomos de S y O en el grupo heteroarilo no es superior a 2. En algunas realizaciones, el número total de átomos de S y O en el grupo heteroarilo no es superior a 1. Salvo que se indique lo contrario, los grupos heteroarilo pueden estar unidos a la estructura original mediante un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Por ejemplo, "piridilo" incluye grupos 2-piridilo, 3-piridilo y 4-piridilo, y "pirrolilo" incluye grupos 1-pirrolilo, 2-pirrolilo y 3-pirrolilo. Cuando el nitrógeno está presente en un anillo heteroarilo, puede, cuando la naturaleza de los átomos y grupos adyacentes lo permita, existir en estado oxidado (es decir, N<sup>+</sup>-O<sup>-</sup>). Además, cuando el azufre está presente en un anillo heteroarilo, puede, cuando la naturaleza de los átomos y grupos adyacentes lo permita, existir en estado oxidado (es decir, S<sup>+</sup>-O<sup>-</sup> o SO<sub>2</sub>). Los grupos heteroarilo pueden ser monocíclicos o policíclicos (p.ej., bicíclicos, tricíclicos).

En algunos casos, un grupo heteroarilo es monocíclico. Los ejemplos incluyen pirrol, pirazol, imidazol, triazol (p. ej., 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,3,4-triazol), tetrazol, furano, isoxazol, oxazol, oxadiazol (p. ej., 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol, tiofeno, isotiazol, tiazol, tiadiazol (p. ej., 1,2,3-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, 1,3,4-tiadiazol), piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, triazina (p. ej., 1,2,4-triazina, 1,3,5-triazina) y tetrazina.

El término "acilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbilo-C(O)-, p. ej., alquil-C(O)-.

El término "alquilo" se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal y grupos alquilo de cadena ramificada. En algunas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o ramificada tiene 30 átomos de carbono o menos en su cadena principal (p. ej., C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> para las cadenas lineales, C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> para las cadenas ramificadas), y en otras realizaciones, 20 o menos. En determinadas realizaciones, los grupos alquilo son grupos alquilo inferior, p. ej., metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo y *n*-pentilo. Asimismo, el término "alquilo" tal y como se utiliza en toda la memoria descriptiva, los ejemplos, y las reivindicaciones pretenden incluir tanto los "alquilos no sustituidos" como los "alquilos sustituidos", refiriéndose estos últimos a restos de alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan a un hidrógeno o a uno o más carbonos de la cadena principal del hidrocarburo. En determinadas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o ramificada tiene 30 átomos de carbono o menos en su cadena principal (p. ej., C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> para las cadenas lineales, C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> para cadenas ramificadas). En algunas realizaciones, la cadena tiene diez o menos átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) en su estructura principal. En otras realizaciones, la cadena tiene seis o menos átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) en su estructura principal.

Los términos "resto de hidrazona" o "hidrazona" se refieren a hidrazonas E y/o Z, p. ej.,



La estereoquímica del resto de hidrazona puede ser E o Z. El término hidrazona, como se utiliza en el presente documento, incluye tanto los isómeros E como Z. Los restos de hidrazona descritos en el presente documento generalmente se representan en una configuración, pero se entiende que esta divulgación puede incluir tanto E como Z.

En diversos lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de los compuestos de la divulgación se describen en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la divulgación incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, la expresión "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" está destinada específicamente a divulgar individualmente metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, etc.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal de un compuesto que es adecuada para uso farmacéutico, incluyendo, entre otras, sales metálicas (p. ej., sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.), sales de adición de ácidos (p. ej., ácidos minerales, ácidos carboxílicos, etc.) y sales de adición de bases (p. ej., amoníaco, aminas orgánicas, etc.). La forma de sal de adición de ácido de un compuesto que se presenta en su forma libre como base se puede obtener tratando dicha forma de base libre con un ácido apropiado tal como un ácido inorgánico, por ejemplo, un hidrohálico tal como clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o un ácido orgánico, tal como, por ejemplo, acético, hidroxiacético, propanoico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, cíclico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y similares (véase, p. ej., el documento WO 01/062726. Algunas sales farmacéuticamente aceptables enumeradas por

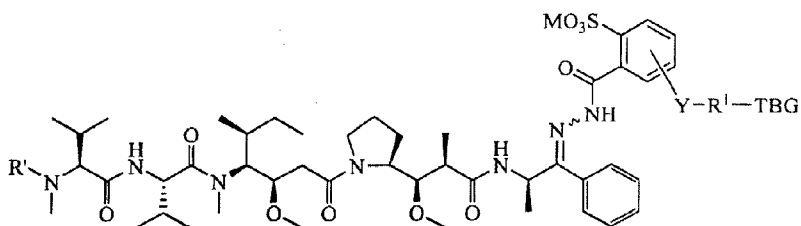
Berge *et al.*, J. Pharm. Sci., 66: 1-19 (1977), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). Los compuestos que contienen protones ácidos pueden convertirse en su forma de sal de adición de base terapéuticamente activa y no tóxica, p. ej. sales de metales o aminas, mediante tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas. Las formas de sal base apropiadas incluyen, por ejemplo, sales de amonio, sales o iones de metales alcalinos y alcalinos térreos, p. ej., sales de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, sales con bases orgánicas, p. ej., *N*-metil-D-glucamina, sales de hidrabamina y sales con aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina, lisina y similares. Por el contrario, dichas formas de sal se pueden convertir en formas libres mediante tratamiento con una base o un ácido apropiado. Los compuestos y sus sales pueden estar en forma de un solvato, que se incluye en el ámbito de la presente divulgación. Tales solvatos incluyen, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares (véase, p. ej., el documento WO 01/062726).

La divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la divulgación junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden utilizar *in vitro* o *in vivo*.

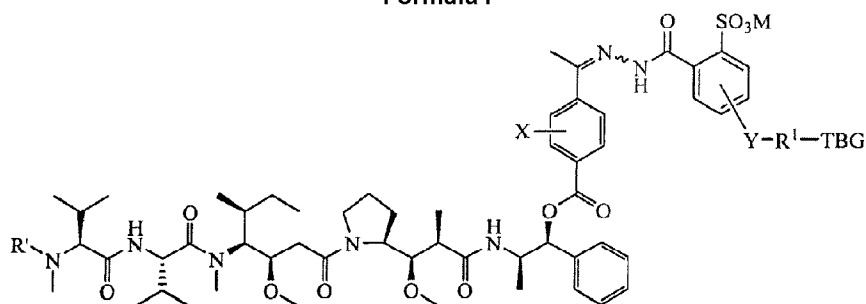
El término "isómero", como se utiliza en el presente documento, incluye, pero no está limitado a, tautómeros, isómeros *cis* y *trans* (*E* (*entgegen*), *Z* (*zusammen*)), enantiómeros *R* y *S* (dicha notación *R* y *S* se utiliza en correspondencia con las reglas descritas en Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30), diastereómeros, isómeros (*D*), isómeros (*L*), estereoisómeros, sus mezclas racémicas y otras mezclas de los mismos. Todos estos isómeros, así como sus mezclas, se pretenden incluir en esta divulgación. Los tautómeros, aunque no se indique explícitamente en las fórmulas descritas en el presente documento, se pretende que estén incluidos en el ámbito de la presente divulgación.

### Compuestos de la divulgación

Las realizaciones de la presente divulgación proporcionan un compuesto que tiene la estructura representada por la Fórmula I o la Fórmula II:



Fórmula I



Fórmula II

o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero *E* (*entgegen*), isómero *Z* (*zusammen*), enantiómero *R*, enantiómero *S*, diastereómero, isómero (*D*), isómero (*L*), estereoisómero, mezclas racémicas u otras mezclas de los mismos, en donde:

$R'$  es H o  $-CH_3$ ,

$M$  se selecciona entre H y un contraión farmacéuticamente aceptable, tal como,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NR_4^+$  o  $NHR_3^+$ , en donde  $R$  se selecciona entre H y alquilo  $C_1-C_4$ ,

$Y$  está ausente o se selecciona entre un alquilo  $C_1-C_6$  opcionalmente sustituido,  $-NH-C(O)-$ ,  $-C(O)-NH-$ ,  $-NH-C(O)-NH-$ ,  $-C(O)-O-$  y  $-O-C(O)-$ ,

$R^1$  está ausente o se selecciona entre un alquilo  $C_1-C_{18}$  opcionalmente sustituido, en donde opcionalmente hasta seis átomos de carbono de dicho alquilo  $C_1-C_{18}$  están sustituidos cada uno independientemente con  $-OCH_2CH_2-$ ,

$X$  is H o se selecciona entre halógeno (p. ej.,  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-Br$  o  $-I$ ),  $-NO_2$ ,  $-NR^2R^3$ ,  $-OR^2$ ,  $-NHCOR^2$  y  $-OCOR^2$ , en donde

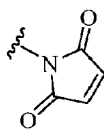
R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan cada uno independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y

TBG es un grupo de unión a tiol seleccionado entre un grupo maleimida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetamida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetato opcionalmente sustituido, un grupo piridilio opcionalmente sustituido, un grupo isotiocianato opcionalmente sustituido, un grupo vinilcarbonilo opcionalmente sustituido, un grupo aziridina opcionalmente sustituido, un grupo disulfuro opcionalmente sustituido y un grupo acetileno opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, el compuesto de estructura de Fórmula I o II se formula como una composición farmacéutica que contiene opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, se administra a un organismo y se une covalentemente de manera selectiva y rápida *in situ* al grupo tiol de la cisteína-34 de la albúmina endógena en la circulación sanguínea.

En algunas realizaciones, R' es -CH<sub>3</sub>. En otras realizaciones, R' es H.

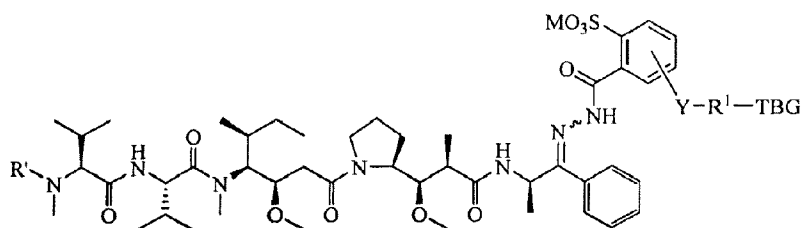
En algunas realizaciones, el grupo de unión a tiol o TBG (*Thiol-Binding Group*), es el grupo maleimida:



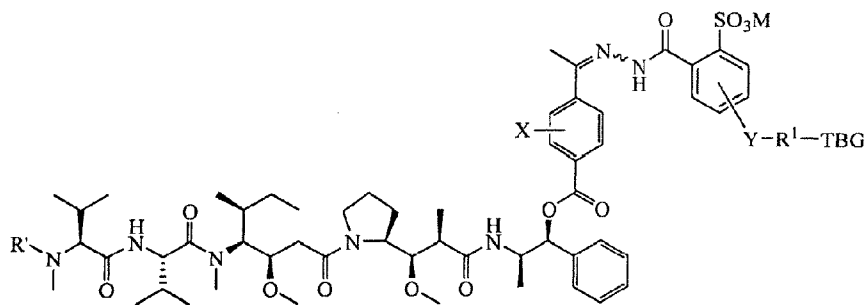
En algunas realizaciones, el fármaco a base de péptidos altamente citotóxico es auristatina E derivatizada de manera que contiene un grupo carbonilo que permite la formación de un enlace hidrazona sensible a los ácidos con un conector de maleimida solubilizante en agua que contiene un resto de hidrazida.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se divulga en el presente documento y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa y se une covalentemente de manera selectiva y rápida *in situ* al grupo tiol de la cisteína-34 de la albúmina endógena en la circulación sanguínea.

En algunas realizaciones, en los compuestos que se unen a la albúmina descritos en el presente documento, el fármaco altamente citotóxico es un derivado pentapeptídico de auristatina E que contiene carbonilo, el resto que se une a la albúmina es un grupo de unión a tiol (TBG), por ejemplo, un grupo maleimida, que se une de manera rápida y selectiva a la cisteína-34 de la albúmina después de la administración, y el enlace sensible a los ácidos es un enlace de benzoilhidrazona derivatizado de Fórmula general I y II:



Fórmula I



Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero E (*entgegen*), isómero Z (*zusammen*), enantiómero R, enantiómero S, diastereómero, isómero (D), isómero (L), estereoisómero, mezclas racémicas u otras mezclas de los mismos, en donde:

R' es H o -CH<sub>3</sub>,

M se selecciona entre H y un contraión farmacéuticamente aceptable, tal como, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NRa<sup>+</sup> o NHR<sub>3</sub>, en donde R se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,

Y está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O- y -O-C(O)-,

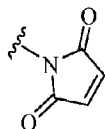
R<sup>1</sup> está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido, en donde opcionalmente hasta seis átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están sustituidos cada uno independientemente con -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,

X is H o se selecciona entre halógeno (p. ej., -F, -Cl, -Br o -I), -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, -OR<sup>2</sup>, -NHCOR<sup>2</sup> y -OCOR<sup>2</sup>, en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan cada uno independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y

TBG es un grupo de unión a tiol seleccionado entre un grupo maleimida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetamida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetato opcionalmente sustituido, un grupo piridiltio opcionalmente sustituido, un grupo isotiocianato opcionalmente sustituido, un grupo vinilcarbonilo opcionalmente sustituido, un grupo aziridina opcionalmente sustituido, un grupo disulfuro opcionalmente sustituido y un grupo acetileno opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, el TBG está sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o halógeno. En algunas realizaciones, el TBG está sustituido con metilo, -Cl o -Br.

Un grupo disulfuro puede activarse mediante un ácido tionitrobenzoico (p.ej., ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico) como grupo intercambiable. Un grupo maleimida o piridiltio puede, en los casos en los que sea apropiado, estar sustituido con un grupo alquilo o con los grupos hidrosolubles anteriores. En general, un grupo de unión a tiol posee propiedades de unión a proteínas, es decir, se une covalentemente ("un grupo de unión a proteínas covalente") en un entorno fisiológico, a aminoácidos particulares en la superficie de la proteína. En algunas realizaciones, el grupo maleimida, el grupo haloacetamida, el grupo haloacetato, el grupo piridiltio, el grupo disulfuro, el grupo vinilcarbonilo, el grupo aziridina y/o el grupo acetileno reaccionan con grupos tiol (-SH) de cisteínas. En algunas realizaciones, el grupo de unión a proteínas es un grupo maleimida



que se une a la cisteína-34 de la albúmina.

En algunas realizaciones, el sistema de administración del fármaco contiene un resto de hidrazona escindible y sensible a los ácidos. La escisión del resto hidrazona y la semivida de liberación del fármaco varían según la estructura del derivado de carbonilo.

En algunas realizaciones, la semivida de liberación del fármaco unido a albúmina en el intervalo de pH de 4,0 a 6,5 varía de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 80 horas.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, un anillo de fenilo que comprende un grupo aceptor de electrones, tal como un ácido sulfónico (-SO<sub>3</sub>H) o grupo sulfonato (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) unido a la posición orto del enlace de hidrazona, estabiliza el resto de hidrazona dando lugar a una liberación lenta y prolongada del fármaco en condiciones ácidas.

En algunas realizaciones, R' es -CH<sub>3</sub>. En otras realizaciones, R' es H.

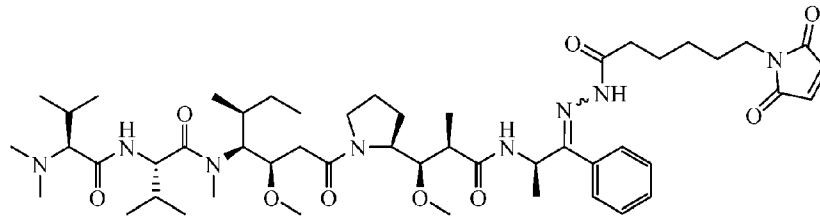
En algunas realizaciones, Y y/o R<sup>1</sup> están presentes. En algunas realizaciones, Y está ausente. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> está ausente. En algunas realizaciones, tanto Y como R<sup>1</sup> están ausentes.

En algunas realizaciones, Y se selecciona entre metilo, etilo, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -C(O)-O- y -O-C(O)-.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde un átomo de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> está reemplazado por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde dos átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están reemplazados por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde tres átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están reemplazados por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde cuatro átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están reemplazados por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde cinco átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están reemplazados por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones,

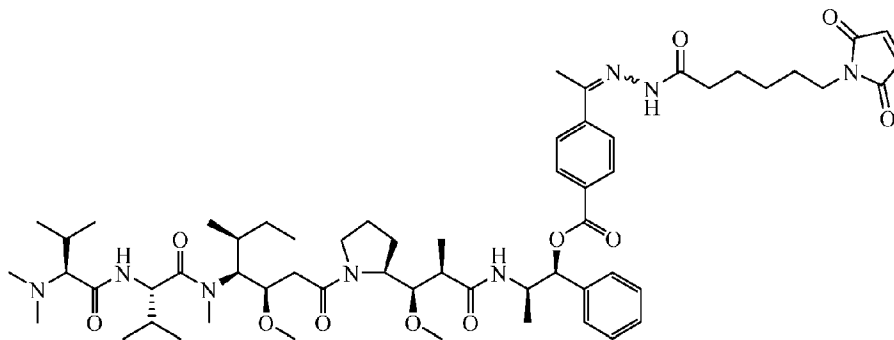
R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido en donde seis átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están reemplazados por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

El documento US6884869-B2 (n.º de solicitud: 10/001191, presentada: 01.11.2001) describe conjugados de anticuerpo-fármaco con derivados pentapeptídicos de las estructuras químicas de Fórmula A y Fórmula B que se representan a continuación:



Fórmula A

10



Fórmula B

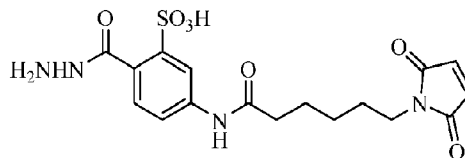
15

Estos se conjugaron con anticuerpos que contenían tiol. Ambos compuestos contienen un resto alifático de 6-maleimidocaproilhidrazona que proporciona una solubilidad acuosa mínima a los dos compuestos de Fórmula A y Fórmula B representados anteriormente. De hecho, la conjugación de ambos compuestos anteriores con los anticuerpos se logró mediante la disolución de los compuestos solo con ayuda de disolventes orgánicos, es decir, una mezcla 9:1 de acetonitrilo:DMSO. El uso de disolventes exclusivamente orgánicos en la formulación de una composición farmacéutica aplicable para el acoplamiento *in situ* a la cisteína-34 de la albúmina que circula en el torrente circulatorio, en concreto, el enfoque de administración de fármacos descrito en el presente documento, no es posible. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las presentes composiciones no incluyen un disolvente orgánico.

20

Por tanto, se inventaron conectores de maleimida aromáticos que comprenden un resto de ácido sulfónico, que proporcionan suficiente solubilidad acuosa a los profármacos que se unen a la albúmina para la formulación de una composición farmacéutica para administración intravenosa. Uno de esos conectores es el ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinacarbonil)-bencenosulfónico, abreviado como Sulf07, que tiene la estructura química que se muestra a continuación:

25

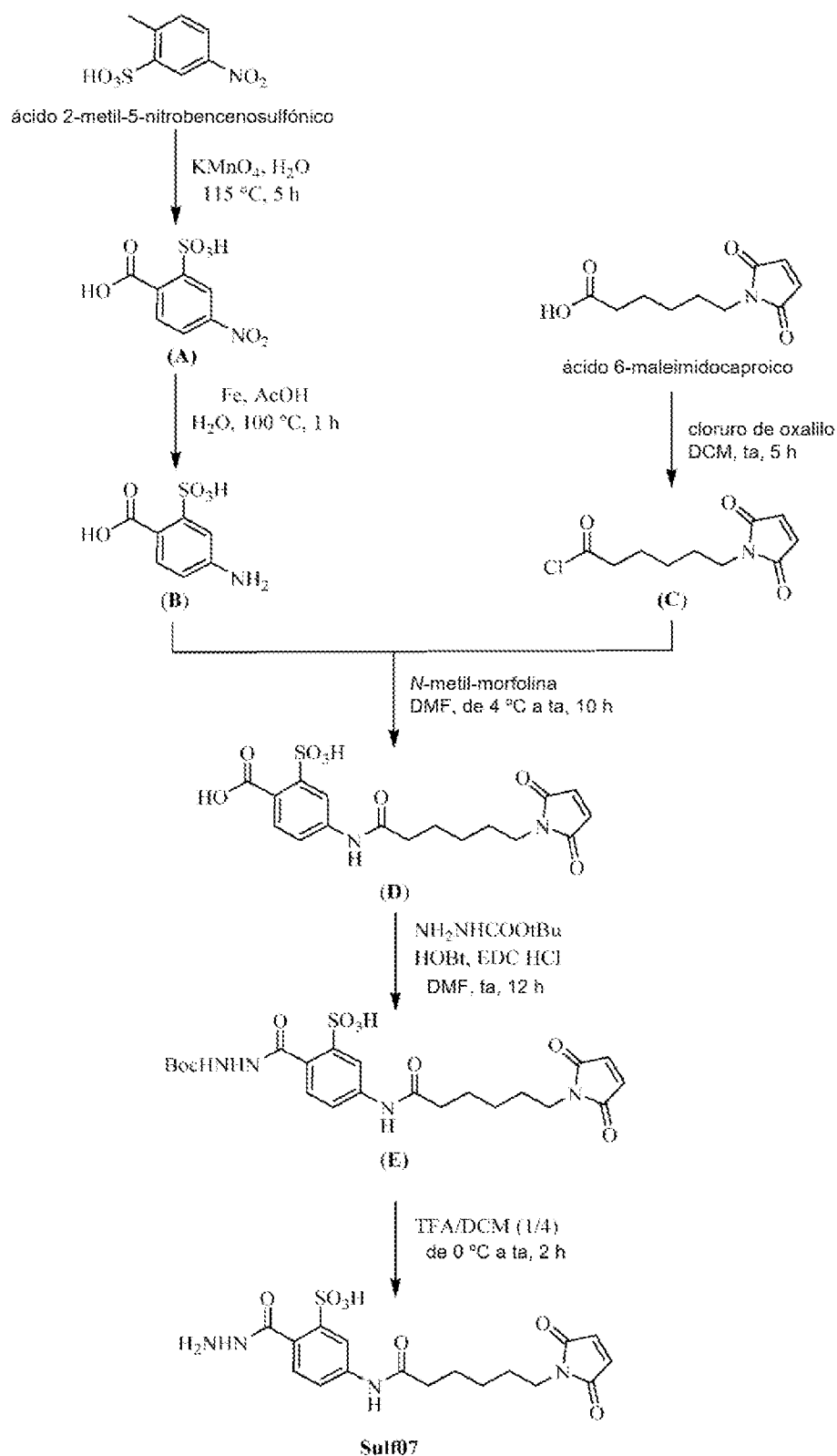


30

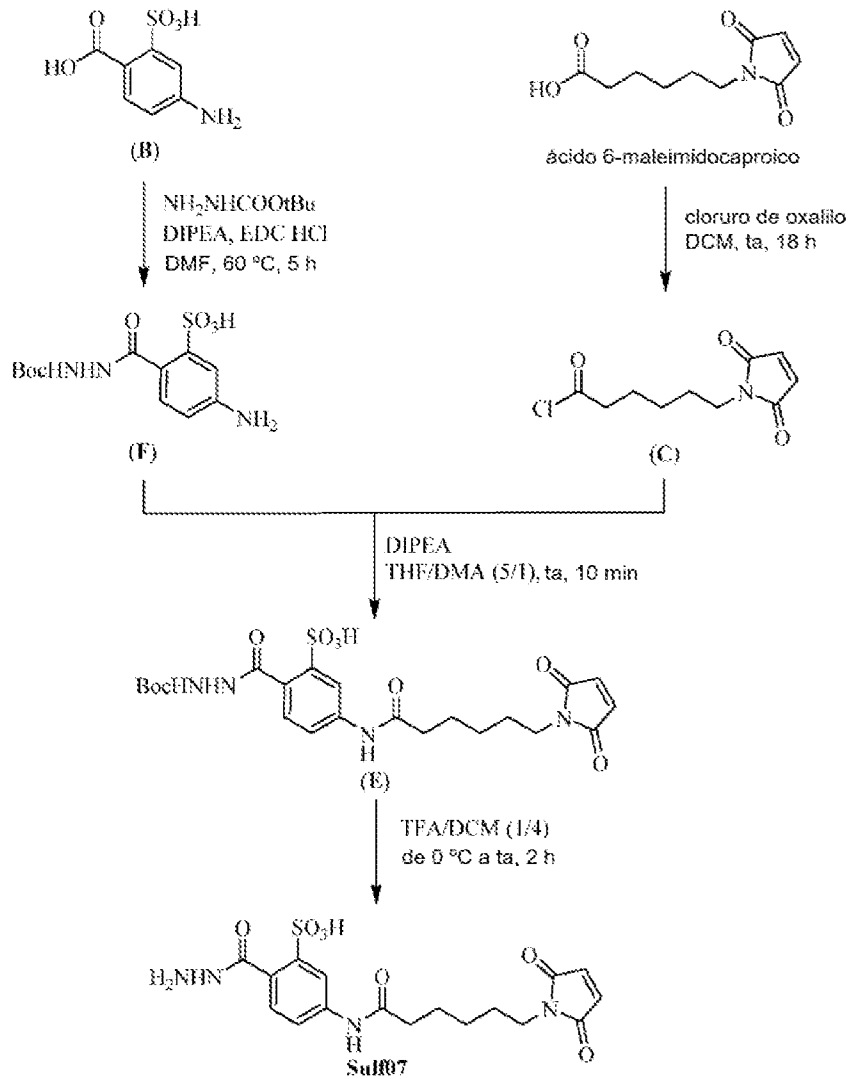
Estructura química de Sulf07

El conector Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinacarbonil)-bencenosulfónico, se preparó según la vía A y/o la vía B como se representa en los siguientes esquemas de síntesis:

35



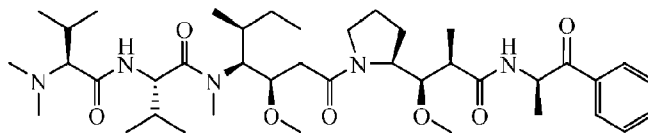
Esquema 1, Vía A



Esquema 2, Vía B

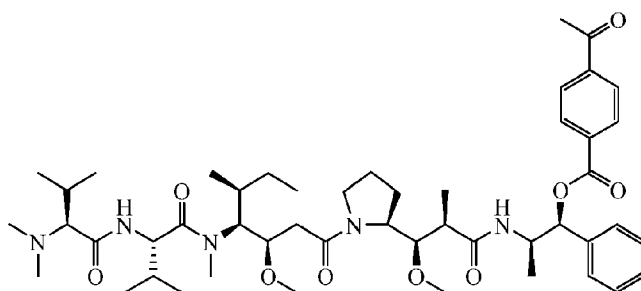
5 El nuevo procedimiento de síntesis y la caracterización del nuevo conector Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinacarbonil)benzenosulfónico, que se consiguió según la vía A y B se describe en el Ejemplo 1.

El conector Sulf07 se hizo reaccionar con:



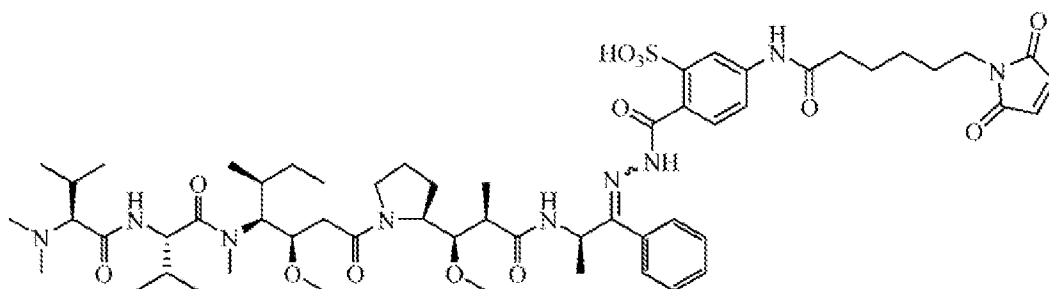
10

AE-Ceto  
o

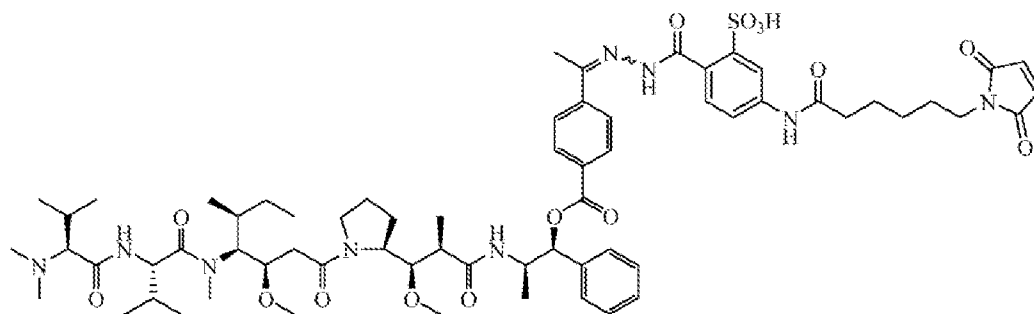


AE-Éster para obtener los compuestos de Fórmula III (abreviado como AE-Ceto-Sulf07) y Fórmula IV (abreviado como AE-Éster-Sulf07), respectivamente:

5



**Fórmula III (AE-Ceto-Sulf07)**

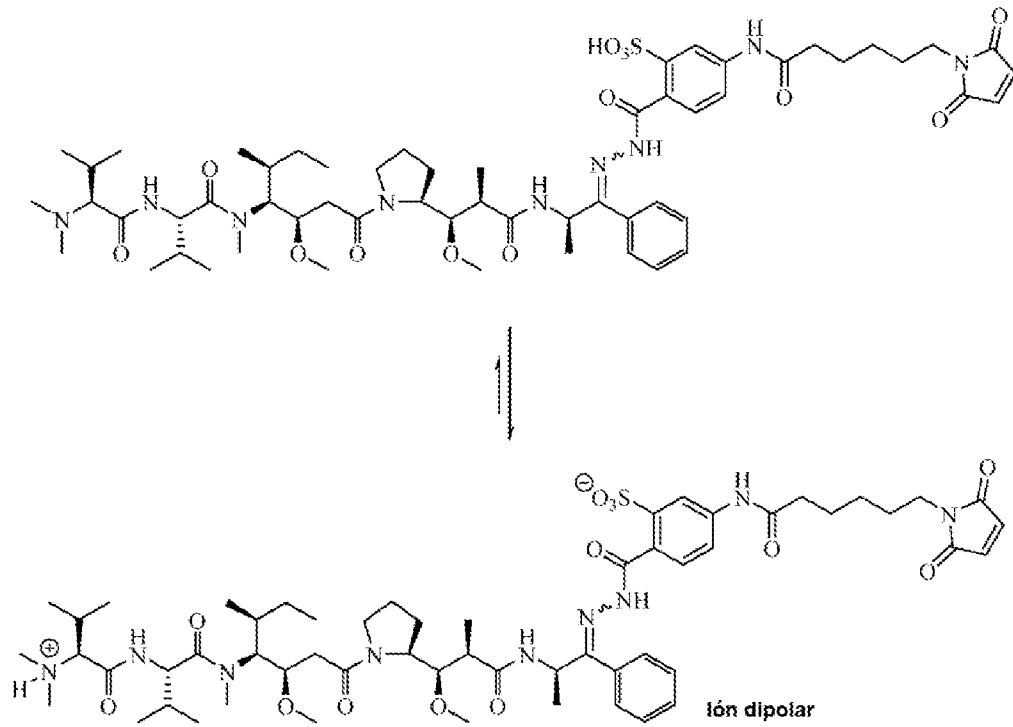


**Fórmula IV (AE-Éster-Sulf07)**

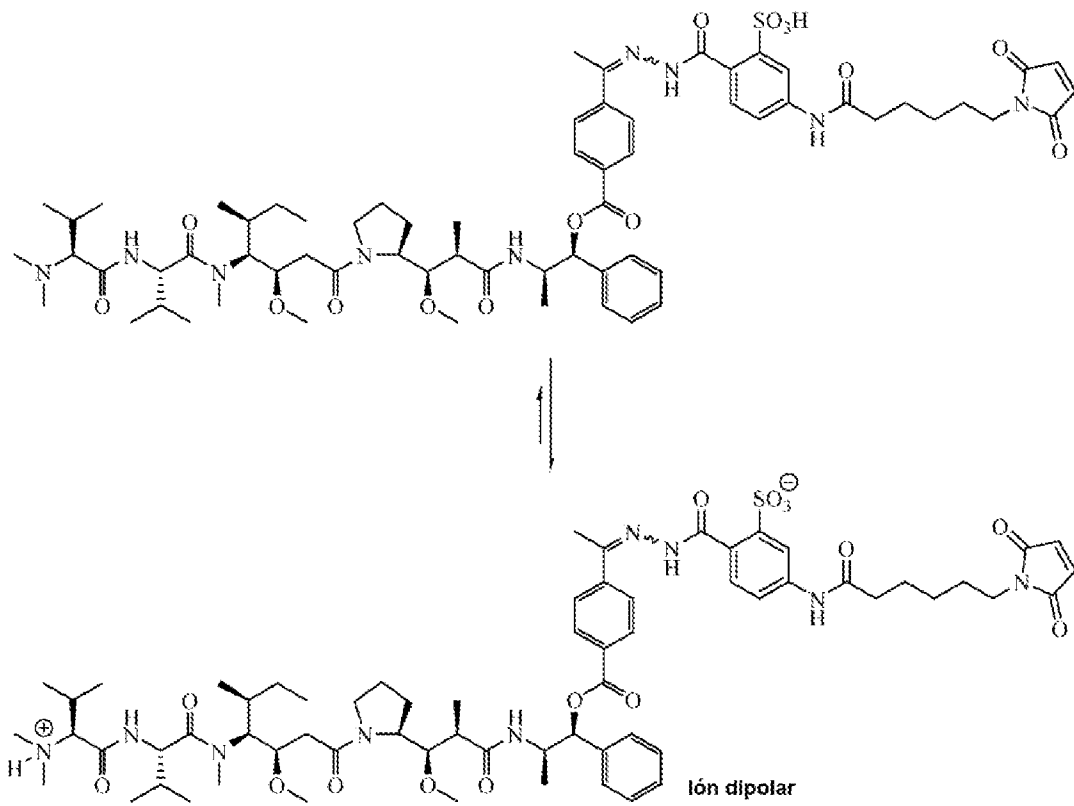
10 La síntesis y caracterización de AE-Ceto-Sulf07 (Fórmula III) y AE-Éster-Sulf07 (Fórmula IV) se describen en los Ejemplos 2 y 3.

Los análisis de las estructuras de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 revelan que en ambas moléculas dos restos (grupos  $-\text{SO}_3\text{H}$  y  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) existen como un par ácido-base, formando así iones dipolares representados en el Esquema 3 y el Esquema 4.

15



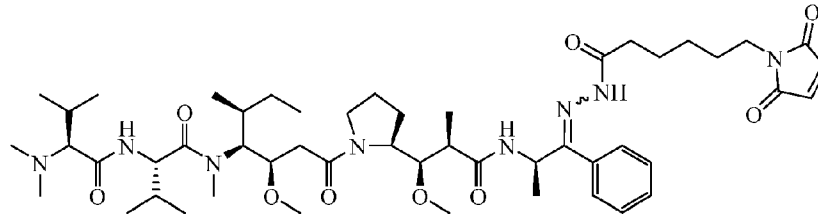
Esquema 3



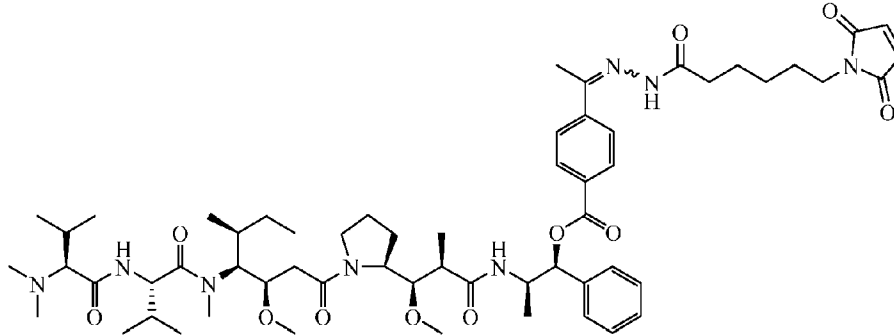
Esquema 4

- 5 El resto de ácido sulfónico integrado en el conector Sulf07, así como la propiedad de ión dipolar de los dos profármacos de auristatina AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 proporcionan suficiente hidrosolubilidad para formular una composición farmacéutica y, lo que es más importante, una alta estabilidad del resto de maleimida que mejora

significativamente con respecto a la Fórmula A (AE-Ceto-EMCH) y B (AE-Éster-EMCH):



Fórmula A



Fórmula B

5

divulgadas en el documento US6884869-B2 (solicitud N.º: 10/001191, presentada: 01.11.2001).

10 Para la unión *in situ* a la cisteína-34 de la albúmina endógena, la estabilidad del grupo maleimida en condiciones fisiológicas en el intervalo de pH de 7,4-7,6 es un criterio para la administración intravenosa y la unión eficaz a la albúmina circulante en el torrente circulatorio.

15 Como se muestra en la Figura 1 y la Figura 2, la estabilidad del resto maleimida frente a la hidrólisis tanto para AE-Ceto-Sulf07 como para AE-Éster-Sulf07 mejora considerablemente en comparación con los dos compuestos descritos en el documento US6884869-B2, es decir, AE-Ceto-EMCH (compuesto de Fórmula A) y AE-Éster-EMCH (compuesto de Fórmula B). Después de 4 horas de incubación a temperatura ambiente en el tampón de reconstitución (fosfato sódico 50 mM, pH 7,65, que contiene 4 % de HPβCD y 5 % de sacarosa), se hidrolizó un 2,2 % de maleimida de AE-Ceto-Sulf07 en comparación con un 5,4 % de hidrólisis de maleimida para AE-Ceto-EMCH, y de manera similar se hidrolizó un 2,5 % de maleimida de AE-Éster-Sulf07 en comparación con un 11,0 % de AE-Éster-EMCH. Adicionalmente, las formulaciones de principio farmacéutico activo (p.a.) de los derivados Sulf07 mostraron una excelente estabilidad (Figura 24 y Figura 25) en condiciones de degradación acelerada (p. ej., a 55 °C durante hasta 264 horas), mientras que los restos de maleimida de los derivados de EMCH se hidrolizaron rápidamente. La hidrólisis mínima de la maleimida es esencial para el desarrollo y la fabricación de productos para garantizar la unión cuantitativa de la albúmina endógena y, por lo tanto, limitar cualquier liberación prematura de fármaco libre en circulación y maximizar la eficiencia clínica.

25 Otra ventaja de las soluciones acuosas de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 es que tienen un valor de pH fisiológico en el intervalo de 6,8 a 7,5.

30 Asimismo, la solubilidad y estabilidad de los p.a. de ión dipolar aumentan cuando se usan junto con portadores farmacéuticos aprobados tales como Tween 80, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, y esto puede facilitar la formulación de una composición farmacéutica.

35 Las formulaciones farmacéuticas de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 lograron una unión muy rápida a la albúmina en plasma (humano, murino y rata (Figuras 5-10)). También se demostró la especificidad de unión a la albúmina para ambos agentes terapéuticos en plasma humano (Figuras 3-4).

#### Composiciones farmacéuticas

40 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en el presente documento.

45 La cantidad total de un compuesto en una composición que se va a administrar a un paciente es la que sea adecuada para ese paciente. Un experto en la materia apreciaría que diferentes individuos pueden requerir diferentes cantidades totales de la sustancia terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la cantidad del compuesto es una cantidad

farmacéuticamente eficaz. El experto en la materia podría determinar la cantidad del compuesto de una composición necesaria para tratar a un paciente basándose en factores tales como, por ejemplo, la edad, el peso y el estado general del paciente. La concentración del compuesto depende de su solubilidad en la solución de administración intravenosa y del volumen de líquido que se puede administrar. Por ejemplo, la concentración del compuesto puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml en la composición inyectable. En algunas realizaciones, la concentración del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml.

Las composiciones y los kits farmacéuticos de la presente divulgación también pueden contener diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, protectores y otros materiales bien conocidos en la materia. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Las características del portador dependerán de la vía de administración.

Las composiciones se pueden administrar de diversas formas convencionales. Las vías de administración ilustrativas que pueden usarse incluyen la oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, cutánea, subcutánea, intramuscular, tópica, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intravítrea, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, administración en el sistema nervioso central (SNC) o administración mediante supositorio. En algunas realizaciones, las composiciones son adecuadas para la administración parenteral. Estas composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intratecal. En algunas realizaciones, las composiciones se inyectan por vía intravenosa. En algunas realizaciones, se puede preparar una formulación reconstituida reconstituyendo una composición de compuesto liofilizado en un líquido de reconstitución que comprende, p. ej., un alcohol, DMSO y/o polietilenglicol y agua y/o un tampón salino. Dicha reconstitución puede comprender la adición del líquido de reconstitución y la mezcla, por ejemplo, mediante agitación o movimientos vorticiales de la mezcla. La formulación reconstituida puede entonces volverse adecuada para inyección mezclando, p. ej., solución de Ringer lactato, solución de glucosa al 5 %, solución salina isotónica o un tampón salino adecuado con la formulación para crear una composición inyectable. Un experto en la materia apreciaría que un método para administrar una formulación o composición de sustancia terapéuticamente eficaz dependería de factores tales como la edad, el peso y el estado físico del paciente que se está tratando, y la enfermedad o afección que se está tratando. Por tanto, el trabajador cualificado podría seleccionar un método de administración óptimo para un paciente en función de cada caso.

En algunas realizaciones, los compuestos y las composiciones divulgados en el presente documento son para usar en el tratamiento de un cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos u otros microorganismos.

En algunas realizaciones, el compuesto divulgado en el presente documento puede usarse en la fabricación de un fármaco para tratar una enfermedad seleccionada entre un cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos u otros microorganismos.

En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia hemática o un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y melanoma.

En algunas realizaciones, el cáncer es adenocarcinoma, melanoma uveal, leucemia aguda, neuroma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, cáncer pancreático, tumor del tejido conjuntivo, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, carcinoma bronquial no microcítico, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma del cuerpo uterino, síndrome CUP, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma de endometrio, cáncer de vesícula biliar, carcinomas de vesícula biliar, cáncer de útero, cáncer de cuello del útero, tumores de cuello, nariz y oído, neoplasias hemáticas, tricoleucemia, cáncer de uretra, cáncer de piel, gliomas, cáncer de testículos, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, cáncer de huesos, carcinoma colorrectal, tumores de cabeza/cuello, carcinoma de colon, craneofaringoma, cáncer de hígado, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de estómago, cáncer de colon, meduloblastoma, melanoma, meningioma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásicos, osteosarcoma, carcinoma de ovario, carcinoma pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de lengua, carcinoma de ovario o cáncer de ganglios linfáticos.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un compuesto como el descrito en el presente documento y, un excipiente, un portador y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, pueden incluirse uno o más excipientes en la composición. Un experto en la materia apreciará que la elección de cualquier excipiente puede influir en la elección de cualquier otro excipiente. Por ejemplo, la elección de un excipiente puede impedir el uso de uno o más excipientes adicionales porque la combinación de excipientes pueda producir efectos no deseados. Un experto en la materia sería capaz de determinar empíricamente qué excipientes, si los hay, incluir en las composiciones. Los excipientes pueden incluir, aunque no de forma limitativa, codisolventes, agentes solubilizantes, tampones, agentes ajustadores del pH, agentes formadores de masa,

tensioactivos, agentes encapsulantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes estabilizantes, protectores y modificadores de la viscosidad. En algunas realizaciones, puede resultar beneficioso incluir un portador farmacéuticamente aceptable en las composiciones.

- 5 En algunas realizaciones, en las composiciones se puede incluir un agente solubilizante. Los agentes solubilizantes pueden ser útiles para aumentar la solubilidad de cualquiera de los componentes de la composición, incluyendo un compuesto o un excipiente. Los agentes solubilizantes descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que simplemente se proporcionan como agentes solubilizantes ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. En determinadas realizaciones, los agentes solubilizantes incluyen, aunque no de forma limitativa, alcohol etílico, alcohol *tert*-butílico, polietilenglicol, glicerol, metilparabeno, propilparabeno, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, ciclodextrinas tales como dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y trimetil- $\beta$ -ciclodextrina, y combinaciones de los mismos, y cualesquiera sales y/o combinaciones farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10
- 15 El pH de las composiciones puede ser cualquier pH que proporcione propiedades deseables para la formulación o composición. Las propiedades deseables pueden incluir, por ejemplo, estabilidad del compuesto, mayor retención de compuestos en comparación con composiciones a otros valores de pH y eficiencia de filtración mejorada. En algunas realizaciones, el valor del pH de las composiciones puede ser de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, p. ej., de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0. En realizaciones particulares, el valor de pH de las composiciones puede ser de  $5,5 \pm 0,1$ ,  $5,6 \pm 0,1$ ,  $5,7 \pm 0,1$ ,  $5,8 \pm 0,1$ ,  $5,9 \pm 0,1$ ,  $6,0 \pm 0,1$ ,  $6,1 \pm 0,1$ ,  $6,2 \pm 0,1$ ,  $6,3 \pm 0,1$ ,  $6,4 \pm 0,1$ ,  $6,5 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$ ,  $6,7 \pm 0,1$ ,  $6,8 \pm 0,1$ ,  $6,9 \pm 0,1$ ,  $7,0 \pm 0,1$ ,  $7,1 \pm 0,1$  y  $7,2 \pm 0,1$ .
- 20

En algunas realizaciones, puede ser beneficioso tamponar el pH incluyendo uno o más tampones en las composiciones. En determinadas realizaciones, un tampón puede tener un pKa de, por ejemplo, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0 o aproximadamente 6,5. Un experto en la materia apreciará que se puede elegir un tampón apropiado para su inclusión en composiciones en función de su pKa y otras propiedades. Los tampones son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los tampones descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que simplemente se proporcionan como tampones ilustrativos que pueden usarse en las formulaciones o composiciones de la presente divulgación. En determinadas realizaciones, un tampón incluye, aunque no de forma limitativa, Tris, Tris-HCl, fosfato de potasio, fosfato de sodio, citrato de sodio, ascorbato de sodio, combinaciones de fosfato de sodio y potasio, Tris/Tris-HCl, bicarbonato de sodio, fosfato de arginina, clorhidrato de arginina, clorhidrato de histidina, cacodilato, succinato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), maleato, bis-tris, fosfato, carbonato, y cualquier sal farmacéuticamente aceptable y/o combinación de los mismos.

25

30

En algunas realizaciones, se puede incluir un agente de ajuste del pH en las composiciones. La modificación del pH de una composición puede tener efectos beneficiosos sobre, por ejemplo, la estabilidad o solubilidad de un compuesto, o puede ser útil para preparar una composición adecuada para LA administración parenteral. Los agentes de ajuste del pH son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los agentes de ajuste del pH descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como agentes de ajuste del pH ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los agentes de ajuste del pH pueden incluir, por ejemplo, ácidos y bases. En algunas realizaciones, un agente de ajuste del pH incluye, pero no está limitado a, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, hidróxido sódico, carbonato de sodio y combinaciones de los mismos.

35

40

En algunas realizaciones, se puede incluir un agente formador de masa en las composiciones. Los agentes formadores de masa se usan comúnmente en composiciones liofilizadas para proporcionar volumen añadido a la composición y para ayudar a la visualización de la composición, especialmente en casos en los que, de otro modo, el sedimento liofilizado sería difícil de ver. Los agentes formadores de masa también pueden ayudar a prevenir la fuga del componente activo de una composición farmacéutica y/o ayudar a la crioprotección de la composición. Los agentes formadores de masa son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los agentes formadores de masa descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que simplemente se proporcionan como agentes formadores de masa ilustrativos que pueden usarse en las composiciones.

45

50

Los agentes formadores de masa ilustrativos pueden incluir hidratos de carbono, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcar, aminoácidos y ácidos de azúcares, y combinaciones de los mismos. Los agentes formadores de masa de hidratos de carbono incluyen, aunque no de forma limitativa, mono-, di- o polihidratos de carbono, almidones, aldosas, cetosas, amino azúcares, gliceraldehído, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa,  $\alpha$ -D-glucopiranosido de metilo, maltosa, lactona, sorbosa, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrolulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, glucosamina, galactosamina, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, inulina, levan, fucoidan, carragenano, galactocarolosa, pectinas, amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatán, ácido hialurónico, goma xantina, sacarosa, trehalosa, dextrano y lactosa. Los agentes formadores de masa de alcoholes de azúcar incluyen, aunque no de forma limitativa, alditoles, inositoles, sorbitol y manitol. Los agentes formadores de masa de ácidos de azúcar incluyen, aunque no de forma limitativa, ácidos aldónicos, ácidos urónicos, ácidos aldáricos, ácido glucónico, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, ácido neuramínico, ácidos pécticos y ácido algínico. Los agentes formadores de masa de

55

60

65

aminoácidos incluyen, aunque no de forma limitativa, glicina, histidina y prolina.

En algunas realizaciones, se puede incluir un tensioactivo en las composiciones. Los tensioactivos, en general, reducen la tensión superficial de una composición líquida. Esto puede proporcionar propiedades beneficiosas tales como una mayor facilidad de filtración. Los tensioactivos también pueden actuar como agentes emulsionantes y/o agentes solubilizantes. Los tensioactivos son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los tensioactivos descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como tensioactivos ilustrativos que pueden usarse en las formulaciones o composiciones de la presente divulgación. Los tensioactivos que pueden incluirse incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres de sorbitán tales como polisorbato (p. ej., polisorbato 20 y polisorbato 80), lipopolisacáridos, polietilenglicoles (p. ej., PEG 400 y PEG 3000), poloxámeros (es decir, plurónicos), óxidos de etileno y óxidos de polietileno (p. ej., Triton X-100), saponinas, fosfolípidos (p. ej., lecitina) y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, se puede incluir un agente encapsulante en las composiciones. Los agentes encapsulantes pueden secuestrar moléculas y ayudar a estabilizarlas o solubilizarlas. Los agentes encapsulantes son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los agentes encapsulantes descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino se proporcionan simplemente como agentes encapsulantes ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los agentes encapsulantes que pueden incluirse en las composiciones incluyen, aunque no de forma limitativa,  $\alpha$ -ciclodextrinas,  $\beta$ -ciclodextrinas,  $\gamma$ -ciclodextrina y combinaciones de las mismas (p. ej.,  $\alpha$ -ciclodextrina, dimetil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\alpha$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina, trimetil- $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina, dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, trimetil- $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, dimetil- $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxietil- $\gamma$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina, trimetil- $\gamma$ -ciclodextrina y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, en las composiciones, se puede incluir un agente de ajuste de la tonicidad. La tonicidad de una composición líquida es una consideración importante cuando se administra la composición a un paciente, por ejemplo, mediante administración parenteral. Los agentes de ajuste de la tonicidad, por tanto, pueden usarse para ayudar a preparar una composición adecuada para la administración. Los agentes de ajuste de la tonicidad son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los agentes de ajuste de la tonicidad descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como agentes de ajuste de la tonicidad ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los agentes de ajuste de la tonicidad pueden ser iónicos o no iónicos e incluyen, aunque no de forma limitativa, sales inorgánicas, aminoácidos, hidratos de carbono, azúcares, alditoles e hidratos de carbono. Las sales inorgánicas ilustrativas pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio y sulfato de potasio. Un aminoácido ilustrativo es la glicina. Los azúcares ilustrativos pueden incluir alditoles tales como glicerol, propilenglicol, glucosa, sacarosa, lactosa, dextrosa y manitol.

En algunas realizaciones, se puede incluir un agente estabilizante en las composiciones. Los agentes estabilizantes ayudan a aumentar la estabilidad de un compuesto en las composiciones. Esto puede ocurrir mediante, por ejemplo, la reducción de la degradación o la prevención de la agregación de un compuesto. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los mecanismos para mejorar la estabilidad pueden incluir el secuestro del compuesto de un disolvente o la inhibición de la oxidación por radicales libres de la sustancia terapéuticamente eficaz. Los agentes estabilizantes son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los agentes estabilizantes descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como agentes estabilizantes ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los agentes estabilizantes pueden incluir, aunque no de forma limitativa, emulsionantes y tensioactivos.

En algunas realizaciones, se puede incluir un protector en las composiciones. Los protectores son agentes que protegen un principio farmacéuticamente activo (p. ej., una sustancia o un compuesto terapéuticamente eficaz) de una condición no deseable (p. ej., la inestabilidad provocada por congelación o liofilización, u oxidación). Los protectores pueden incluir, por ejemplo, crioprotectores, lioprotectores y antioxidantes. Los crioprotectores son útiles para prevenir la pérdida de potencia de un principio farmacéutico activo (p. ej., un compuesto de antraciclina) cuando una composición se expone a una temperatura por debajo de su punto de congelación. Por ejemplo, se podría incluir un crioprotector en una formulación liofilizada reconstituida de modo que la formulación pueda congelarse antes de la dilución para la administración intravenosa. Los crioprotectores son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los crioprotectores descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como crioprotectores ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los crioprotectores incluyen, aunque no de forma limitativa, disolventes, tensioactivos, agentes encapsulantes, agentes estabilizantes, modificadores de viscosidad y combinaciones de los mismos. Los crioprotectores pueden incluir, por ejemplo, disacáridos (p. ej., sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa), polioles (p. ej., glicerol, manitol, sorbitol y dulcitol), glicoles (p. ej., etilenglicol, polietilenglicol y propilenglicol).

Los lioprotectores son útiles para estabilizar los componentes de una composición sometida a liofilización. Por ejemplo, una sustancia terapéuticamente eficaz podría liofilizarse con un lioprotector antes de la reconstitución. Los lioprotectores son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los lioprotectores descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como lioprotectores ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los lioprotectores incluyen, aunque no de forma limitativa, disolventes,

tensioactivos, agentes encapsulantes, agentes estabilizantes, modificadores de viscosidad y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ilustrativos pueden ser, por ejemplo, azúcares y polioles. La trehalosa, sacarosa, dextrano e hidroxipropil-beta-ciclodextrina son ejemplos no limitantes de lioprotectores.

5 Los antioxidantes son útiles para prevenir la oxidación de los componentes de una composición. La oxidación puede provocar la agregación de un producto farmacéutico u otros efectos perjudiciales para la pureza del producto farmacéutico o su potencia. Los antioxidantes son bien conocidos en la materia. Por consiguiente, los antioxidantes descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como antioxidantes ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los antioxidantes pueden ser, por ejemplo, ascorbato de sodio, citrato, tioles, metabisulfito y combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones, se puede incluir un agente modificador de la viscosidad en la composición. Los modificadores de la viscosidad cambian la viscosidad de las composiciones líquidas. Esto puede ser beneficioso porque la viscosidad desempeña un papel importante en la facilidad con la que se filtra una composición líquida. Una composición puede filtrarse antes de la liofilización y reconstitución, o después de la reconstitución. Los modificadores de la viscosidad son bien conocidos en la técnica. Por consiguiente, los modificadores de viscosidad descritos en el presente documento no pretenden constituir una lista exhaustiva, sino que se proporcionan simplemente como modificadores de viscosidad ilustrativos que pueden usarse en las composiciones. Los modificadores de la viscosidad incluyen disolventes, agentes solubilizantes, tensioactivos y agentes encapsulantes. Los modificadores de la viscosidad ilustrativos que pueden incluirse en las composiciones incluyen, aunque no de forma limitativa, *N*-acetil-DL-triptófano y *N*-acetil-cisteína.

#### Actividad antitumoral en modelos de ratones con xenoinjerto de tumores humanos

25 Los profármacos que se unen a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 demostraron una actividad antitumoral excepcional en estirpes celulares tumorales, con una  $CI_{50}$  de los fármacos libres AE-Ceto y AE-Éster en el intervalo picomolar (259 y 339 pM, respectivamente, comparable a la  $CI_{50}$  de 130 pM del compuesto original AE - véase el Ejemplo 4), así como en varios modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones atímicos que inducen remisiones parciales y completas en todos los xenoinjertos de tumor humano evaluados (véanse los ejemplos de las Figuras 13-23). Esto incluyó tumores pequeños con volúmenes iniciales en el intervalo de aproximadamente 130-170 mm<sup>3</sup> y también tumores grandes con volúmenes iniciales de hasta aproximadamente 380 mm<sup>3</sup>. Además, en la mayoría de los casos, el tratamiento con los profármacos que se unen a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 indujo remisiones a largo plazo y una disminución del volumen tumoral relativo (VTR). El compuesto original auristatina E (AE) fue principalmente inactivo en los modelos probados o solo mostró una inhibición tumoral marginal. Los procedimientos experimentales y los resultados obtenidos en los modelos de ratones portadores de tumores se describen en detalle en el Ejemplo 5 y las Figuras 13-23.

#### Métodos de tratamiento

40 Los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento son útiles para una variedad de aplicaciones clínicas.

45 Los compuestos y las composiciones descritos en el presente documento pueden inducir una inhibición prolongada o a largo plazo del crecimiento tumoral. En determinadas realizaciones, la inhibición prolongada o a largo plazo del crecimiento tumoral se produce sin pérdida de peso corporal ni toxicidad alguna o simplemente marginal de la médula ósea.

50 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad maligna que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene un compuesto descrito en el presente documento. Por ejemplo, algunas realizaciones incluyen un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad seleccionada entre un cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos y otros microorganismos, que comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la presente divulgación.

55 La divulgación proporciona métodos para tratar una afección o enfermedad en un paciente, siendo dicha afección o enfermedad seleccionada entre un cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos u otros microorganismos, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

60 En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia hemática o un cáncer sólido. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple o melanoma.

65 En algunas realizaciones, el cáncer es adenocarcinoma, melanoma uveal, leucemia aguda, neuroma acústico, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, cáncer pancreático, tumor del tejido conjuntivo, cáncer

de vejiga, carcinoma bronquial, carcinoma bronquial no microcítico, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma del cuerpo uterino, síndrome CUP, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma de endometrio, cáncer de vesícula biliar, carcinomas de vesícula biliar, cáncer de útero, cáncer de cuello del útero, tumores de cuello, nariz y oído, neoplasias hemáticas, tricoleucemia, cáncer de uretra, cáncer de piel, gliomas, cáncer de testículos, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, cáncer de huesos, carcinoma colorrectal, tumores de cabeza/cuello, carcinoma de colon, craneofaringoma, cáncer de hígado, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de estómago, cáncer de colon, meduloblastoma, melanoma, meningioma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásicos, osteosarcoma, carcinoma de ovario, carcinoma pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de lengua, carcinoma de ovario o cáncer de ganglios linfáticos.

Algunas realizaciones incluyen un método para aumentar la concentración de un metabolito de un compuesto en un tumor, que comprende administrar el compuesto de acuerdo con la presente divulgación.

### Ejemplificación

A continuación se describen de forma general algunos aspectos de la presente divulgación, y estos se comprenderán más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de determinadas características y realizaciones de la presente divulgación y no pretenden ser limitativos.

### Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, usando nada más que la experimentación habitual, numerosos equivalentes a los compuestos, composiciones y métodos de uso de los mismos descritos en el presente documento. Tales equivalentes se consideran dentro del ámbito de la presente divulgación.

### Ejemplos

#### 30 Materiales y métodos para la preparación y el análisis de los compuestos

Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno, salvo que se especifique lo contrario. Se utilizaron reactivos disponibles en el mercado sin purificación adicional, salvo que se especifique lo contrario. Los disolventes anhidros se adquirieron en forma anhidra (diclorometano, dimetilsulfóxido, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, etc.) y todos los demás disolventes utilizados fueron de calidad reactiva o de calidad de HPLC o LCMS.

El material de vidrio y las barras agitadoras generalmente se secaron en un horno a 110 °C durante al menos 12 h y luego se enfriaron en una atmósfera de nitrógeno antes de su uso, según procediera. Todas las demás reacciones se realizaron en matraces de fondo redondo sellados con septos de goma. Se utilizaron jeringas de plástico o pipetas de vidrio para transferir los reactivos líquidos. Las reacciones se agitaron magnéticamente utilizando barras agitadoras magnéticas recubiertas de teflón. Las soluciones orgánicas se concentraron a presión reducida usando un rotavapor KNF RC 600 y Heidolph Hei-VAP.

La cromatografía en columna ultrarrápida se realizó con cartuchos de gel de sílice ultrarrápidos Biotage® SNAP Ultra y SNAP Ultra C18 preempaquetados, utilizando los sistemas de purificación ultrarrápida Isolera™ One de Biotage® y Isolera™ SL de Biotage® (a gran escala).

El valor de pH de una solución se midió a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH WTW Inolab 7310 con electrodos mic-D SenTix®.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó utilizando un sistema de HPLC Shimadzu Nexera XR equipado con un detector de matriz de fotodiodos SPD-M20A y se controló a 220 nm, salvo que se especifique lo contrario.

Los espectros de masas de baja resolución (LRMS) se recogieron mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (LCMS) en un espectrómetro Bruker Amazon SL o Thermo Fisher LCQ (ionización por electropulverización, ESI). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un instrumento microTOF de Bruker utilizando un espectrómetro de masas de cromatografía líquida-ionización por electronebulización y tiempo de vuelo (ESI-TOF). Los análisis elementales se llevaron a cabo en un Leco TruSpec® CHNS Macro con detector de infrarrojos para C, H y S; y con un detector de conductividad térmica (TCD) para N.

La liofilización se llevó a cabo utilizando un liofilizador Martin Christ Alpha o Epsilon 2-4 LSCplus.

La centrifugación se llevó a cabo utilizando una centrífuga Eppendorf 5810 R, refrigerada, con Rotor A-4-81, 230 V/50 de 60 Hz.

El contenido de ácido trifluoroacético (TFA) se midió mediante cromatografía iónica y el contenido de agua se midió mediante coulometría Karl Fischer (KF).

- 5 Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro de 400 MHz: Bruker Avance 400 Ultrashield (400 MHz en  $^1\text{H}$ , 100 MHz en  $^{13}\text{C}$ ). Todos los valores de desplazamientos químicos de protones se expresan en partes por millón ( $\delta$ ) y están referenciados con respecto a los protones deuterados en DMSO- $d_6$  ( $\delta$  2,50). Todos los valores de los desplazamientos químicos del carbono se informan en partes por millón ( $\delta$ ) y están referenciados con respecto a las resonancias de carbono en DMSO- $d_6$  ( $\delta$  39,52). Los  
10 datos de RMN se representan de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, p = penteto, m = multiplete, a = ancho, dd = doblete de dobletes, td = triplete de dobletes), constante de acoplamiento = J (Hz = hercios) e integración.

### Métodos de HPLC

- 15 Método 1: Método de HPLC para determinar la pureza de los conectores intermedios y del producto final Sulf07. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 95:5, acetato de amonio 10 mM a pH 7,0; acetonitrilo, fase móvil B: 95:5, acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-2,5 min: 0 %, 2,5-18 min: 0-45 %, 18-20 min: 45-75 %, 20-24 min: 75 %, 24-26 min: 75 %-0 %, 26-30 min: 0 %, 30 minutos: fin del método, caudal = 1,0 ml/min.

- Método 2: Método de HPLC para el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 95:5 de acetato de amonio 10 mM a pH 7,0; acetonitrilo, fase móvil B: 95:5, acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-0,5 min: 30 %, 0,5-9 min: 30-95 %, 9-11 min: 95 %, 11-12,5 min: 95-30 %, 12,5-15 min: 30 %, 15 minutos: fin del método, caudal = 1,0 ml/min.

- Método 3: Método de LCMS para los conectores intermedios y el producto final Sulf07. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (150 × 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 95:5 de acetato de amonio 10 mM a pH 7,0; acetonitrilo, fase móvil B: 95:5, acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-2,5 min: 0 %, 2,5-18 min: 0-45 %, 18-20 min: 45-75 %, 20-24 min: 75 %, 24-26 min: 75 %-0 %, 26-30 min: 0 %, 30 minutos: fin del método. Caudal = 0,4 ml/min.

- Método 4: Método de LCMS para el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3. Columna: Phenomenex Luna Omega Polar C18 (50 × 2,1 mm, 1,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 99,9/0,1 de agua: ácido fórmico, fase móvil B: 99,9/0,1 de acetonitrilo: ácido fórmico. Gradiente de elución de la fase B: 0-0,5 min: 20 %, 0,5-3,5 min: 20-100 %, 3,5-5,0 min: 100 %, 5,0-5,5 min: 100-20 %, 5,5-7,0 min: 20 %, 7 minutos: fin del método. Caudal = 0,4 ml/min.

- Método 5: Método de LCMS para experimentos de unión a plasma. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (50 × 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 95:5 de acetato de amonio 10 mM a pH 7,0; acetonitrilo, fase móvil B: 95:5, acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-1,0 min: 0 %, 1,0-7,0 min: 0-75 %, 7,0-7,5 min: 75-90 %, 7,5-8,5 min: 90-0 %, 8,5-10,0 min: 0 %, 10 minutos: fin del método, caudal = 0,4 ml/min.

- Método 6: Método de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para la unión al plasma. Columna: MabPac HIC-20 (250 × 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM A pH 8,0, fase móvil B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM a pH 8,0 e isopropanol al 20 %. Gradiente de elución de la fase B: 0-2,0 min: 0 %, 2,0-10,0 min: 0-50 %, 10,0-13,0 min: 50-60 %, 13,0-17,0 min: 60-100 %, 17,0-20,0 min: 100 %, 20,0-25,0 min: 100-0 %, 25,0-30,0 min: 0 %, 30 minutos: fin del método, caudal = 1 ml/min.

- Método 7: Método de HPLC para el perfil de estabilidad del pH del conjugado de fármaco de albúmina. Columna: Phenomenex Aeris WP C18 (250 × 4,6 mm, 3,6  $\mu\text{m}$ , poro ancho), gradiente: fase móvil A: tampón Tris 20 mM a pH 8,0, fase móvil B: UHPLC con 90 % de acetonitrilo y 10 % de agua. Gradiente de elución de la fase B: 0-0,5 min: 25 %, 0,5-2,5 min: 25-35 %, 2,5-16,0 min: 35-85 %, 16,0-17,0 min: 85-95 %, 17,0-20,0 min: 95 %, 20,0-25,0 min: 95-25 %, 25,0-30,0 min: 25 %, 30 minutos: fin del método, caudal = 1,0 ml/min.

- Método 8: Método de HPLC para la degradación acelerada de formulaciones de p.a. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: 95:5 de acetato de amonio 10 mM a pH 7,0; acetonitrilo, fase móvil B: 95:5, acetonitrilo: acetato de amonio 10 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-2,5 min: 20 %, 0,5-9 min: 20-75 %, 9-11 min: 75 %, 11-12,5 min: 75-20 %, 12,5-15 min: 20 %, 15 minutos: fin del método, caudal = 1,0 ml/min.

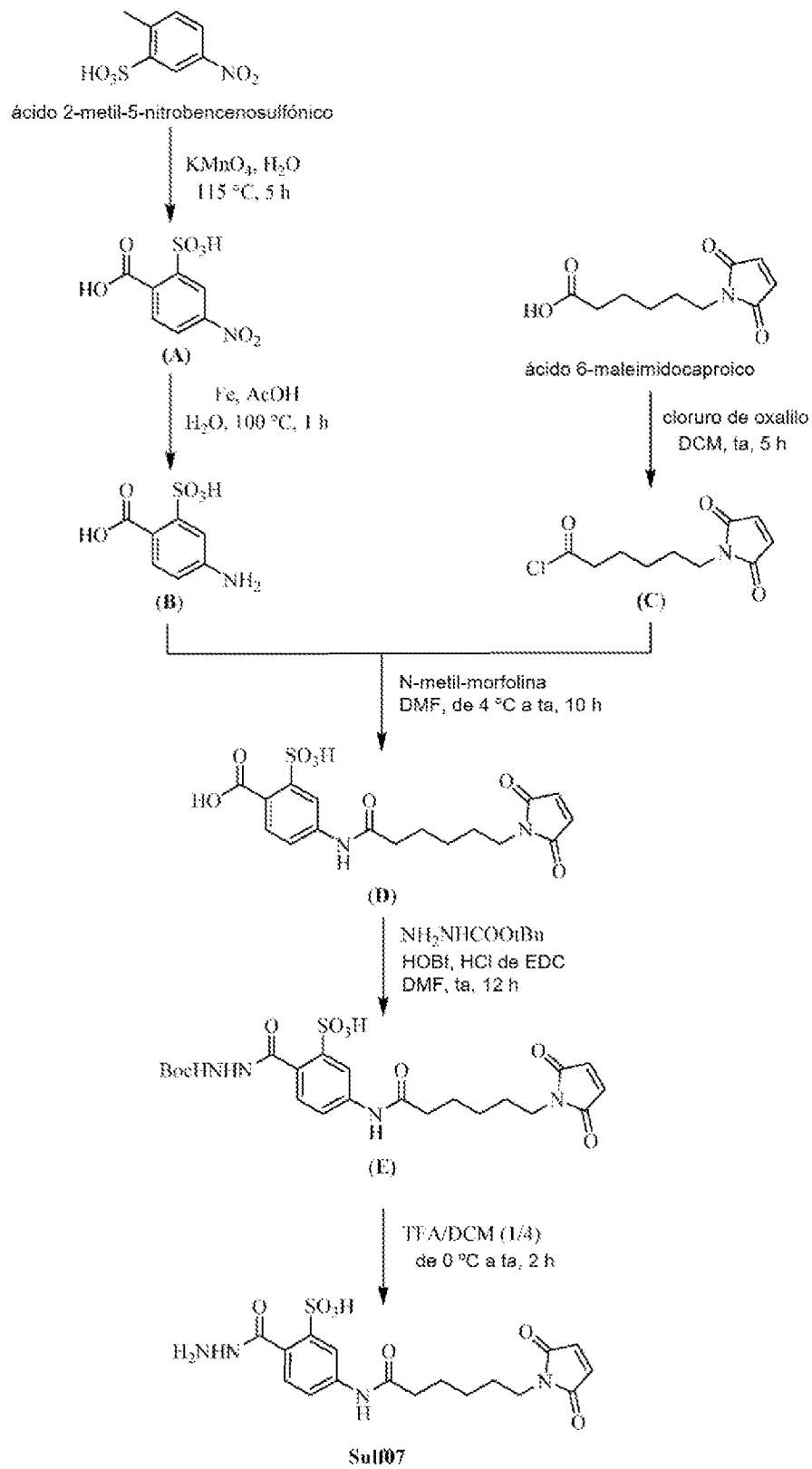
- Método 9: Método de HPLC para determinar la pureza de los conectores intermedios y la pureza del producto final Sulf07 preparado de acuerdo con la vía C. Columna: Fenomenex Kinetex Polar C18 (150 × 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å), gradiente: fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en  $\text{H}_2\text{O}$ , fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo. Gradiente de elución de la fase B: 0-5,5 min: 1 %, 5,5-20 min: 1-40 %, 20-22 min: 40-65 %, 22-24 min: 65 %, 24-27 min: 65 %-1 %, 27-30 min: 1 %, 30 minutos: fin del método, caudal = 1,0 ml/min.

## ES 2 970 618 T3

Método 10: Método de HPLC para determinar la pureza de AE-Ceto-Sulf07 preparado a partir del conector Sulf07 obtenido de acuerdo con la vía C. Columna Kinetex Polar C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 mm × 4,6 mm), gradiente: fase móvil A: 95:5 de acetato de amonio 5 mM a pH 7,0: metanol, fase móvil B: 95:5 de metanol: acetato de amonio 5 mM a pH 7,0. Gradiente de elución de la fase B: 0-2,5 min: 60 %, 2,5-18 min: 60-80 %, 18-22 min: 80-95 %, 22-26 min: 95 %, 26-30 min: fin del método. Caudal = 1,0 ml/min. Horno de columna: 37 °C.

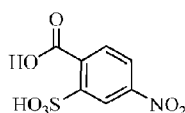
### Ejemplo 1

10 Se preparó Sulf07, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)-bencenosulfónico), como se describe a continuación y se muestra en el Esquema 1 de acuerdo con la vía A.



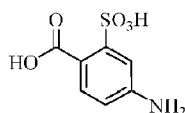
Esquema 1, Vía A

Síntesis de ácido 4-nitro-2-sulfobenzoico (A)



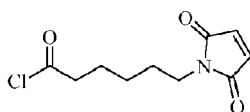
A una solución agitada de permanganato de potasio (72 g, 460 mmol, 4,5 eq, Sigma Aldrich) en agua Millipore (450 ml), se añadió en 10 segundos una solución de hidrato de ácido 4-nitro-2-sulfónico (26 g, 102 mmol, 1,0 eq, Abcr) en agua Millipore (100 ml). La mezcla púrpura resultante se agitó a 115 °C durante 5 h y se volvió marrón después de este tiempo. La HPLC (método 1, 220 nm) confirmó que la reacción se completó después de 5 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. El sólido marrón formado durante la reacción se eliminó mediante filtración con succión sobre un lecho de Celite, se lavó con agua Millipore (300 ml) y la solución del filtrado marrón/amarillo se concentró a ~125 ml a presión reducida a 40 °C, se acidificó lentamente con solución de HCl 5 M hasta que se formó una suspensión blanca (~pH 1). A continuación, se calentó la suspensión blanca a 100 °C hasta que se obtuvo una solución transparente que se dejó reposar en un baño de hielo durante 10 minutos hasta que se formó un sólido blanco. El sólido blanco se obtuvo mediante filtración por succión usando un filtro poroso (tamaño de poro 4). A continuación, se secó el sólido blanco bajo alto vacío durante 10 h, dando **A**. Rendimiento: 18 g, 72 %. Pureza según la HPLC (método 1, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 245,98. Encontrado: 245,83.

#### Síntesis de ácido 4-amino-2-sulfobenzoico (**B**)



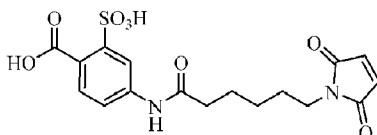
Se calentó una suspensión agitada de ácido 4-nitro-2-sulfobenzoico **A** (13 g, 51 mmol, 1,0 eq) en agua Millipore (75 ml) a reflujo (120 °C) hasta su completa disolución. A esa temperatura, se añadió ácido acético (7,2 ml, Sigma Aldrich), seguido de polvo de hierro (9,5 g, 180 mmol, 3,5 eq, Sigma Aldrich) que se añadió en porciones (~1 g/1,0 min) durante 10 min para evitar una reacción exotérmica. A continuación, la mezcla de reacción se dejó en agitación a reflujo durante 1 h. Durante este tiempo, se formó un sólido marrón y el análisis por HPLC (método 1, 220 nm) confirmó que la reacción se había completado. El sólido marrón se eliminó mediante filtración por succión directamente sobre un lecho corto de Celite (cuando todavía estaba caliente) y se lavó adicionalmente con agua caliente (3 × 50 ml). A continuación, se filtró el filtrado a través de papel de filtro Whatman (11 μm). El filtrado resultante se concentró a presión reducida a 50 °C hasta un volumen de ~100 ml. Se añadió gota a gota HCl concentrado (~1 ml/2,0 min) hasta que se alcanzó el pH 1 y precipitó un sólido blanco/amarillo. La suspensión se dejó a 4 °C durante 1 h. El sólido se recogió mediante filtración por succión usando un filtro poroso (tamaño de poro 4) y se secó a alto vacío durante 10 h para proporcionar **B** en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 9 g, 81 %. Pureza según la HPLC (método 1, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>5</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 216,00. Encontrado: 216,16.

#### Síntesis de cloruro de 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoilo o EMC-Cl (**C**)



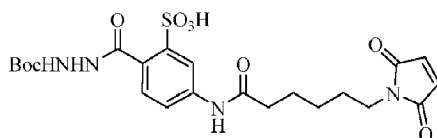
A una solución en agitación de ácido 6-maleimidocaproico (EMC) (33 g, 156 mmol, 1,0 eq, Alfa Aesar) en diclorometano seco (150 ml) a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió en 30 minutos (~1 ml/ 2 min) cloruro de oxalilo (15 ml, 171 mmol, 1,1 eq, Sigma Aldrich) usando un embudo de goteo. **Precaución:** durante el proceso de adición, se observó desprendimiento de gas. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El color de la solución de reacción cambió a amarillo oscuro durante el tiempo de reacción y el análisis por HPLC (método 1, 220 nm) confirmó que la reacción se completó después de 5 h. El disolvente se eliminó a presión reducida a 40 °C, dando un aceite que se secó a alto vacío durante la noche dando como resultado un compuesto solidificado. El sólido de color marrón claro obtenido se trituró con una espátula y se secó durante 20 h más a alto vacío, dando **C** en forma de un sólido microcristalino amarillo. El compuesto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. Rendimiento: 34 g, 95 %. Pureza según la HPLC (método 1, 220 nm) >95 % en forma del éster metílico. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub> (en forma de éster metílico) [M+H]<sup>+</sup>: 226,10. Encontrado: 225,97.

#### Síntesis del ácido 4-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-sulfobenzoico (**D**)



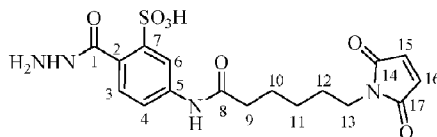
Se disolvió **B** (18,5 g, 85 mmol, 1,0 equiv.) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (300 ml) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió con un baño de hielo y se dejó en agitación durante 10 minutos hasta alcanzar los 4 °C. A continuación, se añadió 4-metilmorfolina (18,69 ml, 170 mmol, 2,0 eq, Sigma Aldrich) a la solución enfriada gota a gota (~1 ml/3,5 min) en 1 h usando un embudo de goteo. La mezcla adquirió un color marrón oscuro cuando se completó la adición y, a esta mezcla de color marrón oscuro, se añadió gota a gota (~0,5 g/min) en 1 h utilizando un embudo de goteo una solución de **C** (29,28 g, 127 mmol, 1,5 eq) en *N,N*-dimetilformamida (200 ml) anhidra. La mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente hasta temperatura ambiente durante la noche y luego se dejó agitar a temperatura ambiente durante 10 h. Después de la conversión completa de la reacción como lo indica la HPLC (método 1, 220 nm), la solución de reacción se dispensó en 8 tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 20 minutos a 10 °C y 4000 rpm. Se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los sólidos en 10 ml de *N,N*-dimetilformamida por cada tubo y se centrifugaron nuevamente durante 20 min a 10 °C y 4000 rpm. Todos los sobrenadantes se combinaron y se concentraron a presión reducida a 50 °C durante 3 h, obteniéndose un sólido de color naranja claro (rendimiento: 34 g, pureza según la HPLC (método 1, 220 nm) 66 %). Este sólido se resuspendió en metanol (250 ml), se transfirió a 8 tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 20 minutos a 10 °C y 4000 rpm. Se eliminaron los sobrenadantes y los sólidos se resuspendieron en 5 ml de metanol por cada tubo y se centrifugaron nuevamente durante 20 min a 10 °C y 4000 rpm. Todos los sólidos se combinaron y se secaron a alto vacío durante 24 h, obteniéndose **D** en forma de un sólido cristalino de color amarillo. Rendimiento: 24 g, 37 %. Pureza según la HPLC (método 1, 220 nm) 97 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 409,08. Encontrado: 409,13.

- 20 Síntesis de ácido 2-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazin-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)bencenosulfónico o conector protegido con BOC (**E**)



- 25 A una solución de **D** (17 g, 41,4 mmol, 1,0 eq) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (350 ml) bajo atmósfera de nitrógeno, se añadió clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC-HCl) (8,72 g, 45,5 mmol, 1,1 eq, Roth) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (6,15 g, 45,5 mmol, 1,1 eq, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 30 min a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió carbazato de *tert*-butilo (7,12 g, 53,9 mmol, 1,3 eq, Sigma Aldrich) y la solución cambió de un color amarillo claro a un color rojizo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de este tiempo, se confirmó la conversión completa de la reacción mediante HPLC (método 1, 220 nm). El disolvente se eliminó a presión reducida a 40 °C y luego a alto vacío a temperatura ambiente durante 1 h, para producir un aceite de color marrón púrpura que se purificó con un sistema de purificación ultrarrápida con dos cartuchos SNAP Ultra de 340 g preenvasados. La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de gradiente lineal, desde el 100 % de diclorometano hasta el 90 %/10 % de diclorometano/metanol en 60 volúmenes de columna. Los tubos que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron a presión reducida a 40 °C durante 1 h y a alto vacío durante otras 6 h, obteniéndose **E** en forma de un sólido espumoso de color amarillo. Rendimiento: 9 g, 17,1 mmol, 42 %. HPLC (método 1, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 523,16. Encontrado: 523,15.

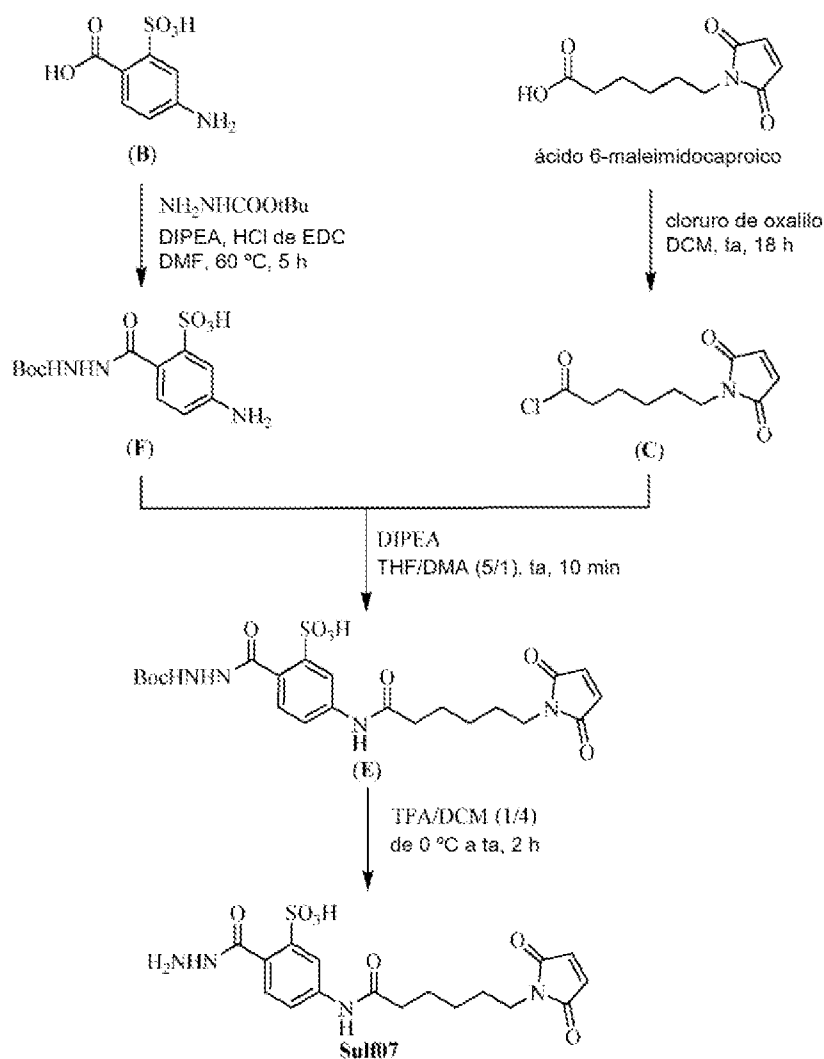
- 40 Síntesis del conector **Sulf07**, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazinacarbonil)bencenosulfónico



- 45 A una solución amarilla de **E** (10,2 g, 19,4 mmol, 1,0 eq) en diclorometano anhidro (30 ml), que se enfrió hasta 4-5 °C, se añadió gota a gota (~1 ml/2,0 min), en 30 min, ácido trifluoroacético (15 ml, Roth). Después de la adición, se retiró el baño frío y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Después de este tiempo, se confirmó la finalización de la reacción mediante HPLC (método 1, 220 nm). La mezcla de reacción se vertió gota a gota en 6 tubos Falcon, cada uno ~35 ml de éter dietílico frío. Inmediatamente se formó un precipitado de color blanco. Los tubos se dejaron reposar a 4 °C durante 3 h. Después de centrifugar los tubos Falcon durante 20 minutos a 10 °C y 4000 rpm, se eliminaron los sobrenadantes y los sólidos se volvieron a suspender en 5 ml de éter dietílico por cada tubo y se centrifugaron nuevamente (4000 rpm, 20 min, 10 °C). Los sobrenadantes se eliminaron nuevamente y los sólidos se recogieron y se secaron a alto vacío durante 20 h para proporcionar el conector **Sulf07** en forma de un sólido microcristalino blanco. Rendimiento: 10 g, 23,6 mmol, 96 %. HPLC (método 1, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 425,11. Encontrado: 425,07. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 423,11. Encontrado: 423,12. HRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 425,1125. Encontrado: 425,1125. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 423,0978. Encontrado: 423,0980.

La estructura para, ácido 5-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexaanamido)-2-(hidrazina-carbonil)bencenosulfónico, **Sulf07**, se confirmó mediante RMN de  $^1\text{H}$ : RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  11,94 (s, 1H; C1-NH), 10,27 (s, 1H; C8-NH), 8,01 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H; C4-CH), 7,93 (dd,  $J = 8,5, 2,2$  Hz, 1H; C6-CH), 7,68 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H; C7-CH), 7,00 (s, 2H; C15-CH, C16-CH), 3,40 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H; C13-CH $_2$ ), 2,32 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H; C9-CH $_2$ ), 1,60 (p,  $J = 7,5$  Hz, 2H; C10-CH $_2$ ), 1,52 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H; C12-CH $_2$ ), 1,26 (c,  $J = 8,8$  Hz, 2H; C11-CH $_2$ ); RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  172,20 (C8), 171,54 (C14, C17), 167,59 (C1), 145,73 (C5), 142,09 (C3), 134,90 (C15, C16), 132,09 (C7), 123,79 (C2), 119,44 (C6), 117,47 (C4), 37,42 (C13), 36,65 (C9), 28,22 (C12), 26,21 (C11), 24,90 (C10). Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ ; C, 45,71; H, 4,26; N, 11,85; S, 6,78. Encontrado: C, 46,2917; H, 4,4836; N, 12,8879; S, 6,7886. Contenido de TFA <2 % (p/p).

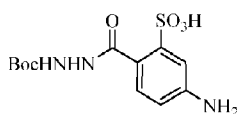
El **Sulf07**, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexaanamido)-2-(hidrazina-carbonil)bencenosulfónico, se preparó como se describe a continuación y se muestra en el Esquema 2 de acuerdo con la vía B.



Esquema 2, Vía B

15

Síntesis de ácido 5-amino-2-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazina-1-carbonil)bencenosulfónico (F)

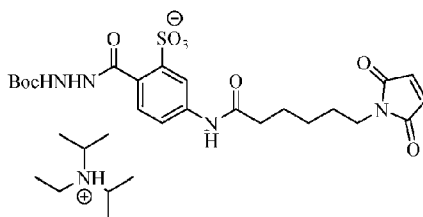


20

A una suspensión de ácido 4-amino-2-sulfobenzoico **B** (50,00 g, 230,20 mmol, 1,00 eq) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (DMF, 1000 ml), se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA, 40,20 ml, 29,75 g, 230,20 mmol, 1,00 eq) durante 5 minutos. A continuación, se añadió EDC-HCl (48,54 mg, 253,21 mmol, 1,10 eq) y la mezcla se agitó a 23 °C durante

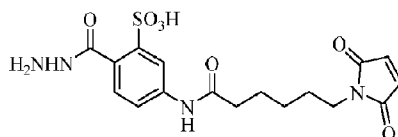
30 min. Después, se añadió carbazato de *tert*-butilo (33,46 g, 253,18 mmol, 1,10 eq) y la mezcla se calentó hasta 70 °C y se agitó durante 2 h. La segunda porción de EDC-HCl (24,31 g, 126,68 mmol, 0,55 eq) y se añadió carbazato de *tert*-butilo (16,76 mg, 126,68 mmol, 0,55 eq) y la mezcla de reacción se agitó adicionalmente a 70 °C durante 14 h. La reacción se enfrió hasta 23 °C y se filtró a través de Celite® 545 (100 gramos). Se lavó adicionalmente el Celite®  
 5 545 adicionalmente con 700 ml de metanol. El filtrado se concentró a presión reducida y se purificó mediante un sistema de purificación instantánea utilizando siete cartuchos SNAP Ultra de 340 g preenvasados. La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de gradiente lineal, del 100 % de diclorometano al 70 % de diclorometano/30 % de metanol, dando el compuesto del título **F** en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 32,50 g, 98,09 mmol, 42,6 %, HPLC (método 1, 220 nm) >97 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 330,08. Encontrado: 330,17.

10 Síntesis de 2-(2-(*tert*-butoxi-carbonil)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)bencenosulfonato de *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-aminio (**E**)



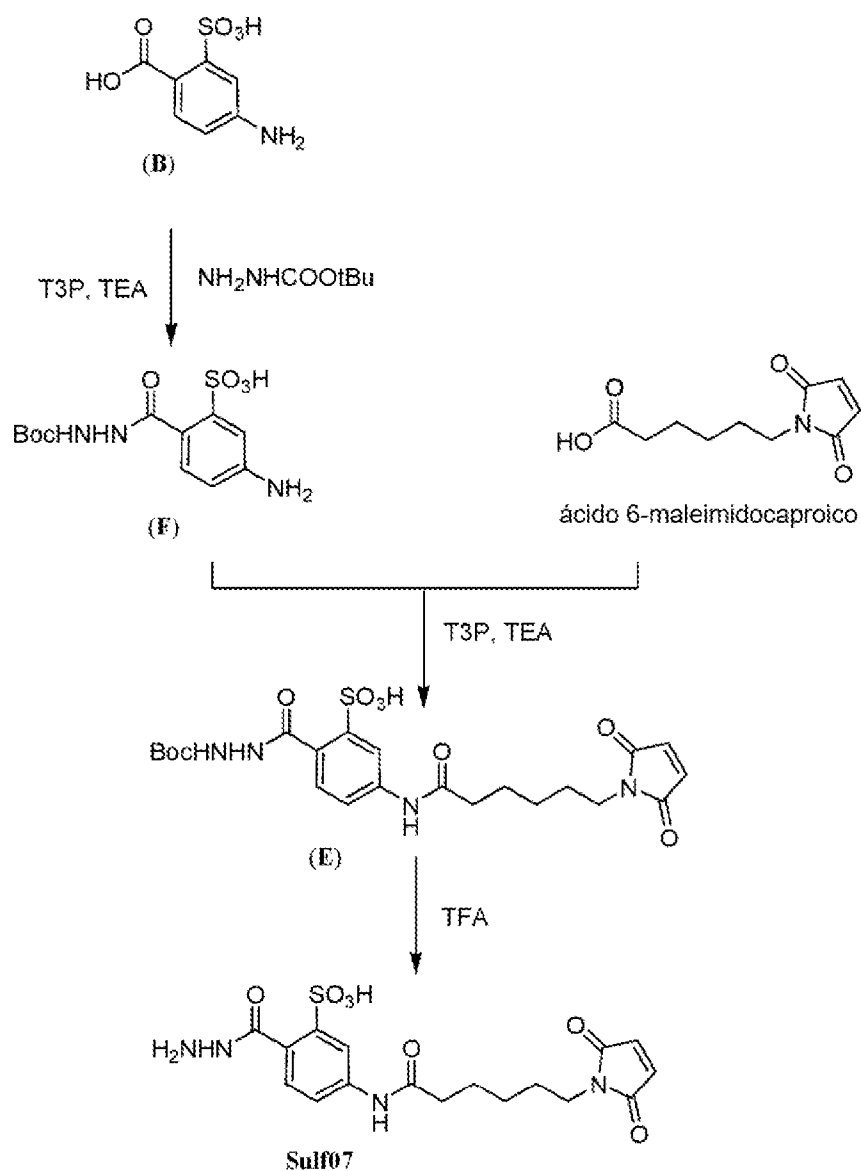
15 A una solución de **F** (26,97 g, 81,40 mmol, 1,00 eq) en una mezcla de dimetilacetamida anhidra (110 ml) y tetrahidrofurano anhidro (THF, 275 ml) se añadió una solución de cloruro de ácido 6-maleimidocaproico **C** (26,60 g, 115,82 mmol, 1,42 eq) en tetrahidrofurano anhidro (165 ml) en una porción a temperatura ambiente. La solución de reacción transparente se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadió la mezcla de reacción agitando en dos matraces cónicos de 2 l, conteniendo cada uno éter diisopropílico (1100 ml) y DIPEA (10,15 ml). Una vez que el aceite se hubo asentado, se vertió cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el aceite con éter diisopropílico (2 × 100 ml), se disolvió en metanol, se combinó y el disolvente se eliminó bajo alto vacío. El aceite resultante se purificó mediante un sistema de purificación ultrarrápida utilizando seis cartuchos SNAP Ultra de 340 g preenvasados. La purificación se llevó a cabo utilizando un sistema de gradiente lineal, desde el 100 % de diclorometano hasta el 80 % de diclorometano/20 % de metanol, dando el compuesto del título **E** en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 24,00 g, 36,71 mmol, 45,1 %, HPLC (método 1, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 523,15. Encontrado: 523,30.

30 Síntesis de ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)bencenosulfónico (**Sulf07**)



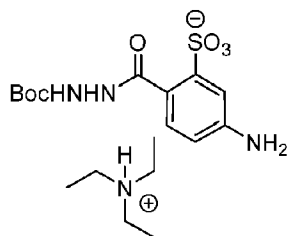
35 A una solución fría (4 °C) de **E**, (21,00 g, 32,12 mmol, 1,00 eq) en diclorometano (150 ml) se añadió ácido trifluoroacético (25,00 ml, 37,25 g, 326,70 mmol, 10,17 eq) durante 1 h. A continuación, se dejó que la reacción se calentara gradualmente (durante 30 min) hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a través de un embudo de decantación durante 1 h a un matraz cónico de 2 l que contenía éter diisopropílico (1,4 l) a 0 °C. El sólido blanco resultante se filtró a través de un embudo con fritas de porosidad de 4 Å y se lavó secuencialmente con diclorometano (2 × 1000 ml) y éter diisopropílico (2 × 1000 ml). El sólido se dejó secar en el embudo de fritas durante la noche a temperatura ambiente. El secado adicional se llevó a cabo en alto vacío a 25 °C durante 2 h. El producto final **Sulf07** se obtuvo en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 13,58 g, 32,00 mmol, 99,6 %, HPLC (método 1, 220 nm) >96 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 423,10. Encontrado: 423,21.

45 El **Sulf07**, ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)bencenosulfónico, se preparó como se describe a continuación y se muestra en el Esquema 2 de acuerdo con la vía C.



Esquema 2, Vía C

Síntesis de ácido 5-amino-2-(2-(*tert*-butoxicarbonil)hidrazina-1-carbonil)benzenosulfónico (F)



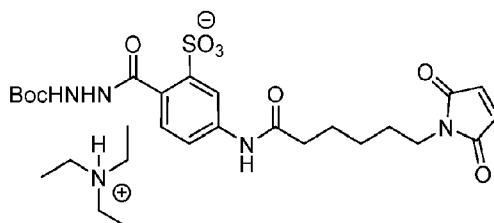
5

A una suspensión de **B** (30,00 g, 138,12 mmol, 1,00 eq) en acetonitrilo anhidro (600 ml) se añadió trietilamina (41,93 g, 57,76 ml, 414,37 mmol, 3,00 eq) y la mezcla se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió carbazato de *tert*-butilo (27,38 g, 207,19 mmol, 1,50 eq) y la mezcla se enfrió a -35 °C. A esta temperatura, se añadió gota a gota una solución de anhídrido propilfosfónico, T3P, (114,27 g, 106,79 ml, 179,56 mmol, sol. al 50 % en acetato de etilo, 1,3 equiv.) durante 1 h. La reacción se agitó a -35 °C durante 2 h. Se dejó que la mezcla se calentara a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite® 545 (100 g). El Celite® se lavó adicionalmente con acetonitrilo (500 ml). Ambos filtrados se combinaron y concentraron hasta 250 ml. La solución se dividió en partes iguales en 6 porciones y el disolvente se eliminó a presión reducida. Cada porción se disolvió en diclorometano que contenía un 1 % de Et<sub>3</sub>N (50 ml) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida NP en un sistema One Flash Purification Isolera™ de Biotage,

15

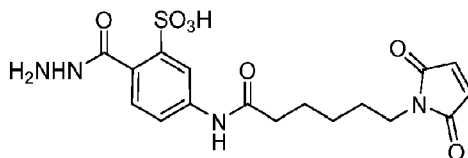
con una columna SNAP Ultra de 340 g preenvasada, utilizando un gradiente escalonado del 2 % al 12 % de metanol (que contiene 1 % NEt<sub>3</sub>) en DCM (que contiene 1 % de NEt<sub>3</sub>) en 7 volúmenes de columnas. A continuación, se combinaron las fracciones purificadas de todas las porciones, se eliminó el disolvente a presión reducida y se secó el sólido a alto vacío, dando el compuesto del título **F** en forma de un sólido blanquecino. Rendimiento: 53,25 g, 108,0 mmol, 78,2 % (la RMN en DMSO-d<sub>6</sub> mostró la presencia de 1,6 equivalentes de trietilamina). HPLC (método 9, 220 nm) >99 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 330,08. Encontrado: 330,08.

Síntesis de 2-(2-(*tert*-butoxi-carbonil)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)bencenosulfonato de *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-aminio (**E**)



A una mezcla de **F** (45,00 g, 91,24 mmol, 1,00 eq) y ácido 6-maleimidocaproico (19,27 g, 91,24 mmol, 1,00 eq) se añadieron en una porción acetonitrilo (450 ml), trietilamina (13,85 g, 19,08 ml, 136,86 mmol) y T3P (43,55 g, 40,70 ml, 136,86 mmol, sol al 50 % en acetato de etilo) a temperatura ambiente. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se eliminó a presión reducida. A continuación, el producto en bruto se purificó mediante un sistema de purificación ultrarrápida usando siete cartuchos de SNAP Ultra de 340 g preenvasados con un gradiente lineal desde el 2 % de metanol hasta el 15 % de metanol en diclorometano, dando el compuesto del título **E** en forma de un sólido blanquecino. Rendimiento: 30,55 g, 53,5 % (La RMN en DMSO-d<sub>6</sub> mostró la presencia de 1,1 eq de trietilamina). HPLC (método 9, 220 nm) >99 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 523,15. Encontrado: 523,26.

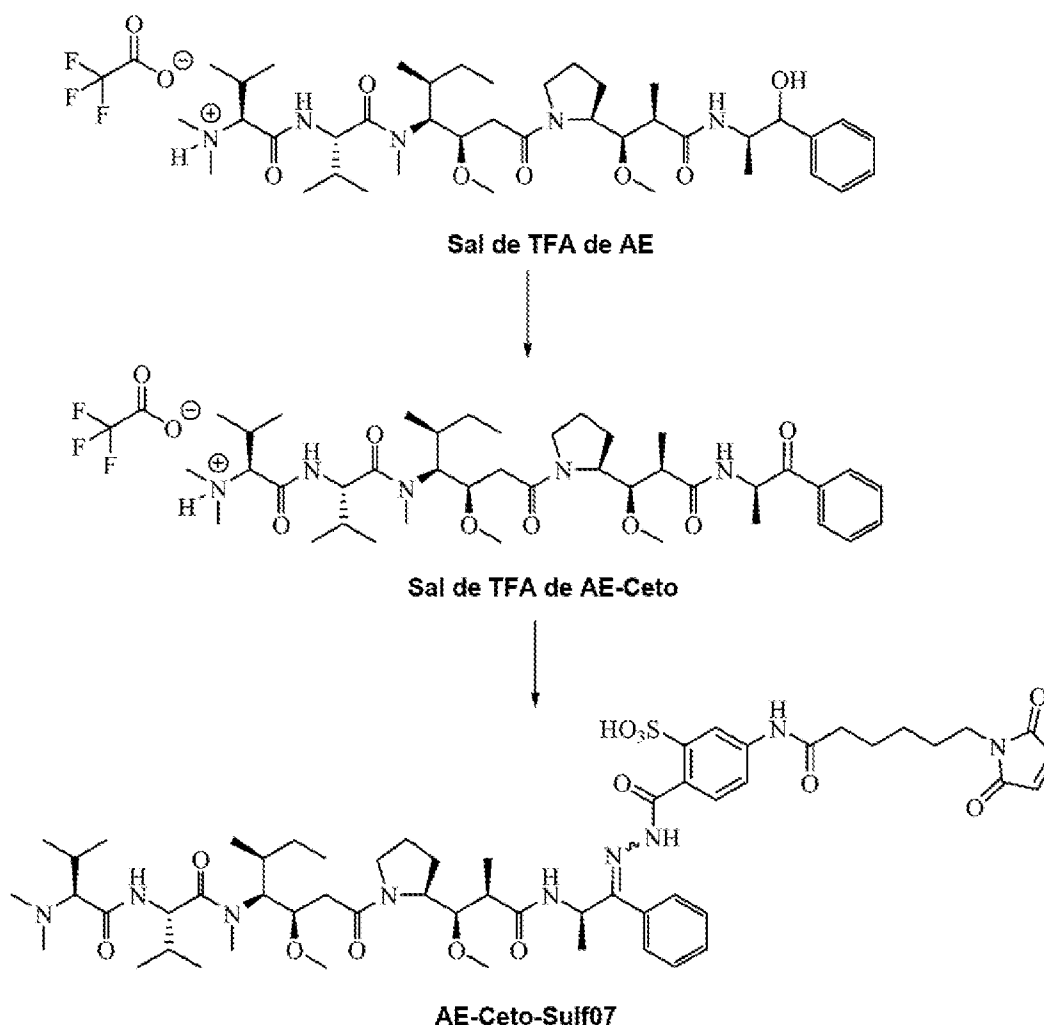
Síntesis de ácido 5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-2-(hidrazina-carbonil)bencenosulfónico (**Sulf07**)



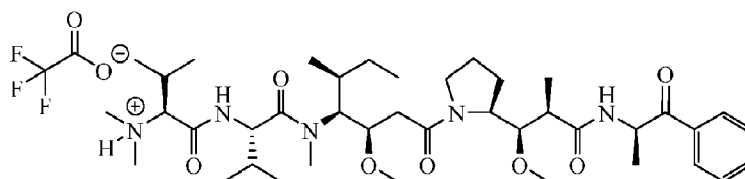
A una suspensión fría (4 °C) de **E**, (10,00 g, 15,98 mmol, 1,00 eq) en diclorometano (50 ml) se añadió ácido trifluoroacético (18,22 g, 12,31 ml, 159,81 mmol, 10,17 eq) durante 15 min. La mezcla se agitó adicionalmente a 4 °C durante 15 minutos y luego se dejó calentar gradualmente hasta temperatura ambiente y se agitó durante 150 min. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a través de un embudo de decantación a una solución agitada de éter metil-*tert*-butílico, MTBE, (400 ml) y diclorometano (200 ml). El sólido blanco resultante se filtró a través de un embudo con fritas de porosidad de 4 Å y se lavó secuencialmente con diclorometano (2 × 150 ml) y MTBE (1 × 50 ml), MeOH (1 × 50 ml) y nuevamente MTBE (2 × 150 ml). El sólido se dejó secar en el embudo con fritas durante la noche a temperatura ambiente durante 10 min. El secado adicional se llevó a cabo en alto vacío a 25 °C durante 18 h. El producto final **Sulf07** se obtuvo en forma de un sólido amarillo. Rendimiento: 5,786 g, 13,63 mmol, 98,7 %, HPLC (método 9, 220 nm) >96 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 423,10. Encontrado: 422,95.

## Ejemplo 2

El compuesto **AE-Ceto-Sulf07**, ácido 2-(2-((*R*)-2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropilideno)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)bencenosulfónico se sintetizó como se describe a continuación y se muestra en el Esquema 5.



5 Síntesis de 2,2,2-trifluoroacetato de (S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-3-metoxi-1-((S)-2-((1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-(((R)-1-oxo-1-fenilpropan-2-il)amino)propil)pirrolidin-1-il)-5-metil-1-oxoheptan-4-il)(metil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-N,N,3-trimetil-1-oxobutan-2-amino (**sal de TFA de AE-Ceto**)



10 Vía A: Síntesis de acuerdo con un procedimiento mejorado de la patente US6884869-B2

Se añadió clorocromato de piridinio (PCC) (382 mg, 1,772 mmol, 1,5 eq, Sigma Aldrich) a una solución de sal de TFA de auristatina E (1000 mg, 1,183 mmol, Levena Biopharma) en diclorometano anhidro (30 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 h. La LC-MS (método 4, modo positivo) mostró una conversión completa del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con 25 ml de diclorometano y se lavó con salmuera (3 x 20 ml). La fase acuosa se extrajo una vez con diclorometano (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se evaporaron a presión reducida a 40 °C. El residuo se disolvió en 7,5 ml de acetonitrilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con un cartucho SNAP Ultra C18 de 30 g preenvasado, utilizando un gradiente escalonado del 2 % al 40 % de acetonitrilo (+TFA al 0,1 %) en agua (+TFA al 0,1 %) en 16 volúmenes de columna. Se reunieron las fracciones de producto puro, el acetonitrilo se eliminó a presión reducida a 40 °C y el disolvente residual se liofilizó, dando un sólido blanco. Rendimiento: 530 mg, 53 %. HPLC de fase inversa (método 2, 220 nm): >95 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 730,51. Encontrado: 730,34.

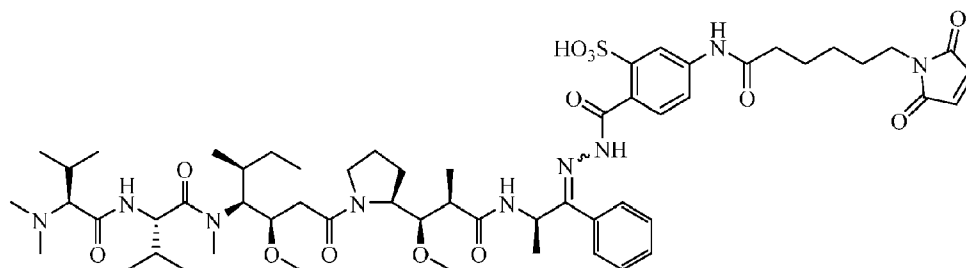
15

20

Vía B: Síntesis utilizando un agente oxidante unido a un polímero

IBX-poliestireno (1,13 g, 4,5 eq, 1,34 mmol, carga 1,18 mmol/g, Merck Novabiochem) se suspendió en diclorometano anhidro (7,5 ml) y se agitó suavemente durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió sal de TFA de AE (250 mg, 295,51  $\mu$ mol, Sage Chemical Co.) disuelta en diclorometano anhidro (5 ml) y la mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente. Después de 21 h, se observó la conversión completa del material de partida en el producto mediante HPLC (método 2, 220 nm). La resina se eliminó mediante filtración sobre papel de filtro plegado (calidad 3 hw, Sartorius), se lavó con diclorometano y los filtrados combinados se evaporaron a sequedad bajo presión reducida a 40 °C. El residuo oleoso se trituró con éter dietílico, formando un precipitado blanquecino que se secó a alto vacío, produciendo un sólido espumoso de color blanquecino. Rendimiento: 171 mg, 69 %, HPLC (método 2, 220 nm) >99 %. LRMS-ESI ( $m/z$ ) calculado para  $C_{40}H_{68}N_5O_7$  [M+H]<sup>+</sup>: 730,51. Encontrado: 730,69; calculado para  $C_{40}H_{68}N_5O_7$  [M-H]<sup>-</sup>: 728,50. Encontrado: 728,79.

Síntesis de ácido 2-(2-((R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropiliden)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2, 5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)benzenesulfónico (**AE-Ceto-Sulf07**)

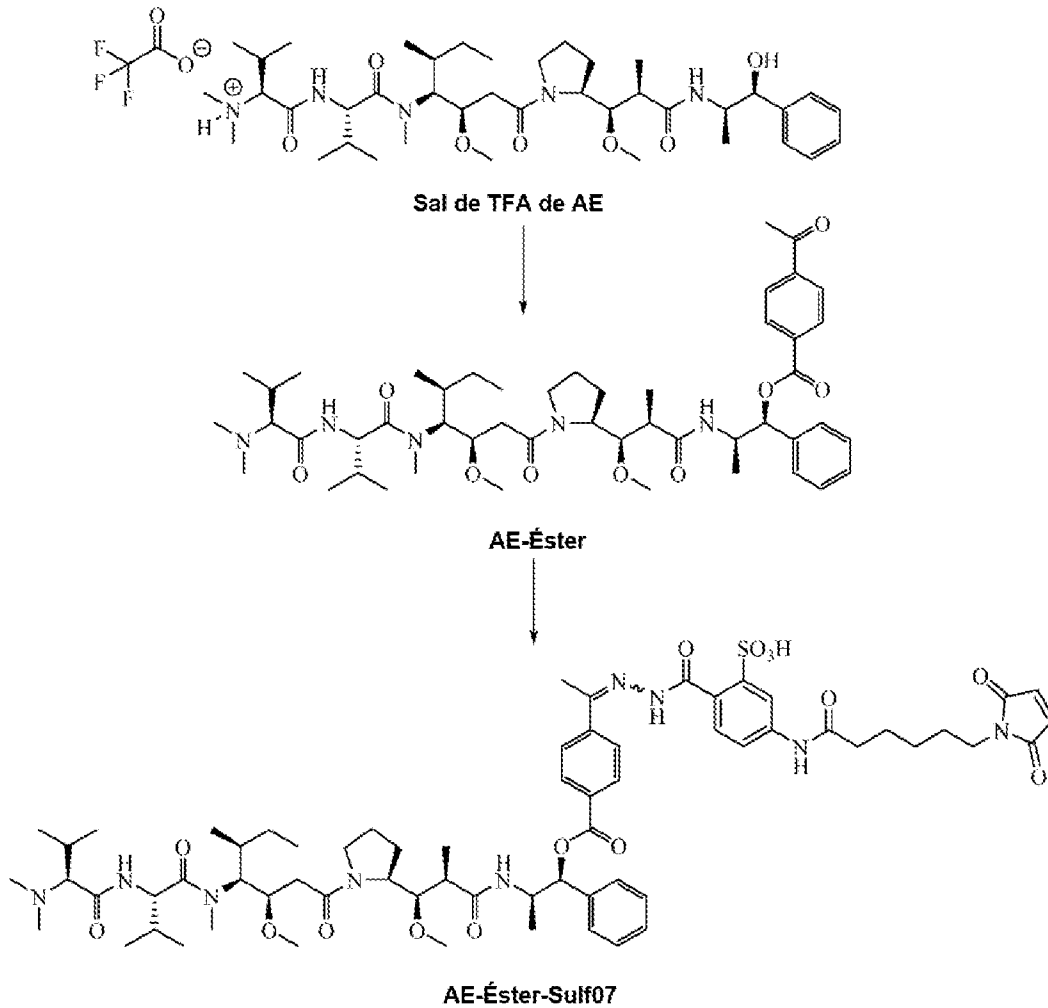


**Síntesis 1:** En una atmósfera de nitrógeno, **Sal de TFA de AE-Ceto** (200 mg, 236,96  $\mu$ mol) en etanol anhidro (6 ml), seguido de la adición de tamices moleculares (perlas de 0,3 nm, 3A). Se añadió **Sulf07** (201 mg, 473,92  $\mu$ mol, 2 eq) disuelto en dimetilsulfóxido anhidro (1,5 ml). La solución amarilla se agitó a temperatura ambiente. Se tomaron muestras para análisis de HPLC/LC-MS (métodos 2 y 4, 220 nm) después de 24 y 44 h. Tras la conversión (85 % después de 44 h), la mezcla se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,2  $\mu$ m, la mayor parte del etanol se eliminó a presión reducida. Se añadieron gota a gota 3 ml de fosfato sódico 200 mM pH 7,2 hasta que el pH de la solución fue ~6. La solución (~5 ml) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa con un cartucho SNAP Ultra C18 preempaquetado de 30 g, utilizando un gradiente escalonado del 2 % al 50 % de acetonitrilo en agua a lo largo de 16 volúmenes de columna. Las fracciones del producto se analizaron mediante HPLC (método 2, 220 nm), las fracciones puras se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a presión reducida y la solución residual se liofilizó, dando un sólido esponjoso blanquecino. Rendimiento: 113 mg, 42 %, punto de fusión: >105 °C. HPLC (método 2, 220 nm) >95 %. LRMS-ESI ( $m/z$ ) calculado para  $C_{57}H_{86}N_9O_{13}$  [M+H]<sup>+</sup>: 1136,61. Encontrado: 1136,76; calculado para  $C_{57}H_{84}N_9O_{13}$  [M-H]<sup>-</sup>: 1134,59. Encontrado: 1135,09. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11,21 (2  $\times$  s, 1H), 10,09 (2  $\times$  s, 1H), 8,66 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H), 8,20 (2  $\times$  d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H), 7,84-7,69 (m, 2H), 7,50-7,41 (m, 1H), 7,35-7,21 (m, 5H), 6,98 (s, 2H), 4,96-4,84 (m, 1H), 4,77-4,60 (m, 1H), 4,56 (td,  $J$  = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 4,03-3,92 (m, 1H), 3,61-3,52 (m, 1H), 3,51-3,41 (m, 2H), 3,38 (t,  $J$  = 7,0 Hz, 2H), 3,35-3,32 (m, 1H), 3,20 (m, 7H), 3,02 (2  $\times$  s, 3H), 2,61 (2  $\times$  s, 6H), 2,47-2,37 (m, 1H), 2,26 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H), 2,22-2,04 (m, 3H), 2,04-1,91 (m, 1H), 1,88-1,63 (m, 3H), 1,62-1,43 (m, 7H), 1,37-1,27 (m, 4H), 1,27-1,19 (m, 2H), 1,06 (d,  $J$  = 6,6 Hz, 2H), 0,98 (d,  $J$  = 6,6 Hz, 1H), 0,96-0,88 (m, 8H), 0,87-0,81 (m, 5H), 0,80-0,73 (m, 5H). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  172,67, 172,38, 172,26, 171,47, 171,45, 171,13, 171,10, 168,76, 168,52, 166,64, 166,23, 164,82, 164,61, 156,63, 155,75, 144,76, 144,68, 140,27, 140,14, 134,46, 133,00, 131,89, 131,79, 128,78, 128,56, 128,40, 128,31, 127,66, 127,61, 127,10, 120,25, 118,66, 118,56, 116,47, 116,34, 85,45, 81,38, 77,69, 76,74, 71,91, 60,94, 60,20, 58,57, 58,16, 57,05, 55,07, 54,48, 54,39, 49,25, 48,86, 47,18, 46,24, 43,58, 43,12, 41,50, 41,44, 37,15, 36,96, 36,15, 35,01, 31,83, 31,57, 30,04, 29,94, 27,77, 26,68, 26,64, 25,76, 25,39, 25,27, 24,52, 24,50, 24,29, 23,17, 19,30, 19,28, 18,85, 18,62, 18,57, 18,48, 18,20, 17,17, 16,92, 15,58, 15,51, 15,23, 14,96, 10,43, 10,25. Nota: Algunas señales de RMN de <sup>1</sup>H se dividen en dos señales diferentes debido a la presencia de conformadores en solución. Por esta razón, el número de picos en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C es superior al número de carbonos esperado para el AE-Ceto-Sulf07.

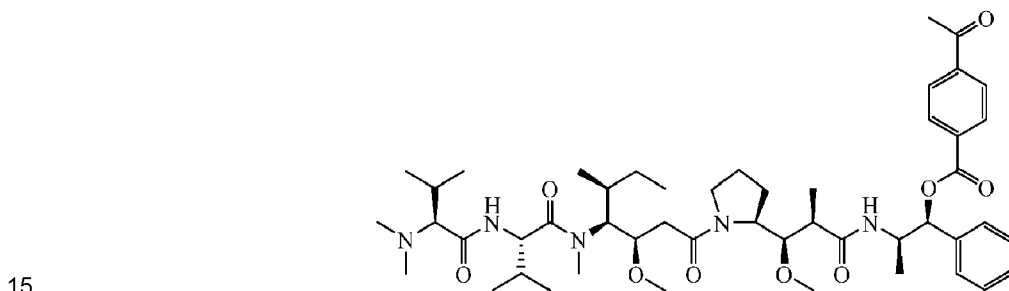
**Síntesis 2:** en un matraz de fondo redondo de 25 ml bajo nitrógeno, se disolvieron AE-Ceto (150 mg, 0,177 mmol, 1,0 eq) y Sulf07 obtenido de la vía C (93 mg, 0,213 mmol, 1,2 eq) en una mezcla de EtOH anhidro (225  $\mu$ l) y DMSO anhidro (225  $\mu$ l). La disolución completa se consiguió tras 5 minutos de ultrasonidos a temperatura ambiente. Se añadieron tamices moleculares activados y la suspensión amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente y se comprobó el progreso mediante análisis de HPLC. Después de 22 h, la mezcla de reacción se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml, el vial de reacción se lavó dos veces con 600  $\mu$ l de DMSO-EtOH (1:1) y las porciones combinadas se centrifugaron. El sólido se separó del sobrenadante. El producto se precipitó mediante la adición de 45  $\mu$ l de MTBE al sobrenadante. La suspensión blanca se centrifugó y se desechó el sobrenadante resultante. La purificación del compuesto diana se realizó en un sistema Isolera One (Biotage AB, Upsala, Suecia) equipado con un cartucho esférico AQ C18 de 20-35  $\mu$ m 100A de 40 g con un gradiente del 2 % al 50 % de agua/acetonitrilo. Tras la liofilización, se obtuvo el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino. Rendimiento 80 mg, 40 %. HPLC (método 10, 220 nm) >97 %. Análisis de RMN y LC-MS de acuerdo con lo informado anteriormente.

**Ejemplo 3**

El compuesto **AE-Éster-Sulf07**, ácido 2-(2-(1-(4-(((1S,2R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((R)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropoxi)carbonil)fenil)etiliden)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)benzenosulfónico, se sintetizó como se describe a continuación y se muestra en el Esquema 6.



10 Síntesis de 4-acetilbenzoato de (1S,2R)-2-((3R)-3-((S)-1-((3R,4S,SR)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropilo (**AE-Éster**)

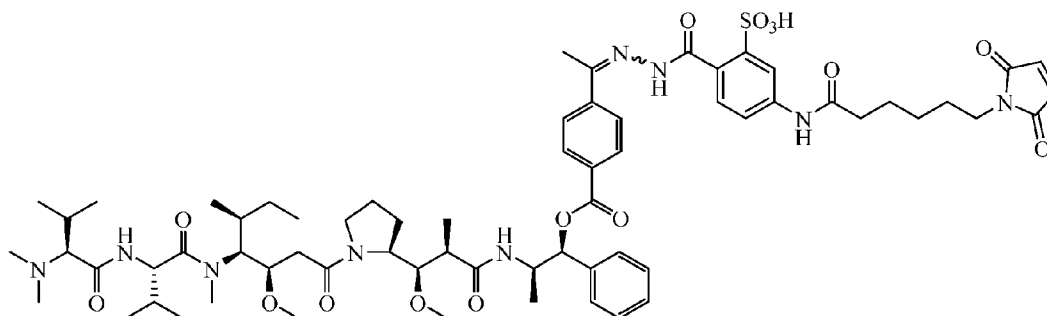


Síntesis de acuerdo con un procedimiento mejorado de la patente US6884869-B2

20 A una solución de sal de TFA de auristatina E (1,0 g, 1,18 mmol, 1,0 eq, Levena Biopharma) y ácido 4-acetilbenzoico (198 mg, 1,42 mmol, 1,2 eq, Acros Organics) en diclorometano anhidro (18 ml) en presencia de tamices moleculares

(perlas de 0,3 nm, 3 Å) se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 244 mg, 2,36 mmol, 2,0 eq, Carbolution) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC, 186 µl, 1,42 mmol, 1,2 eq, Sigma Aldrich). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El progreso de la reacción se siguió mediante HPLC (método 2, 220 nm), mostrando una conversión al producto deseado del 81 %. Se añadió adicionalmente DIC (155 µl, 1,18 mmol, 1,0 eq, Sigma Aldrich) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 h, tras lo que la HPLC mostró una conversión de la reacción del 98 % al producto deseado. Durante la síntesis de diferentes lotes del compuesto, se ha observado que cuando se utiliza DIC nuevo de una botella recién abierta, no hay necesidad de la segunda adición. Los tamices moleculares y el precipitado fino formado, un subproducto DIC, se filtraron a través de papel de filtro plegado (calidad 3 hw, Sartorius) y la solución amarilla transparente resultante se lavó una vez con HCl (0,1 M, 15 ml). La capa acuosa se volvió a extraer una vez con diclorometano (15 ml), luego la capa orgánica se combinó, se lavó una vez con salmuera (15 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. La solución se concentró a presión reducida a 40 °C, dando un aceite amarillo, que luego se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano (5 ml). Se añadió un exceso de éter dietílico (50 ml) para producir un sólido blanco. La mezcla se dejó a 2-4 °C durante 30 min y luego el sólido se separó por centrifugación. El procedimiento de precipitación se repitió tres veces y el polvo blanco se secó a presión reducida. Rendimiento: 706 mg, 68 % de rendimiento. Pureza según la HPLC (método 2, 220 nm) 98 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 879,20. Encontrado: 878,70.

Síntesis de ácido 2-(2-(1-(4-(((1S,2R)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4R,5S)-4-((S)-2-((R)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-1-fenilpropoxi)carbonil)fenil)etiliden)hidrazina-1-carbonil)-5-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamido)benzenosulfónico (**AE-Éster-Sulf07**)



Se añadió una solución de **Sulf07** (164 mg, 0,31 mmol, 1,1 eq) en dimetilsulfóxido anhidro (2 ml) a una solución de **AE-éster** (243 mg, 0,28 mmol, 1,0 eq) en etanol anhidro (8 ml) en presencia de tamices moleculares (perlas de 0,3 nm, 3 Å). Se añadió ácido *para*-toluensulfónico (10,5 mg, 0,05 mmol, 0,2 eq) para catalizar la reacción, y esta se agitó a temperatura ambiente. También podría usarse TFA en lugar de ácido *para*-toluensulfónico. La reacción se controló mediante HPLC (método 2, 220 nm), mostrando una conversión completa después de 15 h. Los tamices moleculares y el precipitado fino formado se separaron de la solución de reacción mediante filtración a través de papel de filtro plegado (calidad 3 hw, Sartorius). La solución se precipitó con una cantidad excesiva de *terc*-butiléter de metilo (60 ml) y la mezcla se dejó a 2-4 °C durante 30 min. A continuación, se separó el precipitado mediante centrifugación para conseguir un sólido pegajoso de color amarillo. El sólido pegajoso de color amarillo se disolvió en metanol/diclorometano 3/7 (10 ml) y la solución se inyectó en un sistema de purificación ultrarrápida, con un cartucho SNAP Ultra de 25 g preenvasado. La purificación se llevó a cabo en fase normal utilizando un gradiente escalonado, desde el 100 % de diclorometano hasta el 60 % de diclorometano/40 % de metanol en 17 volúmenes de columna. Los tubos que contenían el producto se combinaron y secaron a alto vacío. Rendimiento: 162 mg, 45 % de rendimiento. Pureza por RP-HPLC (método 2, 220 nm) 96 %. LRMS-ESI (*m/z*) calculado para C<sub>66</sub>H<sub>93</sub>N<sub>9</sub>O<sub>15</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 1285,58. Encontrado: 1284,20. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,24 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 10,21 (s, 1H), 9,20 (2 × s, 1H), 8,32-7,90 (m, 8H), 7,74-7,71 (dd, *J* = 8,5, 2,7 Hz, 1H), 7,41-7,27 (m, 5H), 7,00 (s, 2H), 6,13-6,02 (2 × d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,80-4,51 (m, 2H), 4,41-4,23 (m, 1H), 4,09-3,55 (m, 3H), 3,54-3,37 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 3,27-3,17 (m, 8H), 3,00 (s, 2H), 2,88-2,63 (m, 5H), 2,37-2,30 (m, 6H), 2,22-1,80 (m, 4H), 1,75-1,48 (m, 7H), 1,42-1,22 (m, 6H), 1,18-1,11 (m, 3H), 1,10-1,04 (m, 3H), 1,00-0,74 (m, 20H). RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO) δ 172,93, 172,65, 171,44, 170,94, 168,61, 168,49, 164,59, 164,52, 164,24, 164,16, 149,20, 144,83, 143,05, 142,96, 140,71, 137,97, 137,78, 134,30, 132,25, 129,43, 129,38, 129,31, 129,21, 128,39, 128,31, 126,49, 126,44, 126,35, 125,72, 118,77, 116,77, 85,20, 81,26, 77,65, 77,04, 76,84, 60,82, 60,12, 58,59, 58,03, 57,01, 48,35, 47,76, 47,15, 46,03, 43,60, 42,99, 36,89, 36,11, 31,64, 29,89, 29,73, 27,70, 26,56, 25,70, 25,33, 25,04, 24,42, 24,04, 23,03, 19,16, 18,63, 18,44, 18,37, 15,50, 15,47, 15,29, 15,14, 13,88, 13,84, 10,19, 10,04. Nota: Algunas señales de RMN de <sup>1</sup>H se dividen en dos señales diferentes debido a la presencia de conformadores en solución. Por esta razón, el número de picos en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C es superior al número de carbonos esperado para el AE-Éster-Sulf07.

**Liberación dependiente del pH de los conjugados de albúmina sérica humana de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 a pH 7,4 y pH 4,1 (Figuras 11 y 12)**

Los derivados de auristatina-Sulf07 que se unen a la albúmina se prepararon como soluciones madre 2 mM en DMSO

anhidro.

Liberación a pH 7,4: se añadieron 442,4 µl de 1000 µM de albúmina sérica humana reducida (881 µM de cisteína-34 libre) y 727,6 µl de tampón de PBS (fosfato sódico 4 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM) a un vial de HPLC sellado y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de 30 minutos de incubación, se añadieron 130 µl de la solución madre de fármaco DMSO apropiada al vial preincubado para producir una solución 200 µM de fármaco de auristatina y una solución 300 µM de albúmina (cisteína-34 libre). La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos a 37 °C y luego se analizó mediante HPLC (método 7, inyección de 20 µl). Las inyecciones se repitieron después de 1 hora y luego cada hora hasta 24 horas.

Liberación a pH 4,1: se añadieron 408,5 µl de 1000 µM de albúmina sérica humana reducida (881 µM de cisteína-34 libre) y 539,4 µl de agua a un vial de HPLC sellado y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. En un vial separado, se incubaron 190 µl de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 3,0 y 24,7 µl de HCl 1 M a 37 °C durante 30 minutos. Después de 30 minutos de incubación, se añadieron 120 µl de la solución madre de fármaco de DMSO adecuada al vial preincubado para producir el conjugado de fármaco de albúmina. Después de 10 minutos de incubación, se añadieron 132 µl de la solución tampón de acetato de sodio para producir una solución 200 µM de derivado del fármaco de auristatina y una solución 300 µM de albúmina (cisteína-34 libre). La solución resultante se analizó directamente mediante HPLC (método 7). La inyección del vial se repitió después de 1 hora y luego cada hora hasta 24 horas.

El porcentaje de fármaco libre liberado se determinó mediante HPLC con una curva de calibración (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM y 12,5 µM) para los fármacos libres, es decir, AE-Ceto para AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster para AE-Éster-Sulf07. Las soluciones madre de fármaco se prepararon usando DMSO como disolvente y se diluyeron 10 veces con tampón de fosfato (fosfato de sodio 4 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM) antes del análisis por HPLC. Los cálculos de liberación de fármacos se basaron en el ABC: para AE-Ceto a 254 nm y AE-Éster a 310 nm (máximos UV locales). El porcentaje de AE-Éster liberado fue mayor que el porcentaje de AE-Ceto liberado al cambiar el pH de 7,4 a 4,1 (se pueden comparar las Figuras 11 y 12).

#### **Estabilidad de reconstitución de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Ceto-EMCH (Figura 1)**

Los derivados del fármaco de AE-Ceto que se unen a la albúmina se reconstituyeron en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6, que contenía 5 % de sacarosa (p/v) y 2 % de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (2-HPβCD). Ambos fármacos se reconstituyeron a una concentración de 1277 µM (igual a 4,5 mg/kg de dosis de xenoinjerto murino), la disolución de ambos fármacos se confirmó mediante HPLC (método 2, 254 nm). La estabilidad de los fármacos reconstituidos se controló mediante HPLC a temperatura ambiente cada 15 minutos durante un período de 240 minutos para determinar la hidrólisis de maleimida y la pérdida de p.a. AE-Ceto-Sulf07 fue más estable que AE-Ceto-EMCH (véase la Figura 1).

#### **Estabilidad de reconstitución de AE-Éster-Sulf07 y AE-Éster-EMCH (Figura 2)**

Los derivados del AE-Éster que se unen a la albúmina se reconstituyeron en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6, que contenía 5 % de sacarosa (p/v) y 4 % de 2-HPβCD. Ambos fármacos se reconstituyeron a una concentración de 655 µM (igual a 2,4 mg/kg de dosis de xenoinjerto murino), la disolución de ambos fármacos se confirmó mediante HPLC (método 2, 310 nm). La estabilidad de los fármacos reconstituidos se controló mediante HPLC a temperatura ambiente cada 15 minutos durante un período de 240 minutos para determinar la hidrólisis de maleimida y la pérdida de p.a. AE-Éster-Sulf07 fue más estable que AE-Éster-EMCH (véase la Figura 2).

#### **Cinética de unión de derivados de auristatina-Sulf07 en plasma humano, plasma de rata y plasma murino CD1 (Figuras 5-10).**

El plasma murino CD1 y el plasma de rata Sprague Dawley se retiraron de la conservación a -80 °C y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente. El plasma descongelado se centrifugó a 13,6 krpm durante 60 segundos, el sobrenadante se filtró a través de una aguja de filtro (5 µm) y posteriormente a través de una membrana de CA de 0,45 µm.

Se tomó sangre completa de un voluntario humano sano (tubo de recolección de EDTA), el plasma se separó de los glóbulos rojos centrifugándolo durante 3 minutos a 3000 rpm. A continuación, el plasma se utilizó directamente, en las 2 horas siguientes a la donación de sangre. Se utilizaron 360 µl del plasma apropiado para cada experimento de unión.

Todos los experimentos de unión se llevaron a cabo por triplicado. El plasma se incubó a 37 °C usando un Eppendorf Thermomixer C. Después de 30 minutos de incubación, se disolvieron 40 µl del derivado de auristatina-Sulf07 que se une a la albúmina apropiado en su solución de reconstitución y se añadieron al plasma. Se tomaron muestras (40 µl) después de 15 segundos, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos y 15 minutos (5 muestras).

Las muestras se añadieron inmediatamente a 160 µl de acetonitrilo (que contenía 4 µg/ml de MMAE como patrón interno) y se agitaron durante 1 minuto.

Las soluciones se pipetearon en una placa de precipitación de plasma Impact (agitada durante 60 segundos) y se filtraron al vacío en una placa de 96 pocillos. El fármaco restante se determinó mediante cuantificación de LCMS (método 5, inyección de 30  $\mu$ l) usando el modo negativo (control de varias reacciones múltiples) MRM MS2. Iones precursores: auristatina F (Masa-744,8), AE-Ceto-Sulf07 (Masa-1135,1) y AE-Éster-Sulf07 (Masa-1283,2). El porcentaje de unión se determinó comparando el ABC de AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 con las curvas de calibración generadas por LCMS para cada compuesto.

**Procedimiento: Especificidad de unión de los derivados de auristatina-Sulf07 con la cisteína-34 de la albúmina sérica humana (Figuras 3-4).**

Los derivados de auristatina-Sulf07 que se unen a la albúmina se reconstituyeron en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6 y sacarosa al 5 % que contenía 2-HP $\beta$ CD. Se utilizó una concentración de HP $\beta$ CD del 2 % para reconstituir AE-Ceto-Sulf07 y 4 % para reconstituir AE-Éster-Sulf07 respectivamente. Ambos fármacos se reconstituyeron a una concentración de 1 mg/ml (AE-Éster-Sulf07 780  $\mu$ M, AE-Ceto-Sulf07 880  $\mu$ M).

El plasma humano se retiró del almacenamiento a -80 °C y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. El plasma descongelado se centrifugó a 13,6 krpm durante 60 segundos, el sobrenadante se filtró a través de la aguja de filtro (5  $\mu$ m) y posteriormente a través de una membrana de CA de 0,45  $\mu$ m. Se utilizaron 180  $\mu$ l del plasma apropiado para cada experimento de unión. El plasma se incubó a 37 °C usando un Eppendorf Thermomixer C. Después de 30 minutos de incubación, se añadieron 20  $\mu$ l del derivado de auristatina-Sulf07 que se une a la albúmina apropiado. Se dejó que el fármaco de unión a la albúmina reaccionara en el plasma durante 5 minutos a 37 °C. Después de 5 minutos, la solución se analizó directamente mediante cromatografía HPLC de interacción hidrófoba (HIC, método 6, 250 nm) para confirmar la conjugación específica del sitio con albúmina y la formación del conjugado de fármaco de albúmina.

**Degradación acelerada de formulaciones de auristatina liofilizada: comparación de la estabilidad de EMCH y Sulf07 (Figuras 24-25).**

Se disolvieron los p.a. en el tampón de liofilización que contenía 2-HP $\beta$ CD, citrato de sodio 10 mM a pH 6,2, 50 % de alcohol *terc*-butílico (v/v). Para los derivados de AE-Ceto, se empleó 2-HP $\beta$ CD al 2 % (p/v) para disolver los p.a. de AE-Ceto a una concentración de 1,27 mM; para los derivados de AE-Éster se utilizó 2-HP $\beta$ CD al 4 % (p/v) para disolver los p.a. a una concentración de 1,05 mM. Los p.a. disueltos se filtraron de forma estéril utilizando un filtro de jeringa Acrodisc Fluorodyne II (0,2  $\mu$ m). Las soluciones estériles se pipetearon en viales de liofilización que luego se sellaron parcialmente con un tapón de caucho. Posteriormente, los viales se colocaron en el liofilizador para su liofilización. Los viales se congelaron en el estante del liofilizador a -40 °C durante 2 horas, después de 2 horas se inició el secado principal. El secado principal se realizó durante 26 horas, parámetros: temperatura del estante -20 °C, vacío 0,48 Pa (0,0048 mbar). Después del secado principal, se inició el secado final. El secado final se realizó durante 16 horas, parámetros: temperatura del estante 20 °C, vacío 0,47 Pa (0,0047 mbar). Una vez completado el secado final, los viales se sellaron al vacío.

Los viales sellados se incubaron a 55 °C utilizando un Eppendorf Thermomixer C con una inserción de placa (Smartblock) y tapa. En los momentos elegidos (t: 0, 46, 94, 166 y 264 horas) las muestras se retiraron y se disolvieron en DMSO anhidro. La estabilidad de los p.a. se determinó mediante HPLC (método 8, 254 nm para derivados de AE-Ceto, 310 nm para derivados de AE-Éster). El porcentaje de hidrólisis de maleimida en cada momento se determinó en comparación con el ABC para cada p.a. en el momento 0. AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07 fueron más estables que los respectivos derivados de EMCH AE-Ceto-EMCH y AE-Éster-EMCH (véanse las Figura 24 y Figura 25).

**Ejemplo 4**

**Procedimiento general para la evaluación de auristatina E, AE-Ceto y AE-Éster contra un grupo de estirpes celulares tumorales**

**Determinación de la CI<sub>50</sub>**

Las muestras se proporcionaron a Charles River Discovery Research Services Germany GmbH como soluciones madre congeladas en DMSO de calidad farmacéutica (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Cada día del experimento, se descongeló una alícuota congelada de solución madre. Las diluciones en serie posteriores se realizaron con medio de cultivo celular RPMI 1640 completo utilizando una placa de dilución intermedia. A continuación, se transfirieron 10  $\mu$ l tomados de la placa de dilución intermedia a 140  $\mu$ l/pocillo de la placa de cultivo celular. Las células se trataron con los compuestos de prueba en 10 concentraciones por triplicado en etapas semilogarítmicas de 0,003 nM a 100 nM durante un período de 96 h.

Los compuestos se probaron en un grupo de 6 estirpes celulares de cáncer humano seleccionadas utilizando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue.<sup>®</sup> (Promega, Mannheim, Alemania). Los valores de CI se informan como valores de CI<sub>50</sub> absolutos, obtenidos para un compuesto de prueba como la media geométrica de los valores de CI<sub>50</sub> en todas las estirpes celulares analizadas.

Las estirpes celulares utilizadas fueron LXFL 1674L (establecida a partir de xenoinjerto derivado de pacientes en Charles River Discovery Research Services Germany GmbH), SW-620 (amablemente proporcionada por el NCI, Bethesda, MD, Estados Unidos), CAL-27 (adquirida en DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania), RKO, MDA-MB-468 y SK-OV-3 (de ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, EE. UU.). La autenticidad de todas las estirpes celulares se demostró en DSMZ mediante análisis STR (repetición corta en tándem), una metodología de toma de huellas de ADN basada en PCR. Las estirpes celulares se pasaron rutinariamente una o dos veces a la semana y se mantuvieron en cultivo durante hasta 20 pases. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 (HEPES 25 mM, con L-glutamina, Biochrom, Berlín, Alemania) complementado con suero de ternero fetal al 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y gentamicina 0,1 mg/ml (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania). El ensayo de viabilidad celular CellTiter-Azul<sup>®</sup> se utilizó según las instrucciones del fabricante. En síntesis, se recogieron células de cultivos en fase exponencial, se contaron y se sembraron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos a una densidad celular de 4000 a 10.000 células/pocillo dependiendo de la velocidad de crecimiento de la estirpe celular. Después de un período de recuperación de 24 h para permitir que las células reanudaran el crecimiento exponencial, se añadieron 10 µl de medio de cultivo (seis pocillos/placa de control) o de medio de cultivo con el compuesto de ensayo. Los compuestos se aplicaron a 10 concentraciones por triplicado en incrementos de medio logaritmo hasta 100 nM y las células se trataron continuamente durante 96 h. Después de cuatro días de tratamiento de las células, se añadieron 20 µl/pocillo de reactivo CellTiter-Blue<sup>®</sup>. Después de un período de incubación de hasta 4 h, la fluorescencia (FU) se midió utilizando el lector de placas multimodo Enspire (λ de excitación = 531 nm, λ de emisión = 615 nm). Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron con el *software* bioanalítico GraphPad Prism (San Diego, CA, EE. UU.).

Se observaron actividades dependientes de la concentración con curvas sigmoideas de concentración-efecto en las seis estirpes celulares tumorales analizadas. La media geométrica de los valores de CI<sub>50</sub> fueron 259 ± 0,11 pM para AE-Ceto y 399 ± 0,19 pM para AE-Éster. En comparación con los fármacos altamente potentes MMAE (171 ± 0,10 pM) y AE (130 ± 0,05 pM), los derivados de AE-Ceto y AE-Éster tienen una citotoxicidad similar en el intervalo picomolar.

### Ejemplo 5

#### 30 Procedimiento general para la evaluación de auristatina E y los derivados de auristatina E que se unen a la albúmina en modelos de xenoinjerto tumoral derivados de pacientes.

Ratones atímicos hembra inmunodeficientes NMRI, de Charles River Discovery Research Services Alemania GmbH, recibieron implantes tumorales unilaterales por vía subcutánea en el costado izquierdo mientras estaban bajo anestesia con isoflurano con tumores de origen humano, hasta que los tumores fueron palpables y alcanzaron el volumen deseado.

Los animales fueron mantenidos en jaulas, la temperatura dentro de las jaulas se mantuvo a 25 ± 1 °C con una humedad relativa del 45 al 65 % y una tasa de renovación de aire de 60 veces por hora. Los ratones se mantuvieron bajo un ciclo de luz artificial de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados con pienso extrusionado Teklad Global con 19 % de proteína esterilizado en autoclave (T.2019S.12) de Envigo RMS SART, y tuvieron acceso a agua del grifo estéril filtrada y acidificada (pH 2,5) que se cambiaba dos veces a la semana. Se les proporcionó alimento y agua a voluntad. Antes del tratamiento, los animales se aleatorizaron (7-8 ratones por grupo) considerando una mediana y una media comparables del volumen del tumor del grupo. Los animales fueron controlados rutinariamente dos veces al día los días laborables y diariamente los sábados y domingos. Comenzando el día 0, los animales se pesaron dos veces a la semana. Los pesos corporales relativos (PCR) de los animales individuales se calcularon dividiendo el peso corporal absoluto individual el día X (PC<sub>X</sub>) entre el peso corporal individual el día de la aleatorización multiplicado por 100 %. El volumen del tumor se determinó mediante una medición bidimensional con calibradores el día de la aleatorización (día 0) y luego dos veces a la semana. Los volúmenes de los tumores se calcularon según la siguiente ecuación:

Volumen tumoral [mm<sup>3</sup>] = l [mm] × a<sup>2</sup> [mm<sup>2</sup>] × 0,5, donde "l" es la longitud y "a" es el ancho del tumor. El volumen relativo de un tumor individual en el día X (VTR<sub>X</sub>) se calculó dividiendo el volumen individual absoluto del tumor [mm<sup>3</sup>] del tumor respectivo el día X (Tx) entre el volumen tumoral individual absoluto del mismo tumor el día de la aleatorización multiplicado por 100 %. Se aplicaron horarios en la medida que lo permitieran las políticas de bienestar animal. El sacrificio de cada uno de los ratones se llevó a cabo cuando alcanzaron un volumen de tumor >2000 mm<sup>3</sup> (unilateral). Para la evaluación de la significación estadística de la eficacia antitumoral, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del método de Dunn para comparaciones por pares, mediante el cual se compararon los VTR individuales de los grupos de prueba y de control en los días en los que se alcanzaron los valores mínimos de T/C en los grupos de prueba, donde T/C [%] = (mediana de VTR<sub>X</sub> del grupo tratado/mediana de VTR<sub>X</sub> en el grupo de control) × 100. El análisis estadístico solo se llevó a cabo si al menos el 50 % de los animales inicialmente aleatorizados en un grupo relevante todavía estaban vivos. Las comparaciones entre los grupos de prueba se llevaron a cabo durante los mismos días. Por convención, los valores de p ≤ 0,05 indican la significación de la inhibición tumoral. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el *software* bioanalítico GraphPad Prism (San Diego, California, EE. UU., www.graphpad.com).

**Procedimiento general para la evaluación de auristatina E y los derivados de auristatina E que se unen a la albúmina en estudios de búsqueda de dosis y en modelos de xenoinjerto tumoral derivado de estirpes celulares.**

5 Ratones atímicos hembra inmunodeficientes NMRI, de Janvier, Francia, recibieron  $5 \times 10^6$ - $10^7$  células cancerosas cultivadas en tampón/Matrigel (1:1) inoculadas por vía subcutánea, hasta que los tumores fueron palpables y alcanzaron el volumen deseado (para estudios de xenoinjerto).

10 Los animales se mantuvieron en jaulas (malla de alambre Macrolon Tipo II) con una temperatura mantenida a  $22 \pm 1$  °C, una humedad relativa de  $50 \pm 10$  % y una tasa de renovación de aire de 60 veces por hora. Los ratones se mantuvieron bajo un ciclo de luz artificial de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados con Ssniff NM esterilizado en autoclave (Soest, Alemania) y tuvieron acceso a agua del grifo estéril filtrada y acidificada (pH 4,0) que se cambió dos veces a la semana. Se les proporcionó alimento y agua a voluntad. Antes del tratamiento, los animales se aleatorizaron (3-4 ratones por grupo en estudios de búsqueda de dosis y 7-8 ratones por grupo en estudios de xenoinjerto) considerando una mediana y una media equiparables del volumen del tumor del grupo. La salud de los animales se examinó al inicio del experimento y dos veces al día durante el experimento. Identificación utilizada: marcaje en las orejas y etiquetas de jaula. Comenzando el día 0, los animales se pesaron dos o tres veces a la semana y se relacionó el peso corporal medio por grupo con el valor inicial en porcentaje para calcular el cambio de peso corporal (CPC). Los diámetros de los tumores se determinaron mediante una medición bidimensional con un calibrador el día de la aleatorización (día 0) y luego dos o tres veces a la semana. Los volúmenes de los tumores se calcularon según la siguiente ecuación:

20 Volumen tumoral [mm<sup>3</sup>] = l [mm] × a<sup>2</sup> [mm<sup>2</sup>] × 0,5, donde "l" es la longitud y "a" es el ancho del tumor. El volumen relativo de un tumor individual en el día X (VTR<sub>X</sub>) se calculó dividiendo el volumen individual absoluto del tumor [mm<sup>3</sup>] del tumor respectivo el día X (Tx) entre el volumen tumoral individual absoluto del mismo tumor el día de la aleatorización multiplicado por 100 %. Se aplicaron horarios en la medida que lo permitieran las políticas de bienestar animal. El sacrificio de cada uno de los ratones se llevó a cabo con un volumen de tumor >1500 mm<sup>3</sup> (unilateral) o cuando se observó ulceración. La comparación estadística se realizó con la prueba U de Mann-Whitney.

30 **Estudios de búsqueda de la dosis de auristatina E y los derivados de auristatina E que se unen a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 y AE-Éster-Sulf07.**

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

35 1) 3 ratones por grupo, 26 g de peso promedio el día de la aleatorización: dosis de 0,3, 0,6 o 1,2 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrada una vez a la semana durante 4 semanas los días 0, 6, 13, 20 = 0,35-1,41 mg/kg = 7,1-28,3 µg/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 8,5 mg pesados en un vial de 50 ml disueltos en 30,0 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 25/75, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se dividieron alícuotas de 0,2-0,8 ml en viales de 2 ml dependiendo de la dosis final deseada. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 0,8 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

45 2) 3 ratones por grupo, 26 g de peso promedio el día de la aleatorización: 1,2 y 2,4 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas  $\equiv$  1,94-3,87 mg/kg  $\equiv$  38,7 y 77,4 µg/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 11,0 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 14,2 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se dividieron alícuotas de 0,4-0,8 ml en viales de 2 ml dependiendo de la dosis final deseada. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 0,8 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

50 3) 3 ratones por grupo, 26 g de peso promedio el día de la aleatorización: 1,2, 1,6 o 2,0 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas en el día  $\equiv$  2,18-3,64 mg/kg  $\equiv$  43,7-72,8 µg/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 19,2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 26,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se dividieron alícuotas de 0,48-0,8 ml en viales de 2 ml dependiendo de la dosis final deseada. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 0,8 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 5 % de Tween 80 - pH 7,6.

60 4) 4 ratones por grupo, 23 g de peso promedio el día de la aleatorización: 2,0, 2,2 y 2,4 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas en el día  $\equiv$  3,64-4,37 mg/kg  $\equiv$  72,8-87,3 µg/20 g de ratón y 4,0, 4,4, y 4,8 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados una vez a la semana durante 4 semanas los días 0, 7, 14, 21  $\equiv$  7,28-8,73 mg/kg  $\equiv$  145,6-174,7 µg/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 56,0 mg pesados en un vial de 50 ml disueltos en 32,0 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se dividieron alícuotas de 0,33-0,8 ml en viales de 2 ml dependiendo de la dosis final deseada. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 0,8 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

Las dosis de 1,2 y 0,6 mg/kg de auristatina E mostraron una alta toxicidad y ningún animal sobrevivió después de la primera y segunda inyección respectivamente. La dosis de 0,3 mg/kg fue bien tolerada. En estudios posteriores se encontró que la AE fue tolerada a 0,3 mg/kg inyectados quincenalmente durante cuatro semanas (un total de ocho inyecciones) y, por lo tanto, esta dosis se utilizó en estudios de xenoinjertos como la dosis máxima tolerada (DMT).

Todas las dosis probadas de AE-Ceto-Sulf07 inyectadas ocho veces en un horario quincenal fueron bien toleradas. En estudios posteriores de xenoinjertos, la dosis de este fármaco se aumentó hasta 6,5 mg/kg con la misma pauta posológica, provocando con esta dosis más alta pérdida de peso corporal en un ratón y mala salud general en un segundo ratón, y el tratamiento tuvo que suspenderse después de cinco inyecciones en lugar de ocho como estaba previsto. Por lo tanto, dicha dosis se consideró superior a la DMT y se seleccionó 4,5 mg/kg como la dosis segura.

AE-Éster-Sulf07 se probó inicialmente con dosis de hasta 2,0 mg/kg dos veces a la semana durante cuatro semanas sin signos evidentes de toxicidad. Debido a que posteriormente se observó irritación de la piel en estudios de xenoinjertos, se repitió un segundo estudio de búsqueda de dosis con 2,0, 2,2 y 2,4 mg/kg administrados dos veces a la semana durante cuatro semanas y se comparó con las respectivas dosis duplicadas de 4,0, 4,4 y 4,8 mg/kg inyectadas solo una vez a la semana. No se observó ningún cambio en el peso corporal, pero la irritación de la piel apareció después de 9-14 días en todos los grupos. Se observó irritación cutánea más precoz y más frecuente con dosis más altas. El efecto secundario pareció ser reversible, ya que las irritaciones comenzaron a curarse una vez finalizado el tratamiento. El grupo tratado con 4,0 mg/kg una vez a la semana mostró el efecto secundario más bajo, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los otros grupos.

**Criterios de evaluación de la auristatina E y los derivados de auristatina E que se unen a la albúmina en modelos de xenoinjerto tumoral**

La eficacia de cada fármaco se determinó en función de la reducción del volumen del tumor (% del volumen del tumor en el día seleccionado en comparación con el día 0): remisión completa <10 %; remisión parcial >10-50 %; remisión menor >50-75 %; enfermedad estable >75-125 %; enfermedad progresiva >125 % en comparación con el volumen tumoral inicial.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375: tumores pequeños (Figura 13).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 7 ratones, 29 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 135 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 0, 6, 9, 13, 16, 19  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 7 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 137 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 3,0 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 0, 6, 9, 13, 16, 19  $\equiv$  5,32 mg/kg  $\equiv$  106,3  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 19,2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 19,0 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de melanoma A 375 mostró una eficacia antitumoral estadísticamente significativa del compuesto AE-Ceto-Sulf07 a 3,0 mg/kg frente a una dosis de 0,3 mg/kg de auristatina E, ambos se inyectaron seis veces dos veces a la semana ( $p < 0,01$  desde el día 27 al día 37). Los ratones tratados con auristatina E alcanzaron un estado de enfermedad estable hasta el día 21, tras lo que el tumor comenzó a crecer nuevamente. Por el contrario, los ratones del grupo tratado con AE-Ceto-Sulf07 lograron una regresión tumoral a largo plazo, mostrando remisión completa desde el día 19 hasta el final del estudio el día 37 (volumen final del tumor de 1 mm<sup>3</sup>).

Los ratones del grupo tratado con AE-Ceto-Sulf07 solo tuvieron una ligera reducción en el crecimiento del peso corporal en comparación con el control, pero no se observaron efectos secundarios detectables.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375: tumores grandes (Figura 14).**

5 La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

10 1) 7 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 310 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 1, 6, 9, 13, 16  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se  
15 se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

20 2) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 331 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 6,5 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 1, 6, 9, 13, 16  $\equiv$  11,52 mg/kg  $\equiv$  230,4  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 28,0 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 12,2 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

25 La eficacia antitumoral del compuesto AE-Ceto-Sulf07 también se probó en ratones con tumores de melanoma maligno A375 de mayor tamaño (~320 mm<sup>3</sup>), para demostrar que la eficacia del fármaco no se limita a tumores pequeños. Los ratones tratados con AE-Ceto-Sulf07 a 6,5 mg/kg mostraron una mejora estadísticamente significativa en el efecto antitumoral en comparación con el grupo tratado con auristatina E a una dosis de 0,3 mg/kg, ambos se inyectaron cinco veces dos veces a la semana ( $p < 0,01$  desde el día 9 hasta el día 33). La auristatin E mostró una enfermedad inicial estable hasta el día 14 para luego crecer de manera constante, mientras que los ratones del grupo tratado con AE-Ceto-Sulf07 registraron una remisión completa desde el día 19 hasta el final del estudio el día 37, alcanzando el volumen tumoral mínimo de 1 mm<sup>3</sup> el día 28 (12 días después del último tratamiento) y ~14 mm<sup>3</sup> al final del estudio, lo que da lugar a un efecto a largo plazo a pesar de la mediana del volumen tumoral inicial relativamente grande.

30 AE-Ceto-Sulf07 provocó una pérdida de peso corporal transitoria (se alcanzó el 13 % el día 21) y dos ratones tuvieron que ser sacrificados por malas condiciones generales.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737 - tumores pequeños (Figura 15).**

40 La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de pacientes.

45 Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

50 1) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 137 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

55 2) 7 ratones, 26 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 128 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 4,5 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25  $\equiv$  7,98 mg/kg  $\equiv$  159,5  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 38 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 23,8 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

65 3) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 130 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 4,5 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas

los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25  $\equiv$  7,98 mg/kg  $\equiv$  159,5  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 38 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 23,8 ml *terc*-butanol/tampón de citrato sódico 10 mM a 50/50, 5 % de sacarosa - pH 6; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFE737 mostró una eficacia antitumoral superior del compuesto AE-Ceto-Sulf07 a 4,5 mg/kg (tanto en tampones Tween 80 como 2-HP $\beta$ CD) frente a la auristatina E a 0,3 mg/kg administrados 8 veces dos veces a la semana con significación estadística ( $p < 0,01$  en los días 56 y 63). Los tumores en el grupo tratado con auristatina E permanecieron solo temporalmente en un estado de enfermedad estable (del día 21 al día 42) y crecieron significativamente después del final del tratamiento. Por el contrario, los ratones tratados con AE-Ceto-Sulf07 alcanzaron la remisión completa del tumor el día 28, 3 días después del final del tratamiento, reduciendo el volumen del tumor a un nivel inmensurable hasta el final del estudio el día 74 (independientemente del tampón utilizado), dando lugar a un efecto antitumoral a largo plazo.

El cambio de peso corporal frente al control mostró un aumento parcial de la toxicidad en el grupo tratado con AE-Ceto-Sulf07. El día 32 se registró una pérdida máxima de peso corporal (-7 %) sin otros signos de toxicidad en el caso del 2-HP $\beta$ CD, mientras que dos ratones tuvieron que ser sacrificados por malas condiciones generales cuando se administró el fármaco en Tween 80.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737- tumores grandes (Figura 16).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de pacientes.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 8 ratones, 26 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 324 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 3 mg pesados en un vial de 100 ml disueltos en 43,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 2,4 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 2,4 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 8 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 342 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 4,5 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26  $\equiv$  6,99 mg/kg  $\equiv$  139,7  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 51 mg pesados en un vial de 100 ml disueltos en 36,5 ml *terc*-butanol/tampón de citrato sódico 10 mM a 50/50, 3 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 6,2; se repartieron alícuotas de 2,4 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 2,4 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 5 % de sacarosa - pH 7,6.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFE737 mostró una eficacia antitumoral superior del compuesto AE-Ceto-Sulf07 a 4,5 mg/kg frente a auristatina E a 0,3 mg/kg, ambos administrados 8 veces dos veces a la semana, con significación estadística ( $p < 0,01$  el día 28). Los tumores en el grupo tratado con auristatina E no mostraron ninguna actividad, mientras que los ratones tratados con AE-Ceto-Sulf07 alcanzaron la remisión parcial del tumor el día 15 hasta el final del estudio el día 59, dando lugar a un efecto antitumoral a largo plazo.

No se registraron efectos secundarios.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 - tumores pequeños (Figura 17).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 147 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50,

sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

5 2) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 153 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 3,0 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  5,32 mg/kg  $\equiv$  106,3  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 51,0 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,8 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 0,72 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

15 3) 7 ratones, 25 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 141 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 5,0 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  8,86 mg/kg  $\equiv$  177,2  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 51,0 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,8 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

20 El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de carcinoma de ovario A2780 mostró una eficacia antitumoral superior estadísticamente significativa del compuesto AE-Ceto-Sulf07 a 3,0 y 5,0 mg/kg frente a la auristatina E a una dosis de 0,3 mg/kg, inyectados ocho veces dos veces a la semana ( $p < 0,01$  desde el día 7 al día 29). Los ratones tratados con auristatina E no lograron ningún efecto antitumoral y los tumores crecieron de manera equiparable a los tratados con el grupo de control. Sin embargo, el tratamiento con AE-Ceto-Sulf07 indujo una remisión parcial desde el día 9 hasta el final del estudio el día 60, con una remisión completa transitoria desde el día 23 al día 35 para la dosis más baja y desde el día 25 al día 51 para la dosis más alta, lo que resulta en una regresión tumoral a largo plazo, independientemente de la dosis.

25 30 Los grupos tratados con AE-Ceto-Sulf07 provocaron una pérdida de peso corporal transitoria de ~2 % después del primer tratamiento. Un ratón del grupo de dosis más alta fue encontrado muerto el día 35, y uno del grupo de dosis más baja tuvo que ser sacrificado el día 42 por malas condiciones generales.

35 **Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 - tumores grandes (Figura 18).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Ceto-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

40 Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

45 1) 8 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 341 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 3,7 mg pesados en un vial de 100 ml disueltos en 52,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,5 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,5 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

50 2) 8 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 378 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 4,5 mg/kg de AE-Ceto-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  6,99 mg/kg  $\equiv$  139,7  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 40,0 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,6 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,5 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,5 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

55 60 La eficacia antitumoral del compuesto AE-Ceto-Sulf07 también se probó en ratones con tumores más grandes (~360 mm<sup>3</sup>) del carcinoma de ovario humano modelo A2780. El fármaco mostró un efecto antitumoral superior estadísticamente significativo con una dosis de 4,5 mg/kg frente a la auristatina E a dosis de 0,3 mg/kg, ambos inyectados ocho veces dos veces a la semana ( $p < 0,001$  desde el día 22 al día 40). Los ratones tratados con auristatina E no lograron ningún efecto antitumoral, por el contrario, los ratones tratados con AE-Ceto-Sulf07 mostraron una remisión completa desde el día 26 hasta el final del estudio el día 103, alcanzando una regresión tumoral a largo plazo, como ya se ha observado con tumores más pequeños.

Los ratones tratados con AE-Ceto-Sulf07 solo tuvieron un crecimiento de peso corporal ligeramente reducido en comparación con el control.

**Evaluación inicial de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de cáncer de células renales humano RXF631 - tumores pequeños (Figura 19).**

La evaluación inicial de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo RXF631 de cáncer de células renales humanas se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para un modelo de xenoinjerto derivado de paciente.

Para esto, se prepararon soluciones madre *in vivo* del experimento de la siguiente manera:

1) 7 ratones, 25 g de peso promedio, volumen tumoral promedio de 138 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 7 ratones, 26 g de peso promedio, volumen tumoral promedio de 141 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 2,2-3,0 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 26  $\equiv$  4,00 mg/kg  $\equiv$  80,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 15,7 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 19,6 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de tween 80 - pH 7,6.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de células renales RXF631 muestra una eficacia antitumoral superior estadísticamente significativa del compuesto AE-Éster-Sulf07 administrado a 2,2 mg/kg (la dosis se aumentó temporalmente a 3,0 mg/kg en los días 15 y 19 de la inyección) frente a la dosis de auristatina E a 0,3 mg/kg, inyectados ocho y siete veces respectivamente dos veces a la semana ( $p < 0,05$ ). La auristatin E alcanzó un estado de enfermedad estable hasta el día ~40 para luego crecer de manera constante hasta el final del estudio. Por el contrario, el tratamiento con AE-Éster-Sulf07 provocó una remisión completa desde el día 24 al día 53, alcanzando un volumen tumoral mínimo de 1 mm<sup>3</sup> y un efecto a largo plazo.

AE-Éster-Sulf07 provocó una pérdida de peso corporal transitoria con un mínimo del 9 %, alcanzado el día 31. También se observaron heridas por mordeduras y rasguños a partir del día 17. Dos ratones murieron y uno tuvo que ser sacrificado por malas condiciones generales (los días 20, 43 y 66).

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375 - tumores grandes (Figura 20).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de cáncer de melanoma maligno humano A375 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

A tenor de la experiencia de dosificación en el modelo de xenoinjerto RXF631, se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 7 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 310 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 1, 6, 9, 13, 16  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 7 ratones, 29 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 371 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 2,4 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 1, 6, 9, 13, 16 = 4,37 mg/kg = 87,3  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 12,6 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 14,4 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de Tween 80 - pH 7,6.

3) 7 ratones, 31 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 355 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 2,4 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 3 semanas los días 1, 6, 9, 13, 16  $\equiv$  4,37 mg/kg  $\equiv$  87,3  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 12,6 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 14,4 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 4 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de melanoma A375 muestra una mejora antitumoral estadísticamente significativa del compuesto AE-Éster-Sulf07 administrado a 2,4 mg/kg (independientemente del tampón de reconstitución, 2 % de Tween 80 o 4 % de 2-HP $\beta$ CD) en comparación con la dosis de auristatina E a 0,3 mg/kg, inyectados cinco veces dos veces a la semana ( $p < 0,01$  del día 9 al 33). El tratamiento con auristatina E mostró una enfermedad inicial estable hasta el día 14, tras lo que los tumores crecieron de manera constante. Sin embargo, los ratones tratados con AE-Éster-Sulf07, lograron una remisión casi completa desde el día 16 hasta el final del estudio el día 37, alcanzando un mínimo de 4 mm<sup>3</sup> el día 23 y de 1 mm<sup>3</sup> el día 26 para AE-Éster-Sulf07 reconstituido con 2 % de Tween 80 y 4 % de 2-HP $\beta$ CD respectivamente, a pesar de la mediana del volumen tumoral tan alta al comienzo del experimento.

No se registró ningún cambio significativo en el peso corporal en comparación con el control, pero se observaron heridas por mordeduras y rasguños a partir del día 9. El tratamiento con Bepanthen mejoró la salud de los ratones heridos. Solo un ratón del grupo tratado con AE-Éster-Sulf07 y 2 % de Tween 80 tuvo que ser sacrificado por malas condiciones generales.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737 - tumores pequeños (Figura 21).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano LXFA737 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de pacientes.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 137 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 2 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,3 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,2 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 7 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 126 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 2,4 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25  $\equiv$  4,37 mg/kg  $\equiv$  87,3  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 31 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 28,5 ml *tert*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 0,96 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,2 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 4 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

El desarrollo del crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de CPNM LXFE737 mostró una eficacia antitumoral superior del compuesto AE-Éster-Sulf07 a 2,4 mg/kg frente a auristatina E a 0,3 mg/kg, ambos administrados 8 veces dos veces a la semana, con significación estadística ( $p < 0,05$  en los días 56 y 63). Los tumores en el grupo tratado con auristatina E permanecieron solo temporalmente en un estado de enfermedad estable del día 21 al día 42 y crecieron significativamente después del final del tratamiento. Por el contrario, los ratones tratados con AE-Éster-Sulf07 alcanzaron la remisión completa del tumor el día 21, reduciendo el volumen del tumor a un nivel inmensurable hasta el final del estudio el día 74, dando lugar a un efecto antitumoral a largo plazo.

Durante el transcurso del estudio, cinco ratones tuvieron que ser sacrificados debido a una combinación de pérdida de peso corporal y lesiones cutáneas.

**Evaluación de auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 - tumores grandes (Figura 22).**

La evaluación de la auristatina E y el derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 8 ratones, 28 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 341 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 0,3 mg/kg de sal de TFA de auristatina E (eq de AE) administrados dos veces a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  0,35 mg/kg  $\equiv$  7,1  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 3,7 mg pesados en un vial de 100 ml disueltos en 52,3 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,5 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,5 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, 20 % de propilenglicol - pH 7,0.

2) 8 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 403 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 1,9 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados una vez a la semana durante 4 semanas los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25  $\equiv$  3,46 mg/kg  $\equiv$  69,2  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 36,5 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 26,4 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 0,75 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,5 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 2 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

AE-Éster-Sulf07 administrado a una dosis de 1,9 mg/kg muestra una eficacia antitumoral superior en el modelo de carcinoma de ovario A2780 en comparación con la auristatina E administrada a una dosis de 0,3 mg/kg, ambos inyectados ocho veces dos veces a la semana ( $p < 0,001$  desde el día 37 al día 40). Los ratones tratados con auristatina E no lograron ningún efecto antitumoral. Sin embargo, los ratones tratados con AE-Éster-Sulf07, mostró una remisión parcial desde el día 19 hasta el día 51 y una remisión completa desde el día 54 hasta el final del estudio el día 103, lo que resulta en una regresión tumoral a largo plazo.

Los ratones tratados con AE-Éster-Sulf07 no mostraron signos de pérdida de peso corporal en comparación con el control, pero cuatro animales tuvieron que ser retirados del estudio debido a necrosis tumoral.

**Evaluación de los compuestos derivados de auristatina E que se unen a albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 - tumores pequeños (Figura 23).**

La evaluación del derivado de auristatina E que se une a la albúmina AE-Éster-Sulf07 en un modelo de carcinoma de ovario humano A2780 se llevó a cabo como se describe en el procedimiento general para modelos de xenoinjerto derivados de estirpes celulares.

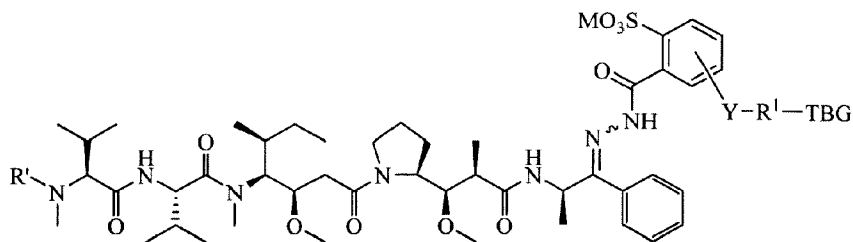
Se prepararon soluciones madre como se indica a continuación:

1) 8 ratones, 27 g de peso promedio, mediana del volumen tumoral promedio de 174 mm<sup>3</sup> el día de la aleatorización: 3,8 mg/kg de AE-Éster-Sulf07 (eq de AE) administrados una vez a la semana durante 4 semanas los días 1, 8, 15, 22  $\equiv$  6,67 mg/kg  $\equiv$  133,4  $\mu$ g/20 g de ratón. Preparación de la muestra: 25,6 mg pesados en un vial de 30 ml disueltos en 19,2 ml *terc*-butanol/tampón de fosfato sódico 10 mM a 50/50, sacarosa al 5 % - pH 7,0; se repartieron alícuotas de 1,5 ml en viales de 4 ml. Los viales se congelaron durante 1 h a -40 °C y se liofilizaron a -20 °C durante ~36 h y luego se taparon. El día de la inyección, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 1,5 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, 6 % de 2-HP $\beta$ CD - pH 7,6.

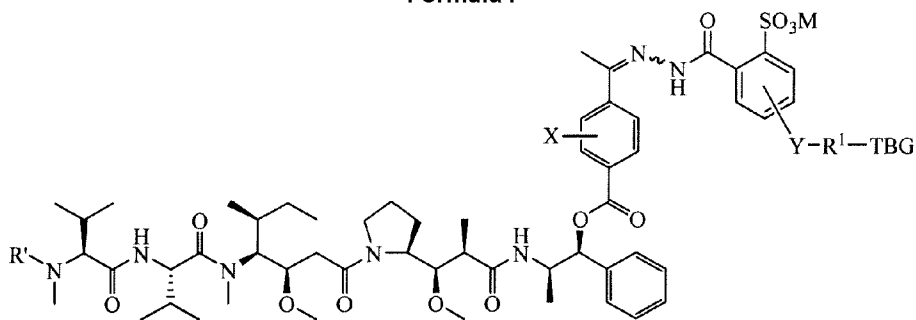
AE-Éster-Sulf07 también se probó en el mismo modelo de carcinoma de ovario A2780 con tumores más pequeños y una pauta posológica diferente para disminuir los efectos secundarios del fármaco en la piel de los ratones. AE-Éster-Sulf07 se administró a 3,8 mg/kg cuatro veces una vez a la semana, mostrando nuevamente un efecto antitumoral mejorado estadísticamente significativo en comparación con el control ( $p < 0,01$  del día 7 al 14). Los ratones tratados con AE-Éster-Sulf07 en la nueva pauta posológica lograron una remisión parcial desde el día 12 hasta el día 35 y una remisión completa desde el día 39 hasta el final del estudio el día 70. Tres ratones tratados con AE-Éster-Sulf07 mostraron pérdida de peso corporal y tuvieron que ser sacrificados el día 59.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula I o II:



Fórmula I



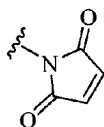
Fórmula II

10 o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato, tautómero, isómero E (*entgegen*), isómero Z (*zusammen*), enantiómero R, enantiómero S, diastereómero, isómero (D), isómero (L), estereoisómero, mezclas racémicas u otras mezclas de los mismos; en donde:

15 R' es H o -CH<sub>3</sub>,  
M es H o un contraión farmacéuticamente aceptable;  
Y está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, -NH-C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-O- y -O-C(O)-;  
R<sup>1</sup> está ausente o se selecciona entre un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> opcionalmente sustituido, en donde opcionalmente hasta  
20 seis átomos de carbono de dicho alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> están sustituidos cada uno independientemente con -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-;  
X es H o se selecciona entre halógeno (p. ej., -F, -Cl, -Br o -I), -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, -OR<sup>2</sup>, -NHCOR<sup>2</sup> y -OCOR<sup>2</sup>, en donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan cada uno independientemente entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
TBG es un grupo de unión a tiol seleccionado entre un grupo maleimida opcionalmente sustituido, un grupo  
25 haloacetamida opcionalmente sustituido, un grupo haloacetato opcionalmente sustituido, un grupo piridilíto opcionalmente sustituido, un grupo isotiocianato opcionalmente sustituido, un grupo vinilcarbonilo opcionalmente sustituido, un grupo aziridina opcionalmente sustituido, un grupo disulfuro opcionalmente sustituido y un grupo acetileno opcionalmente sustituido.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R' es -CH<sub>3</sub>.

30 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde a) el TBG se selecciona de un grupo maleimida opcionalmente sustituido; o b) el TBG es un grupo maleimida de fórmula:



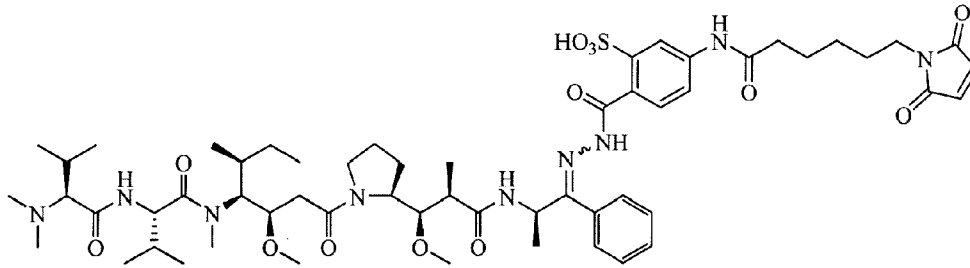
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde Y es -NH-C(O)-.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde M es H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>.

40 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde a) R<sup>1</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> opcionalmente sustituido; o b) R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene

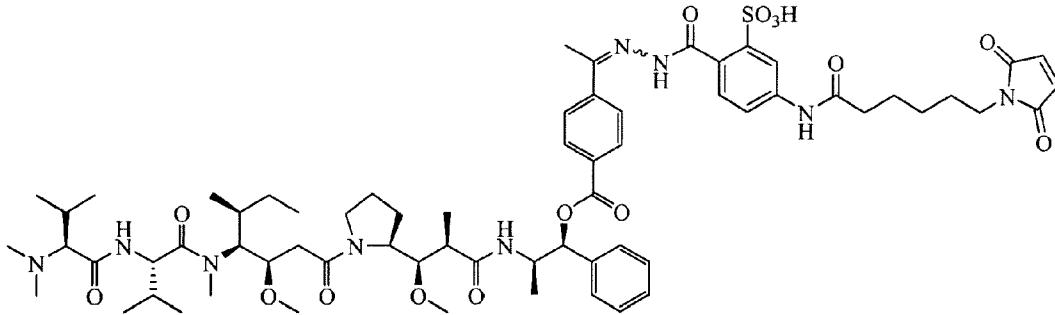
a) la estructura de Fórmula III:



Fórmula III

; o

b) la estructura de Fórmula IV:



Fórmula IV

8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona entre uno o más de un agente solubilizante, un agente encapsulante y un lioprotector.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde el portador farmacéuticamente aceptable comprende uno o más de dimetil-β-ciclodextrina, hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-β-ciclodextrina y trimetil-β-ciclodextrina.
11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la composición, cuando se administra por vía intravenosa a un paciente, a) se une covalentemente de forma selectiva y rápida *in situ* a la albúmina endógena en la circulación sanguínea; o b) se une covalentemente de manera selectiva y rápida *in situ* a un grupo tiol de cisteína-34 de albúmina endógena en la circulación sanguínea.
13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre un cáncer, una enfermedad vírica, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, y una enfermedad provocada por bacterias, hongos y otros microorganismos.
14. El compuesto o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad es cáncer seleccionado entre carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y melanoma.
15. El compuesto o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde la administración es administración intravenosa.
16. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para usar en la reducción de la citotoxicidad de un compuesto, en donde la administración produce una reducción de la citotoxicidad en comparación con una dosis equivalente de agente activo no modificado.

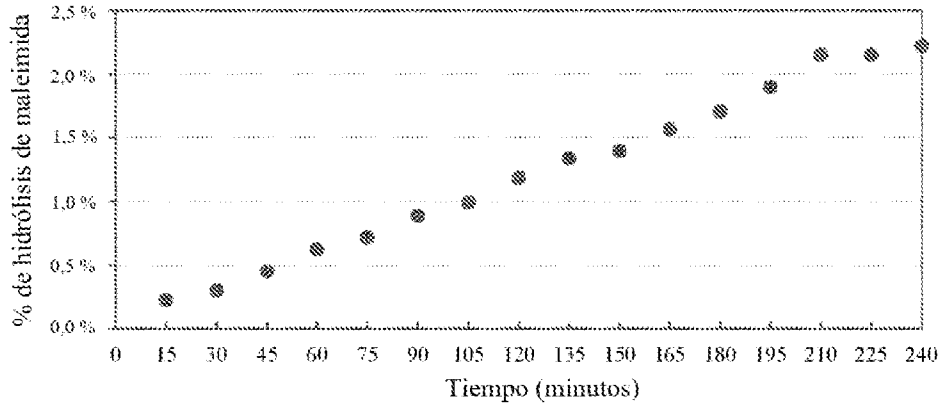
17. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para usar en el aumento de la concentración de un metabolito de un compuesto en un tumor, en donde el aumento se compara con una dosis equivalente de agente activo no modificado.

5

**Figura 1**

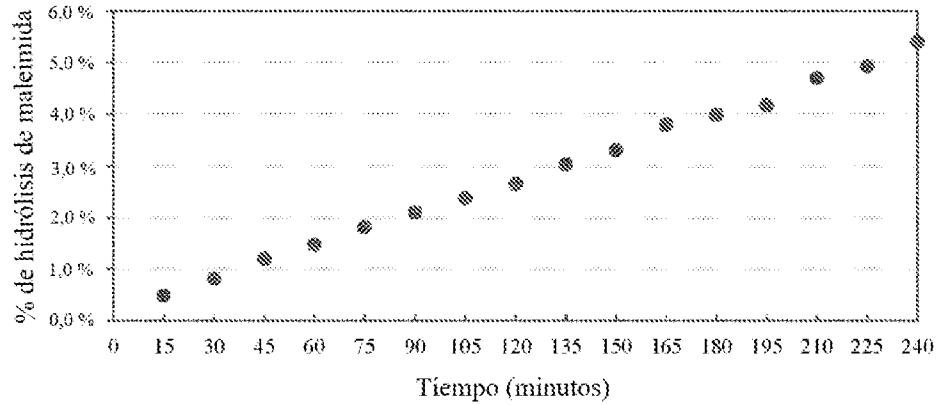
**(a)**

**Estabilidad de la reconstitución de AE-Ceto-Sulf07 (1277  $\mu$ M) en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,65 que contiene HPC $\beta$ D al 2 %**



**(b)**

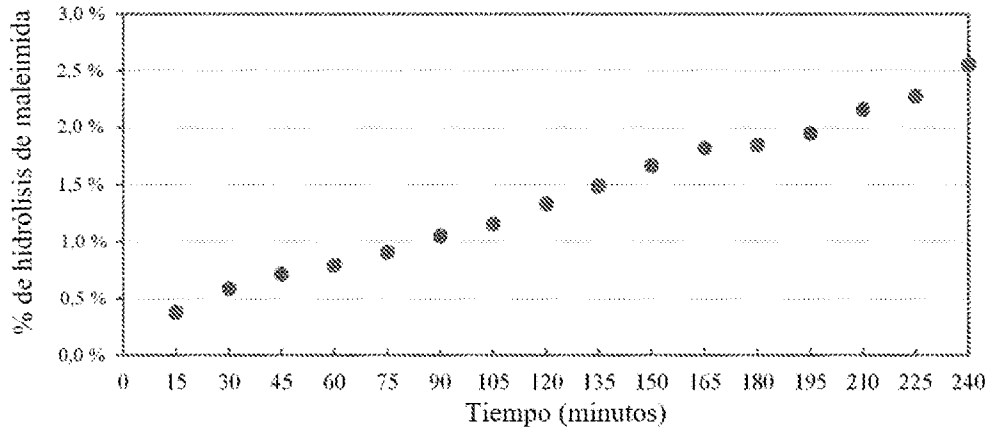
**Estabilidad de la reconstitución de AE-Ceto-EMCH (1277  $\mu$ M) en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,65 que contiene HPC $\beta$ D al 2 %**



**Figura 2**

**(a)**

**Estabilidad de la reconstitución de AE-Éster-Sulf07 (655  $\mu$ M) en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,65 que contiene HPC $\beta$ D al 4 %**



**(b)**

**Estabilidad de la reconstitución de AE-Éster-EMCH (655  $\mu$ M) en tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7,65 que contiene HPC $\beta$ D al 4 %**

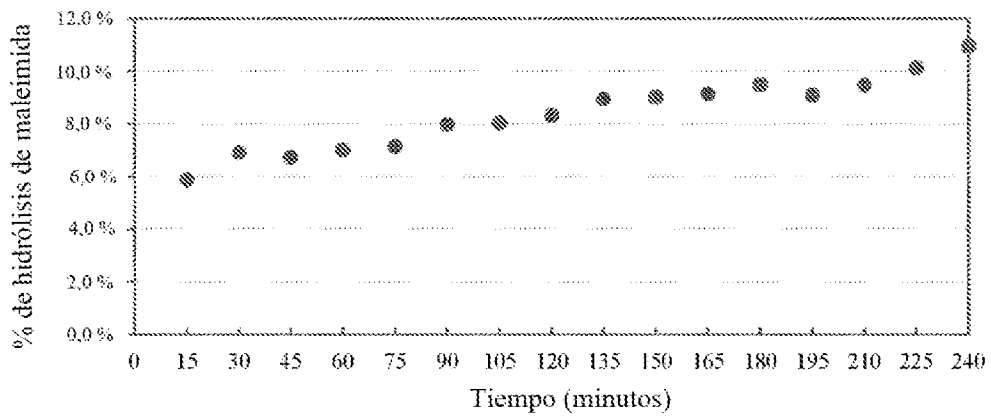


Figura 3

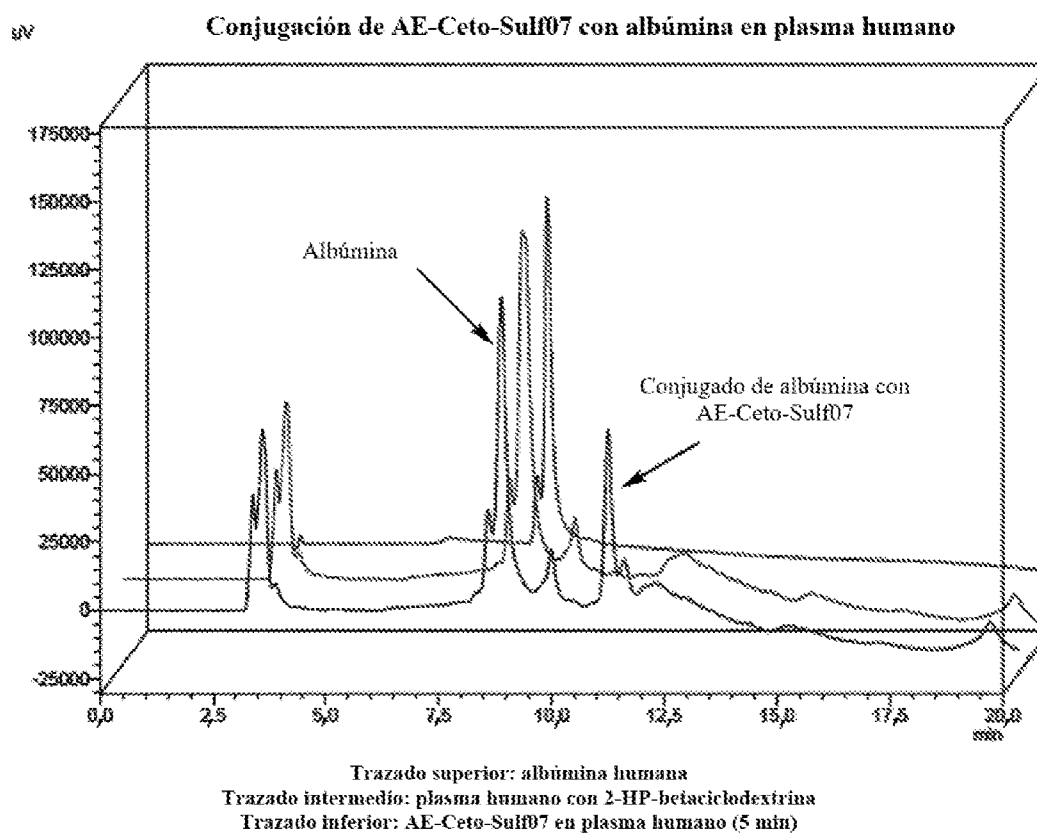
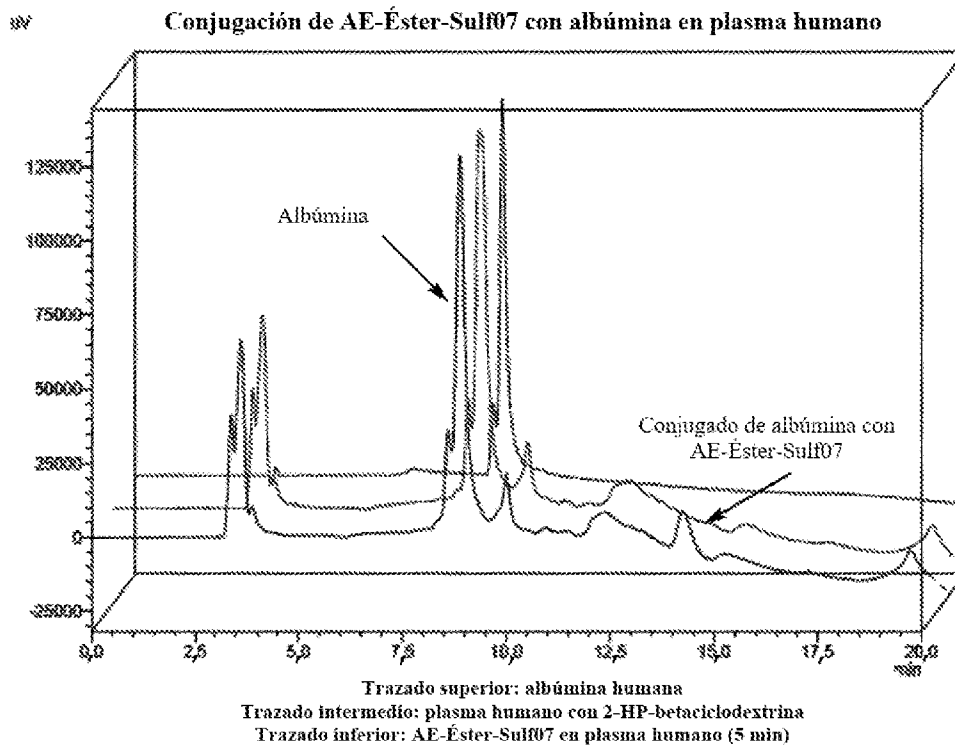


Figura 4



**Figura 5**

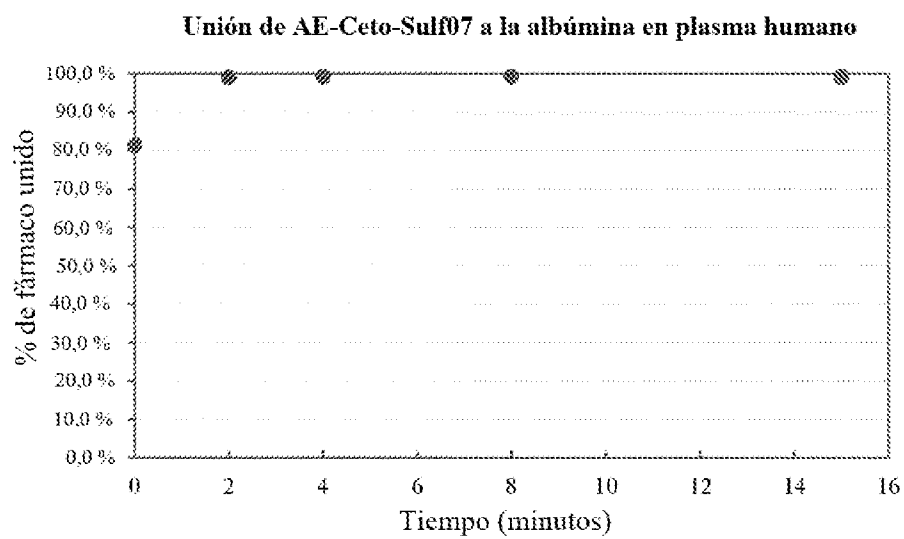


Figura 6

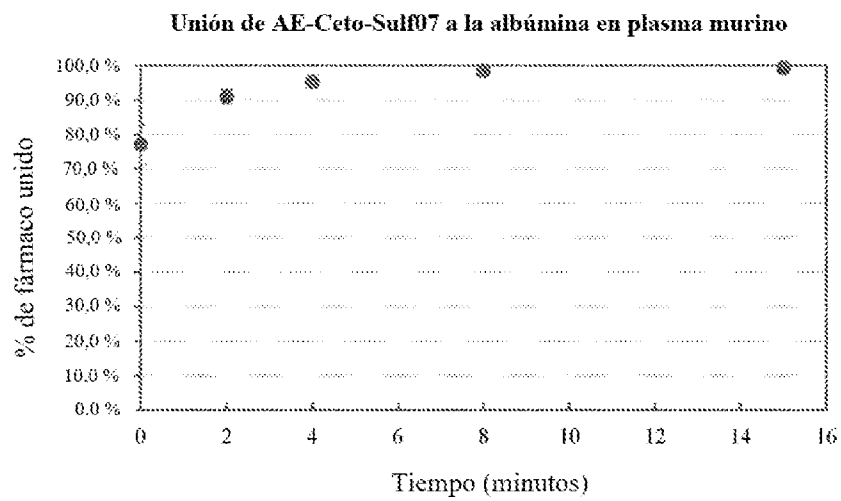
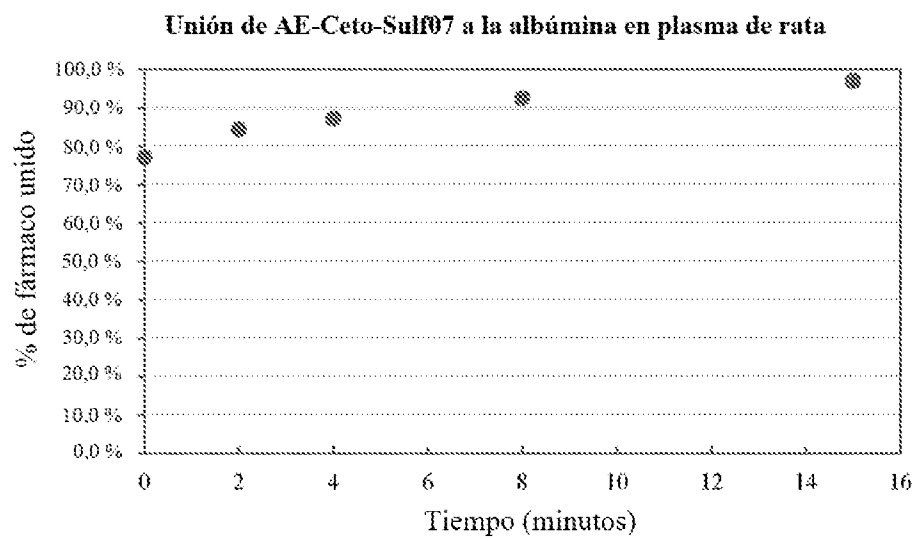


Figura 7



**Figura 8**

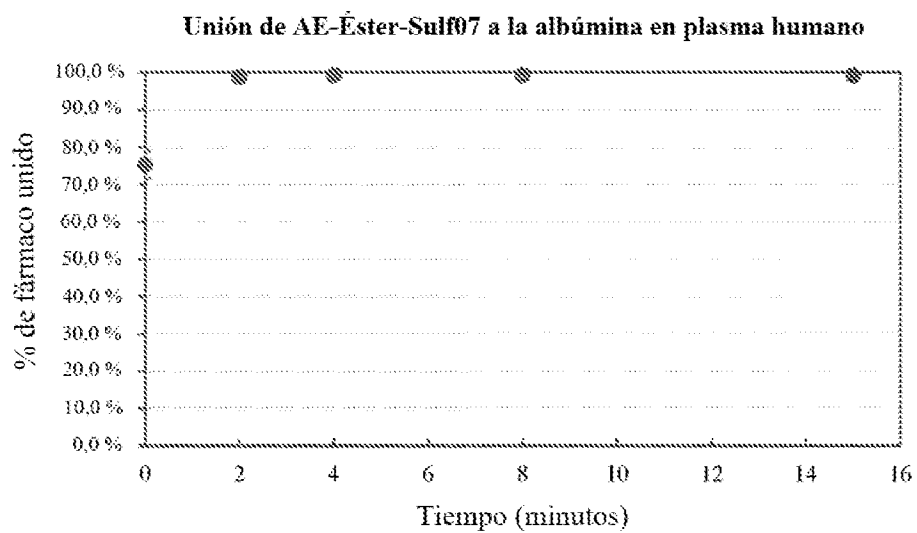
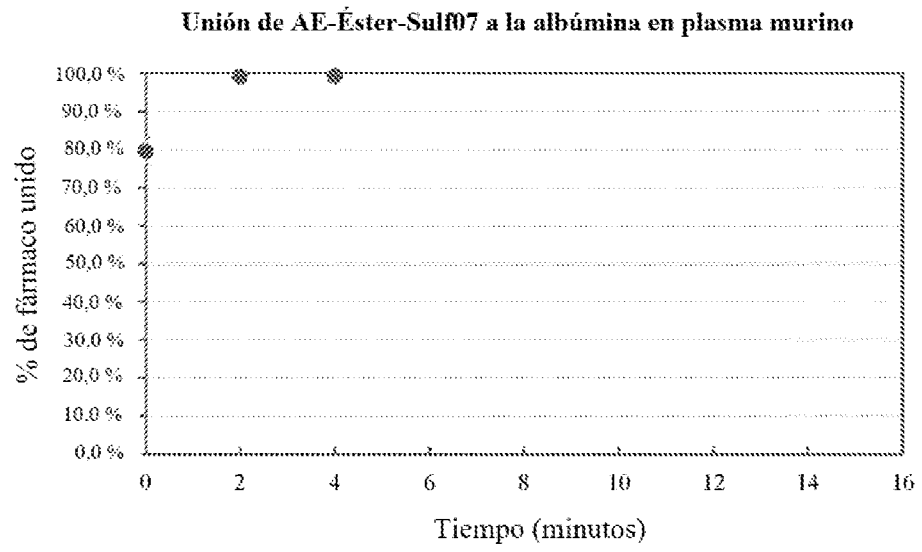


Figura 9



**Figura 10**

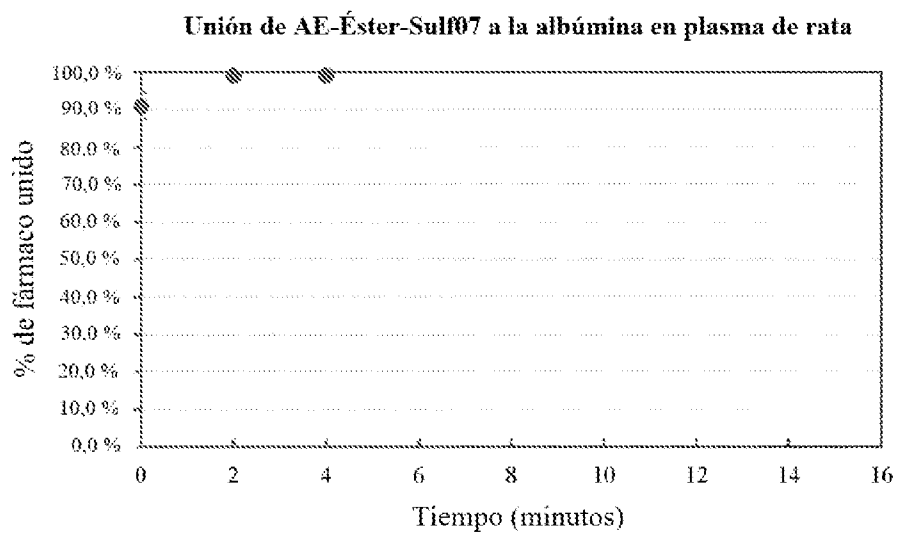
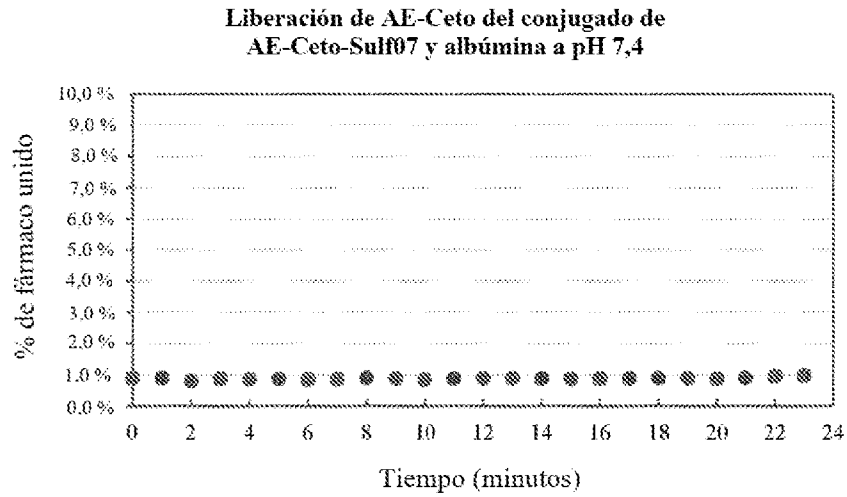


Figura 11

(a)



(b)

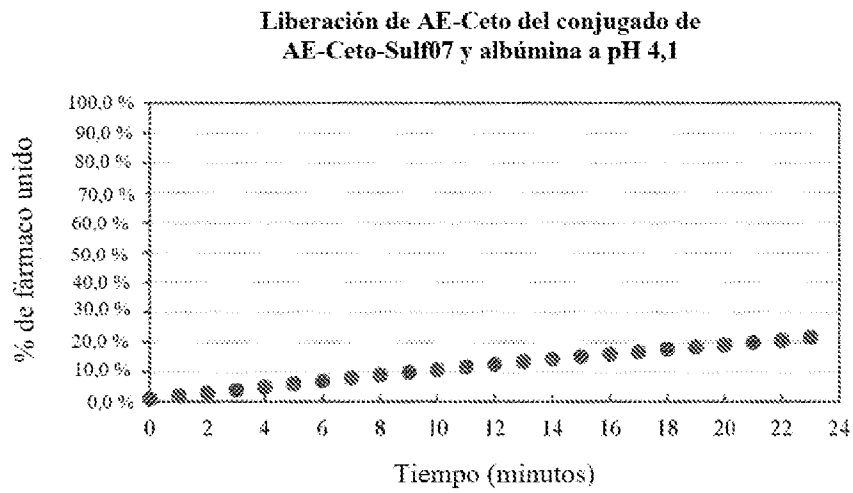
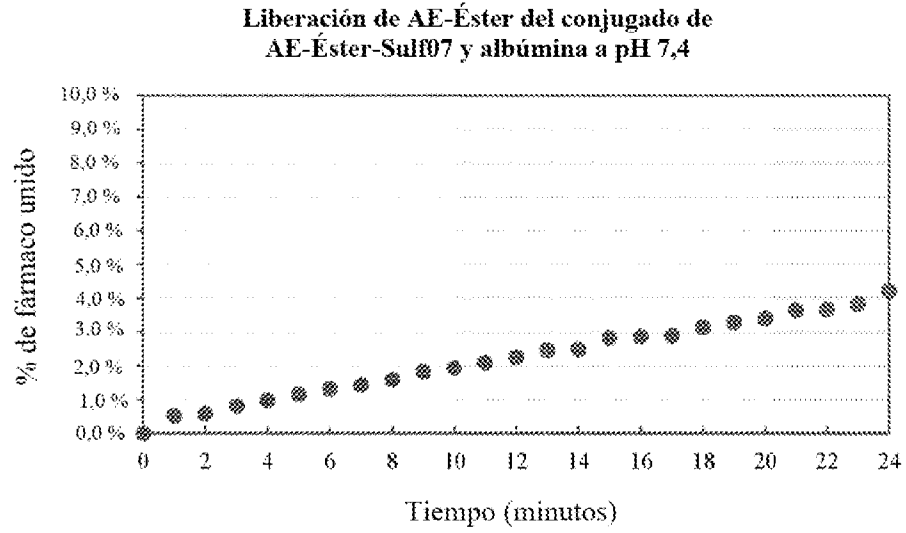


Figura 12

(a)



(b)

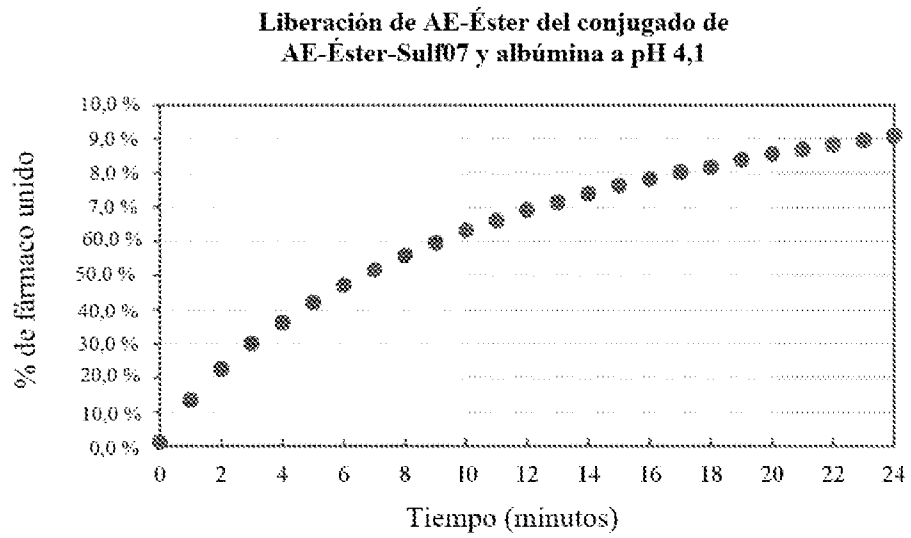


Figura 13

Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo  
 A375 - Tumores pequeños, Ind. Tiempo de 8 días  
 AE-Ceto-Sulf07, N = 7

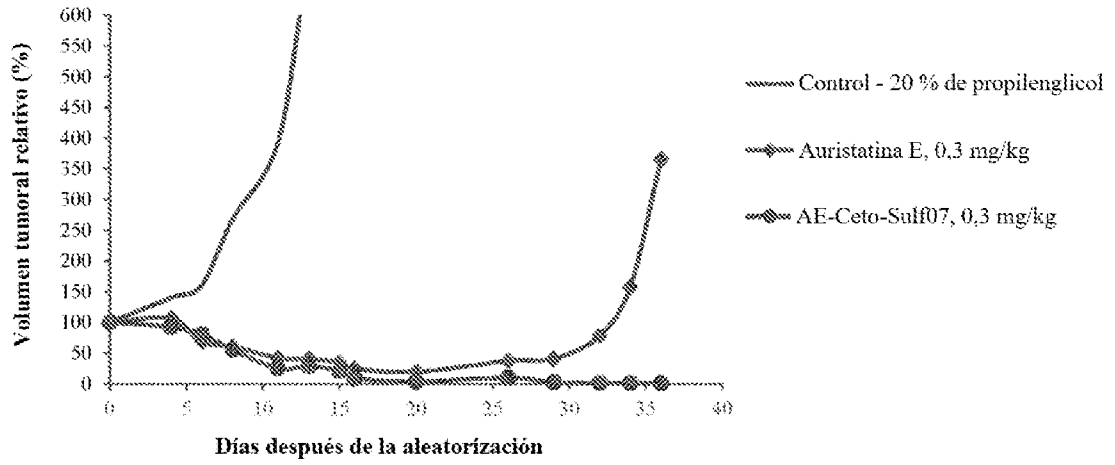


Figura 14

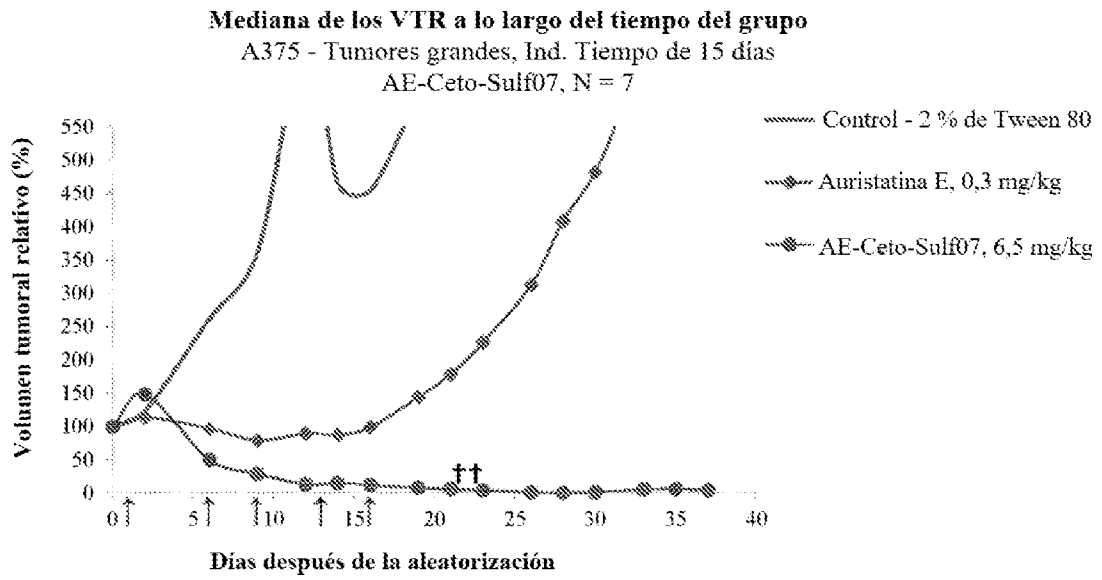


Figura 15

Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo  
 LXFA737 - Tumores pequeños, Ind. Tiempo de 29 días  
 AE-Ceto-Sulf07, N = 7

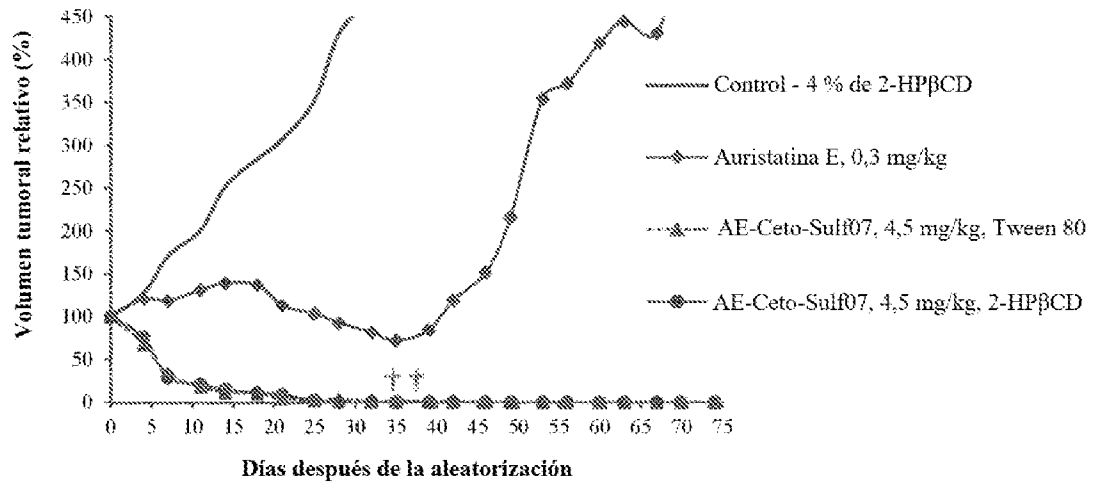


Figura 16

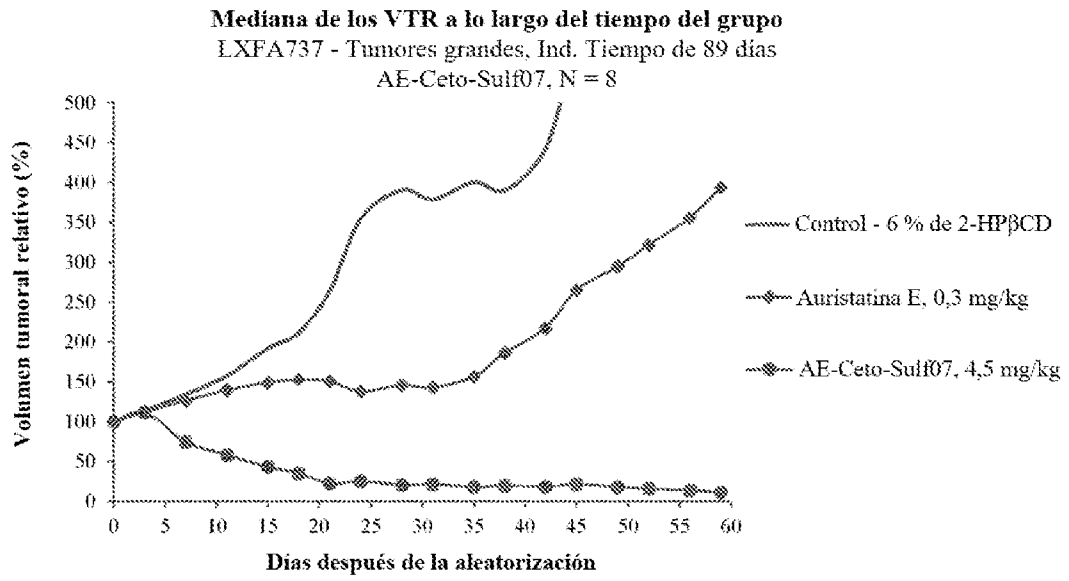


Figura 17

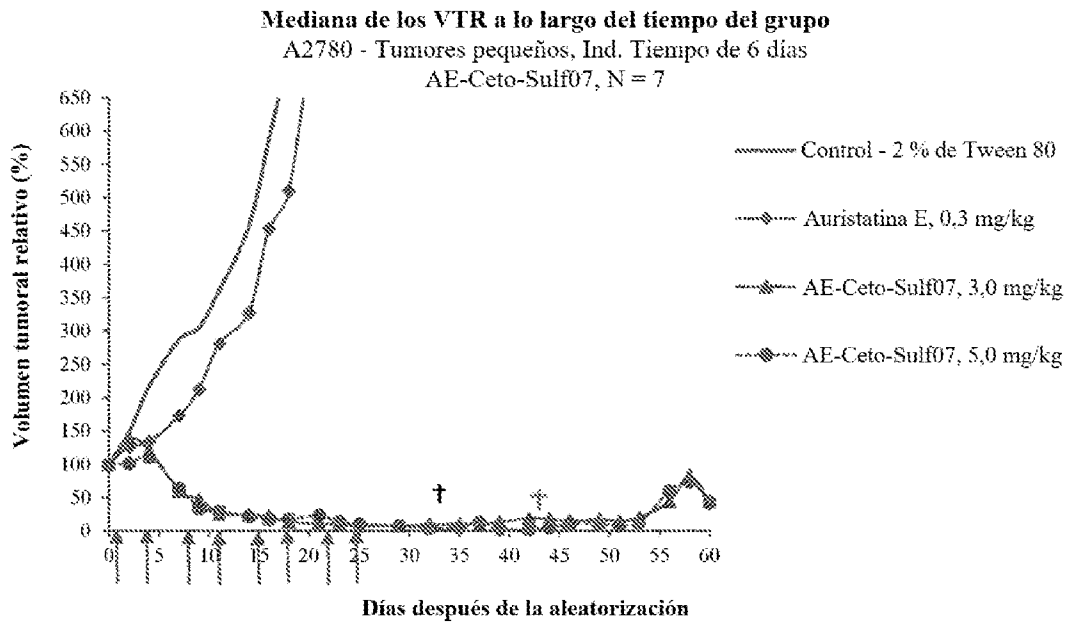


Figura 18

Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo  
 A2780 - Tumores grandes, Incl. Tiempo de 13 días  
 AE-Ceto-Sulf07, N = 8

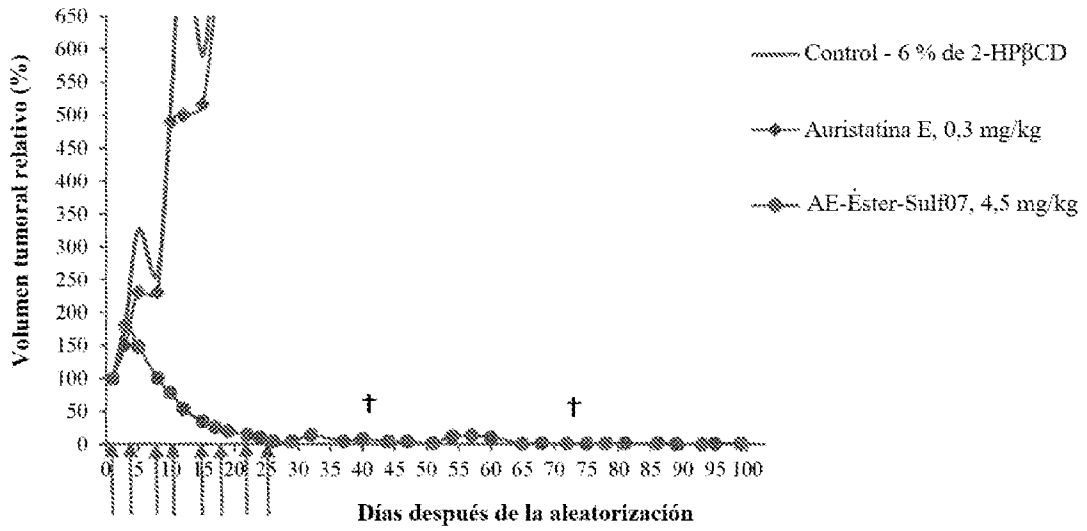


Figura 19

Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo  
 RXF631 - Tumores pequeños, Ind. Tiempo de 17 días  
 AE-Éster-Sulf07, N = 7

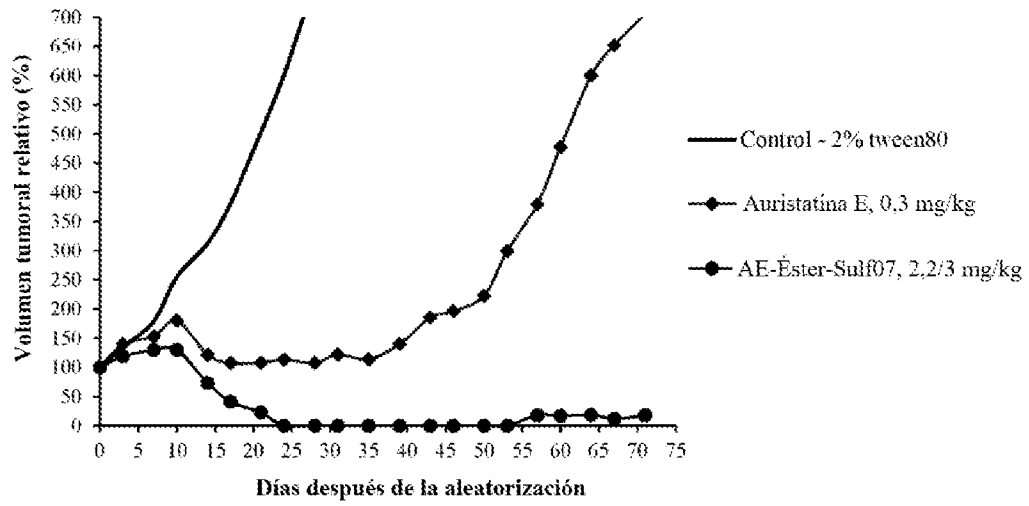


Figura 20

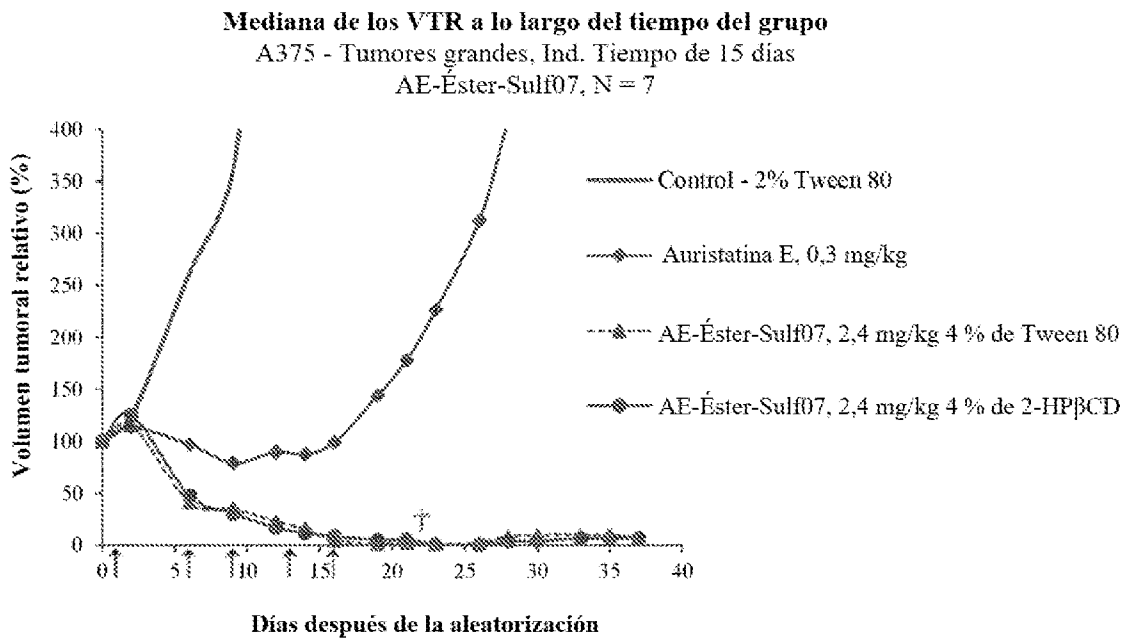
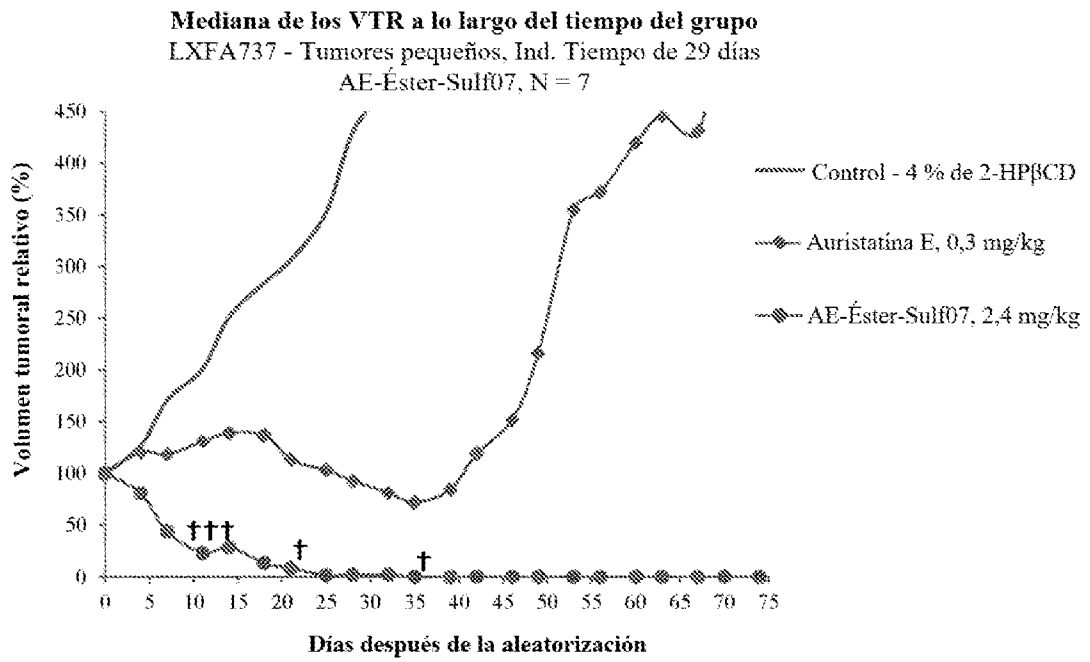


Figura 21



**Figura 22**

**Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo**  
 A2780 - Tumores grandes, Ind. Tiempo de 13 días  
 AE-Éster-Sulf07, N = 8

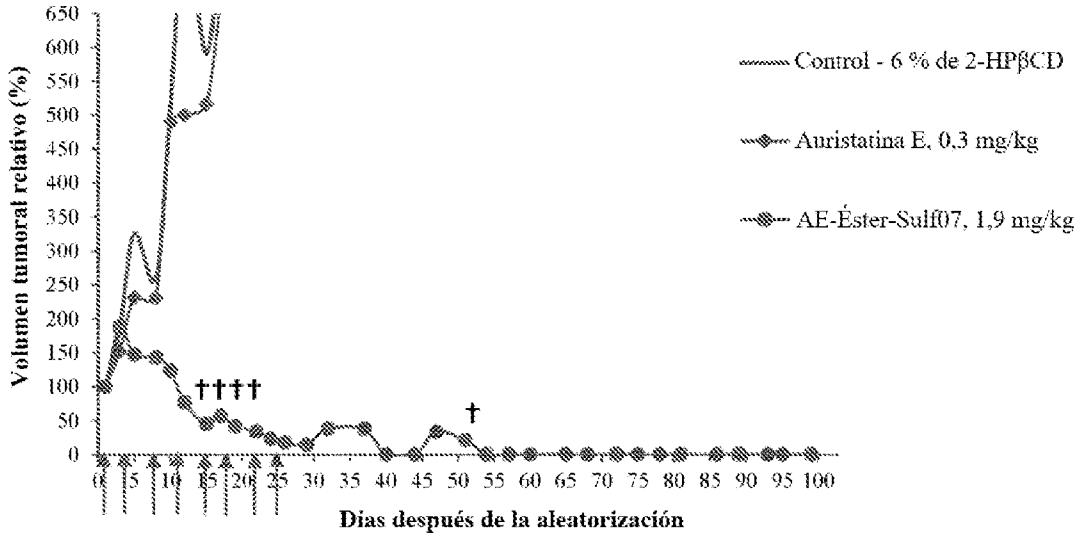


Figura 23

Mediana de los VTR a lo largo del tiempo del grupo  
 A2780 - Tumores pequeños, Ind. Tiempo de 9 días  
 AE-Éster-Sulf07, N = 8

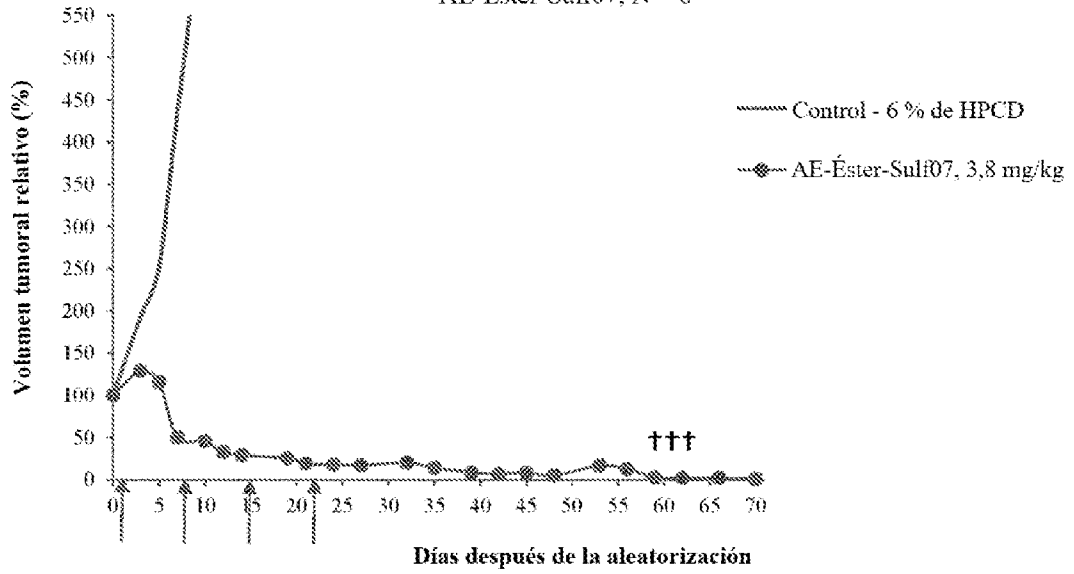


Figura 24

Fármacos que se unen a la albúmina derivados de AE-Ceto  
Estabilidad de la formulación liofilizada a 55 °C

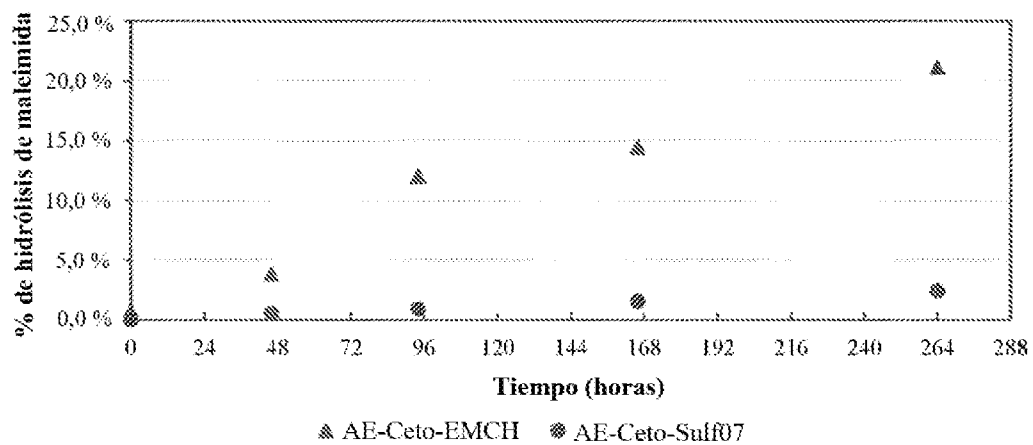


Figura 25

