



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 708**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03752681 .1**  
96 Fecha de presentación : **13.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1504010**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Conjugados de vitamina-mitomicina.**

30 Prioridad: **15.05.2002 US 380579 P**  
**13.11.2002 US 425918 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.08.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.08.2009**

73 Titular/es: **Endocyte, Inc.**  
**3000 Kent Avenue**  
**West Lafayette, Indiana 47906, US**

72 Inventor/es: **Vlahov, Iontcho, Radoslavov y**  
**Leamon, Christopher, Paul**

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 324 708 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

Conjugados de vitamina-mitomicina.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a composiciones y conjugados para su uso en el tratamiento de estados patológicos caracterizados por la proliferación de poblaciones de células patógenas. Más particularmente, la invención se refiere a conjugados de folato-mitomicina, a su uso para eliminar selectivamente una población de células patógenas en un animal huésped y a un método de preparación de los conjugados.

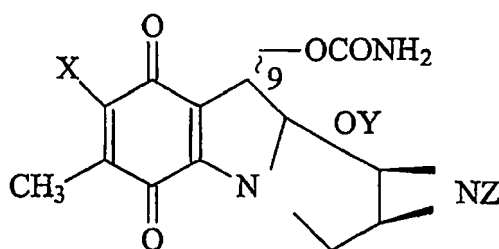
10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario de los mamíferos proporciona un medio para el reconocimiento y la eliminación de células tumorales, otras células patógenas y patógenos foráneos invasores. Aunque el sistema inmunitario proporciona normalmente una fuerte línea de defensa, existen muchos casos en los que células cancerosas, otras células patógenas o agentes infecciosos eluden una respuesta inmunitaria del huésped y proliferan o persisten con patogenicidad concomitante para el huésped. Se han desarrollado agentes quimioterápicos y radioterapias para eliminar neoplasias en replicación. Sin embargo, la mayoría, si no todos, de los regímenes de radioterapia y agentes quimioterápicos disponibles actualmente tienen efectos secundarios adversos porque funcionan no sólo destruyendo células cancerosas, sino que también afectan a células normales del huésped, tales como células del sistema hematopoyético. Los efectos secundarios adversos de los fármacos anticancerígenos disponibles actualmente ponen de relieve la necesidad del desarrollo de nuevas terapias específicas para poblaciones de células patógenas y con una toxicidad reducida para el huésped.

Los investigadores han desarrollado protocolos terapéuticos para destruir células cancerosas dirigiendo compuestos citotóxicos hasta tales células. Muchos de estos protocolos utilizan toxinas conjugadas a anticuerpos que se unen a antígenos únicos para o sobreexpresados por células cancerosas en un intento de minimizar el suministro de la toxina a las células normales. Usando este enfoque se han desarrollado ciertas inmunotoxinas que consisten en anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos en las células patógenas, enlazándose los anticuerpos a toxinas tales como ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica y factor de necrosis tumoral. Estas inmunotoxinas seleccionan como diana las células tumorales que portan los antígenos específicos reconocidos por el anticuerpo (Olsnes, S., *Immunol. Today*, 10, págs. 291-295, 1989; Melby, E.L., *Cancer Res.*, 53(8), págs. 1755-1760, 1993; Better, M.D., publicación PCT número WO 91/07418, publicada el 30 de mayo de 1991). Aunque las inmunotoxinas se dirigen contra antígenos específicos en las células patógenas, el componente de toxina de estos compuestos puede mostrar toxicidad para las células normales del huésped. También se ha descrito el uso de vitaminas para suministrar agentes quimioterápicos a células (véase la patente estadounidense número 5.416.016).

Otro enfoque para seleccionar como diana poblaciones de células cancerosas o patógenos foráneos en un huésped consiste en potenciar la respuesta inmunitaria del huésped frente a las células patógenas para evitar la necesidad de la administración de compuestos que también pueden mostrar toxicidad independiente para el huésped. Una estrategia notificada para inmunoterapia consiste en unir anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos multiméricos modificados mediante ingeniería genética, a la superficie de la célula tumoral para presentar la región constante de los anticuerpos en la superficie celular e inducir de ese modo la destrucción de células tumorales mediante diversos procesos mediados por el sistema inmunitario (De Vita, V.T., *Biologic Therapy of Cancer*, 2ª ed. Filadelfia, Lippincott, 1995; Soullou, J.P., patente estadounidense 5.672.486). Sin embargo, estos enfoques se han visto complicados por las dificultades al definir antígenos específicos de tumores. Por tanto, sigue habiendo una necesidad significativa de terapias eficaces con una toxicidad para el huésped minimizada dirigidas al tratamiento de estados patológicos caracterizados por la existencia de poblaciones de células patógenas en el huésped afectado.

Las mitomicinas son productos naturales que se sabe que muestran actividad antitumoral. Las mitomicinas pueden producirse mediante la fermentación de *Streptomyces caespitosus*, y las mitomicinas conocidas representativas incluyen mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F y porfiromicina. Las estructuras de estos compuestos se representan mediante la siguiente fórmula genérica con los sustituyentes mostrados en la tabla 1.



# ES 2 324 708 T3

TABLA 1

Mitomicina	X	Y	Z	C-9
A	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	β
B	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	α
C	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	β
D	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	α
E	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α
F	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	β
J	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	α
Porfiromicina	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	β

Las mitomicinas son una clase de fármacos citotóxicos que se conocen como agentes de alquilación que contienen quinona. La reducción del resto quinona da como resultado la formación de especies de alquilación bifuncionales que pueden formar enlaces covalentes con una variedad de componentes celulares incluyendo el ADN. La interacción con el ADN da como resultado la formación de entrecruzamientos de ADN que conducen a la inducción de apoptosis y muerte celular, y se cree que esta interacción es el factor contribuyente más importante para la actividad antitumoral de los compuestos de mitomicina.

## Sumario de la invención

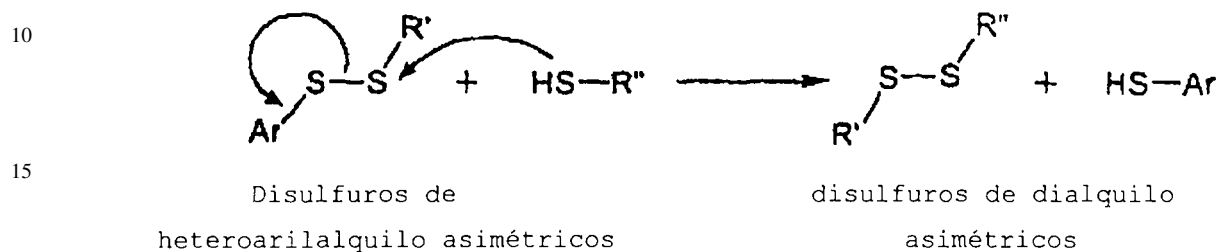
La presente invención se refiere a conjugados tal como se definen en la reivindicación 1 que comprenden un resto de vitamina que es folato unido a un compuesto de mitomicina mediante un grupo de unión escindible, a su uso en el tratamiento de estados patológicos caracterizados por la proliferación de una población de células patógenas y a un método de preparación de los conjugados. Los conjugados de vitamina-mitomicina según la invención pueden usarse para eliminar selectivamente una población de células patógenas en un huésped afectado. La eliminación selectiva de las células patógenas está mediada por la unión del resto folato del conjugado de vitamina-mitomicina a un receptor de folato, una proteína transportadora u otra proteína presentada en la superficie que se une específicamente a la vitamina de selección como diana, y que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por las células patógenas. Los conjugados de vitamina-mitomicina pueden internalizarse en las células seleccionadas como diana con la unión del resto folato a un receptor, una proteína transportadora o proteína expresada en la superficie de este tipo, y, con la presencia de un grupo de unión escindible usado para conjugar el resto folato al compuesto de mitomicina, el resto folato y el compuesto de mitomicina pueden disociarse intracelularmente. El compuesto de mitomicina disociado interacciona después con el ADN, tal como formando entrecruzamientos con el ADN, dando como resultado la destrucción o inhibición de la proliferación de las células patógenas.

Los receptores de vitamina expresados en la superficie, tales como el receptor de folato de alta afinidad, se sobreexpresan, por ejemplo, en las células cancerosas. Se ha notificado que todos de los cánceres epiteliales de ovario, glándula mamaria, colon, pulmón, nariz, garganta y cerebro expresan niveles elevados del receptor de folato. De hecho, se sabe que más del 90% de todos los tumores de ovario humanos expresan grandes cantidades de este receptor. En consecuencia, la presente invención puede usarse para destruir o inhibir la proliferación de una variedad de tipos de células tumorales y de otros tipos de células patógenas que sobreexpresan receptores de vitamina.

Aunque se sabe que las mitomicinas muestran una excelente actividad antitumoral, las mitomicinas también muestran citotoxicidad hacia los leucocitos en el animal huésped tratado con estos compuestos. En un esfuerzo por aumentar la actividad antitumoral de las mitomicinas y/o disminuir la toxicidad no deseada de estos compuestos, se han preparado derivados de mitomicinas que contienen una variedad de modificaciones en el grupo amino C-7 en el esqueleto de aminomitosano. Entre los derivados de mitomicina conocidos con toxicidad reducida están los disulfuros de dialquilo asimétricos que contienen sustituyentes en C-7 de fórmula RSS (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH- en la que i) R es un grupo alquilo (véanse la solicitud de patente europea número 0116208A1 y la solicitud de patente japonesa número 175493/84), ii) R contiene un anillo aromático (véanse las solicitudes de patente europea números 0116208A1 y 0163550A2, la solicitud de patente japonesa número 255789/85 y la patente estadounidense número 4.866.180) y iii) R está relacionado estructuralmente con fragmentos de péptidos o aminoácidos (véanse la solicitud de patente europea número 0163550A2, la solicitud de patente japonesa número 255789/85 y la patente estadounidense número 4.691.024).

## ES 2 324 708 T3

5 Todos los métodos conocidos para la preparación de tales disulfuros de dialquilo asimétricos se basan en una transtiolación de disulfuros de heteroaril-alquilo asimétricos con alquil-tiol. En particular, los grupos salientes de heteroariltio más comunes son 2-tiopiridilo (véanse el documento WO 88/01622 y la publicación de solicitud europea número 0116208A1) y 3-nitro-2-tiopiridina (véase la patente estadounidense número 4.691.024). La fuerza impulsora de esta reacción de escisión son las excelentes propiedades como grupo saliente del resto heteroariltio. La reacción es tal como sigue:



20 Los conjugados de vitamina-mitomicina según la presente invención pueden prepararse mediante un procedimiento novedoso para la preparación de disulfuros de dialquilo asimétricos que se basa en la tiofilicidad de reactivos de tiosulfonato. El esquema sintético para la preparación de los reactivos de tiosulfonato, mitomicina A y para la síntesis de un derivado de vitamina (por ejemplo, folato terminado en cisteína) para su uso en este procedimiento de preparación se muestra en el esquema 1 a continuación (Fmoc = 9-fluorenilmetiloxycarbonilo; Boc = terc-butiloxycarbonilo; Dap = ácido diaminopropiónico; DMF = dimetilformamida; DIPEA = diisopropiletilamina; DMSO = dimetilsulfóxido; TFAA = ácido trifluoroacético; PyBOP = benzotriazol-1-iloxi-tris-(hexafluorofosfato de pirrolidinofosfonio)).

30

(Esquema pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

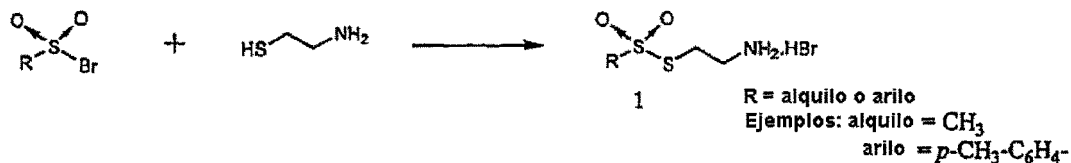
60

65

# ES 2 324 708 T3

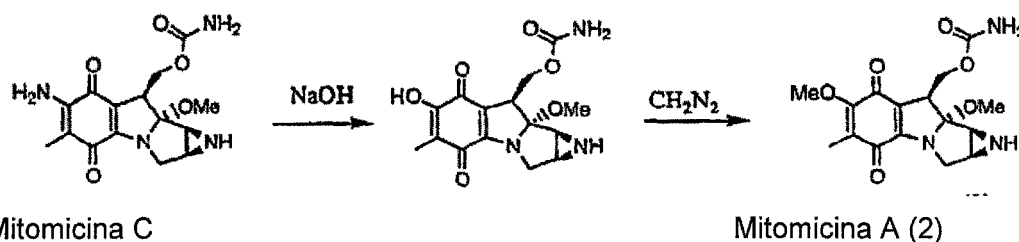
## Esquema 1

### Síntesis de tiosulfonatos<sup>a)</sup>:



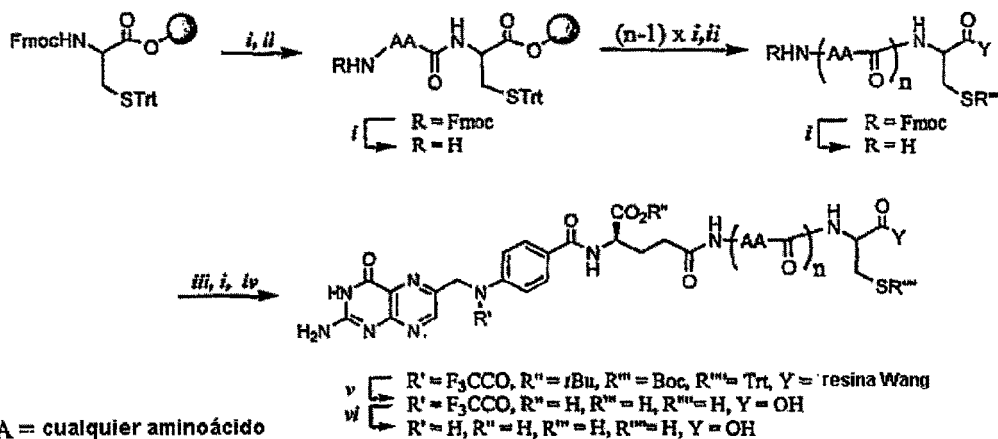
a) M. G. Ranasinghe, P. L. Fuchs, *Synthetic Communications*, 18(3), 227-232 (1988)

### Síntesis de mitomicina A<sup>b)</sup>:



b) M. Matsui, Y. Yamada, K. Uzu, T. Hirata, *J. Antibiot.* 21, 189-198 (1968); D. Vias, D. Benigni, R. Partyka, T. Doyle, *J. Org. Chem.* 51, 4307-4309 (1986).

### Esquema general para la síntesis en fase sólida de derivados de folato terminado en cisteína:

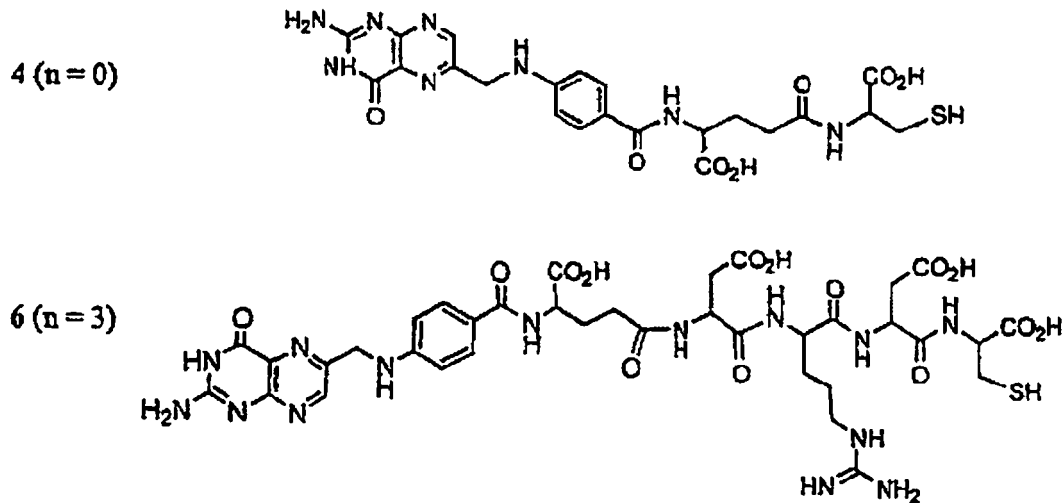


55

60

Reactivos y condiciones: i) piperidina al 20%, DMF; ii) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF; iv) *N*<sup>10</sup>-TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; v) TFAA, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH, iPr<sub>3</sub>SiH; vi) H<sub>4</sub>NOH, pH = 10,3.

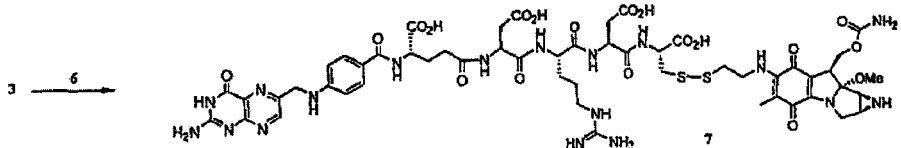
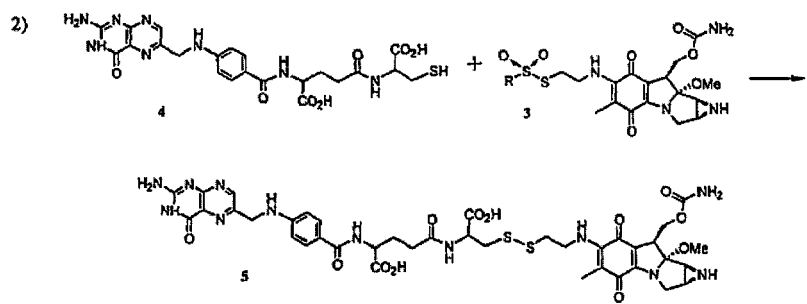
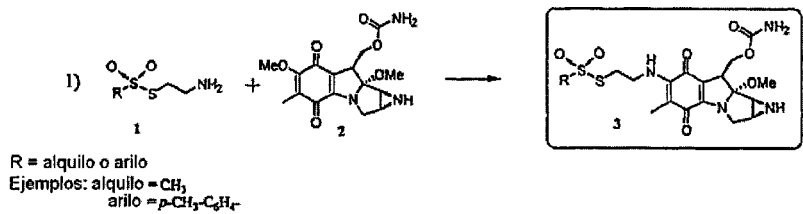
Ejemplos



25 Se presentan esquemas sintéticos a modo de ejemplo para la síntesis de los presentes conjugados de vitamina-mitomicina como sulfuros de dialquilo asimétricos usando tiosulfonatos como esquemas 2 y 3 a continuación. En los conjugados con enlaces disulfuro, uno de los restos alquilo se une al grupo amino en C-7 en el esqueleto de mitosano, y el otro se une covalentemente a través de un grupo de unión divalente o directamente a una molécula de vitamina, o un análogo de unión al receptor de vitamina o derivado del mismo.

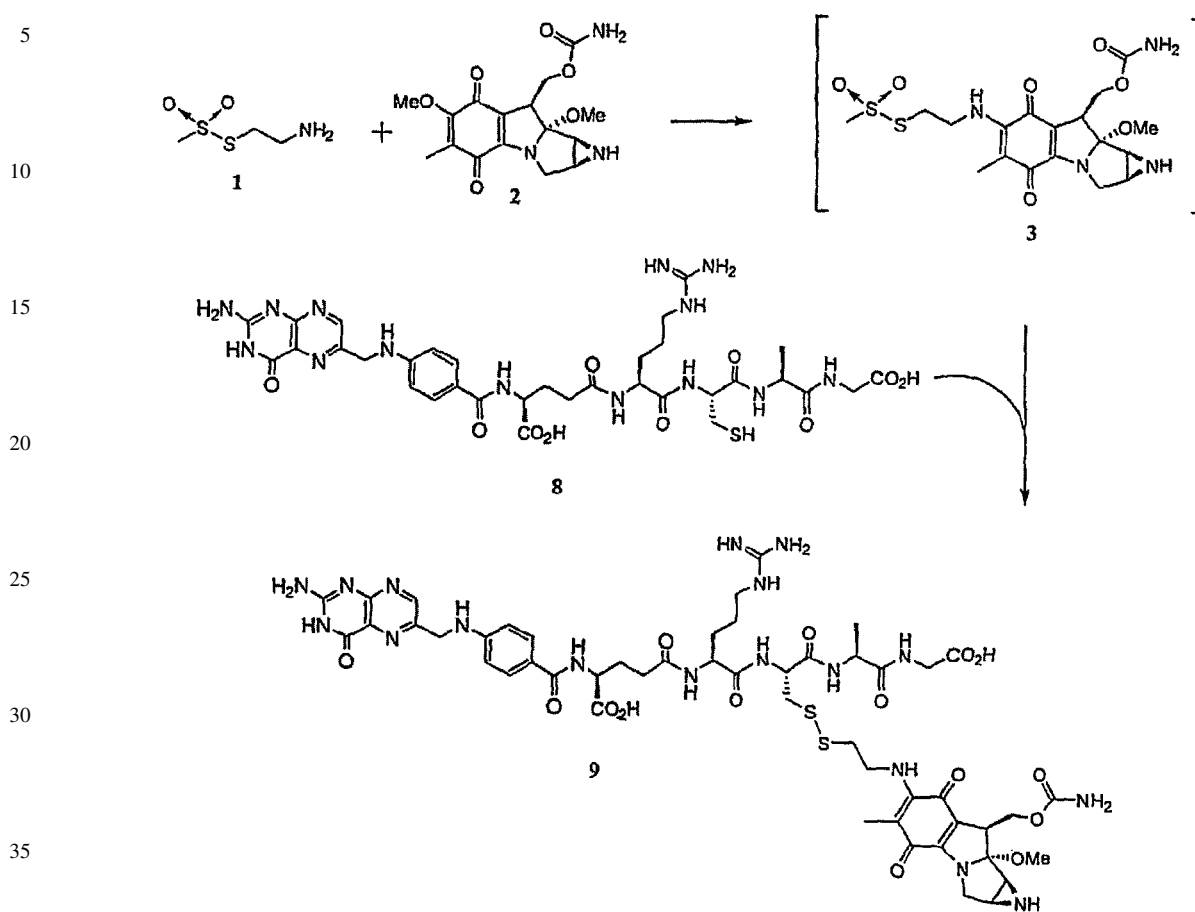
Esquema 2

Síntesis de sulfuros de dialquilo asimétricos usando tiosulfonatos



# ES 2 324 708 T3

## Esquema 3



En ambos esquemas 2 y 3, en primer lugar se hizo reaccionar una amina disponible comercialmente 1, que contiene un grupo tiosulfonato, con el éster metílico vinílico en C-7 en el resto quinona del derivado de mitosano 2. En segundo lugar, se usa el reactivo de tiosulfonato 3 resultante para la sulfonilación de tioles, tales como los que se encuentran en la pteroil-glutamil-cisteína 4, en Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-OH 6 o Pte-Glu-Arg-Cys-Ala-Gly-OH 8, que son todos derivados del ácido fólico. La formación instantánea de disulfuro produce un conjugado de vitamina-mitomicina, por ejemplo, un conjugado de pteroil-Glu-Cys-S-mitomicina C 5, un conjugado de Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-S-mitomicina C-OH 7 o un conjugado de Pte-Glu-Arg-Cys-S-mitomicina C-Ala-Gly-O 9, con rendimiento casi cuantitativo.

En realizaciones de la presente invención en las que la unión disulfuro es un disulfuro de dialquilo asimétrico, tal como un disulfuro de dialquilo asimétrico preparado mediante el procedimiento descrito anteriormente, los conjugados de vitamina-mitomicina eliminan selectivamente las células patógenas y tienen una toxicidad reducida hacia las células normales. En realizaciones en las que el resto de vitamina está conjugado a un compuesto de mitomicina mediante una unión disulfuro de este tipo, el resto de vitamina y el compuesto de mitomicina pueden disociarse en las condiciones reductoras que existen intracelularmente.

Se proporciona un conjugado de fórmula general

B-L-X

en la que el grupo B es un folato o un análogo o un derivado del mismo, que se une a un receptor de folato accesible en la superficie que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por una población de células patógenas, en la que el grupo L comprende un grupo de unión escindible siendo el grupo de unión escindible un grupo disulfuro, y en la que el grupo X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado de mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfirimicina.

También se describe un conjugado para su uso en un método de eliminación selectiva de una población de células patógenas en un animal huésped que alberga la población de células en el que los elementos de la po-

## ES 2 324 708 T3

blación celular tienen un sitio de unión accesible en la superficie para una vitamina. El conjugado es de fórmula general

B-L-X

tal como se definió anteriormente.

El método puede comprender además la etapa de administrar al animal huésped un agente quimioterápico tal como paclitaxel.

Aún en otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fórmula general

B-L-X

en la que el grupo B es un folato, o un análogo o un derivado del mismo, que se une a un receptor de folato accesible en la superficie que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por la población de células patógenas, en la que el grupo L comprende un grupo de unión escindible siendo el grupo de unión escindible un grupo disulfuro, y en la que el grupo X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado de mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender además un agente quimioterápico tal como paclitaxel.

Todavía en otra realización se proporciona un método de preparación de un conjugado biológicamente activo de fórmula

B-L-X

en la que

B es un folato o un derivado o análogo de unión al receptor de folato del mismo;

X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado de mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina;

y L es un grupo de unión divalente que comprende un enlace disulfuro, comprendiendo el método las etapas de formar un producto intermedio de tiosulfonato de fórmula  $B-(L')_nSSO_2R$  o un producto intermedio de fórmula  $X-(L')_nSSO_2R$

y hacer reaccionar el producto intermedio de tiosulfonato con un compuesto de fórmula  $X-(L')_{n'}-SH$  o  $B-(L'')_{n'}-SH$ , respectivamente,

en las que  $L'$  y  $L''$  son, independientemente, grupos de unión divalentes a través de los cuales se une covalentemente el grupo tiol SH a B y X, respectivamente;

n y n' son 1 ó 0; y

R es alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo o arilo o heteroarilo sustituido.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una comparación entre las citotoxicidades de EC72 (véase el esquema 1; triángulos rellenos) y mitomicina C (cuadrados rellenos). También se muestran la citotoxicidad de EC72 en presencia de folato libre en exceso (círculos rellenos).

La figura 2 muestra la supervivencia en porcentaje de ratones que portan el tumor M109 a los que se les inyectó PBS (control; cuadrados rellenos), mitomicina C (círculos en blanco) o EC72 (círculos rellenos).

La figura 3 muestra la supervivencia en porcentaje de ratones que portan el tumor M109 a los que se les inyectó PBS (control; triángulos rellenos), mitomicina C (cuadrados rellenos), EC72 (círculos rellenos) o EC72 más folato libre en exceso (rombos rellenos).

## ES 2 324 708 T3

La figura 4 muestra el tamaño del tumor en ratones a los que se les implantaron células M109 para formar tumores subcutáneos y tratados con PBS (cuadrados rellenos) o EC72 (círculos rellenos).

5 La figura 5 muestra la RMN 1D de un conjugado de pteroil-Glu-Cys-S-mitomicina C (compuesto 5; véase el esquema 2), un conjugado de Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-S-mitomicina C-OH (compuesto 7; véase el esquema 2) y un conjugado de Pte-Glu-Arg-Cys-S-mitomicina C-Ala-Gly-O (compuesto 9; véase el esquema 3).

10 La figura 6 muestra la RMN 2D de un conjugado de pteroil-Glu-Cys-S-mitomicina C (compuesto 5; véase el esquema 2), un conjugado de Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-S-mitomicina C-OH (compuesto 7; véase el esquema 2) y un conjugado de Pte-Glu-Arg-Cys-S-mitomicina C-Ala-Gly-O (compuesto 9; véase el esquema 3).

15 La figura 7 muestra el tamaño del tumor en ratones a los que se les implantaron células M109 para formar tumores subcutáneos y tratados con PBS (cuadrados rellenos) o taxol (20 mg/kg; círculos en blanco) o taxol más EC72 (círculos rellenos).

La figura 8 muestra el tamaño del tumor en ratones a los que se les implantaron células M109 para formar tumores subcutáneos y tratados con PBS (cuadrados rellenos) o taxol (15 mg/kg; círculos en blanco) o taxol más EC72 (círculos rellenos).

20 La figura 9 muestra la unión de <sup>3</sup>H-ácido fólico a células KB en presencia de concentraciones crecientes de ácido fólico libre (curva inferior) o EC72 (curva superior).

25 La figura 10 muestra la inhibición de la síntesis de ADN de células KB mediante concentraciones crecientes de EC72 (círculos rellenos) o EC72 en presencia de folato libre 0,1 mM (círculos en blanco).

La figura 11 muestra la supervivencia en porcentaje de ratones que portan el tumor M109 a los que se les inyectó PBS (control; cuadrados rellenos) o concentraciones crecientes de EC72 (rombos rellenos = 100 nmol/kg de EC72, triángulos rellenos = 400 nmol/kg de EC72 y círculos rellenos = 1800 nmol/kg de EC72).

30 La figura 12 muestra el tamaño del tumor en ratones a los que se les implantaron células 4T-1 negativas para el receptor de folato para formar tumores subcutáneos y el tratamiento con PBS (cuadrados rellenos) o EC72 (círculos rellenos).

### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere a conjugados que comprenden un resto folato unido a un compuesto de mitomicina mediante un grupo de unión escindible. Los conjugados de vitamina-mitomicina según la invención pueden usarse para eliminar selectivamente una población de células patógenas en un huésped afectado. La eliminación selectiva de las células patógenas está mediada por la unión del resto de vitamina del conjugado de vitamina-mitomicina a un receptor de folato, una proteína transportadora u otra proteína presentada en la superficie que se une específicamente a folatos o análogos de folato y que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por las células patógenas. Una proteína presentada en la superficie expresada de manera única, sobreexpresada o expresada preferentemente por las células patógenas es preferiblemente un receptor presente o no presente a menores concentraciones en células no patógenas que proporciona un medio para la eliminación selectiva de las células patógenas.

45 Los conjugados de vitamina-mitomicina se internalizan con la unión del resto folato a tal receptor, proteína transportadora o proteína expresada en la superficie y el resto folato y el compuesto de mitomicina pueden disociarse intracelularmente con la escisión de un grupo de unión escindible usado para unir covalentemente el resto folato al compuesto de mitomicina. El grupo de unión escindible puede ser, por ejemplo, una unión disulfuro que da como resultado una toxicidad reducida del conjugado de vitamina-mitomicina hacia las células normales. En realizaciones en las que el resto de vitamina se conjuga a un compuesto de mitomicina mediante una unión disulfuro, el resto de vitamina y el compuesto de mitomicina pueden disociarse en las condiciones reductoras que existen intracelularmente. Con su disociación del resto de vitamina, el compuesto de mitomicina puede interactuar con el ADN, tal como formando entrecruzamientos con el ADN, dando como resultado la destrucción o la inhibición de la proliferación de las células patógenas.

50 En una realización alternativa, el resto folato del conjugado puede unirse a la célula patógena poniendo el compuesto de mitomicina en estrecha asociación con la superficie celular. Entonces puede liberarse el fármaco mediante la escisión de la unión disulfuro, por ejemplo, mediante una proteína disulfuro isomerasa. El compuesto de mitomicina puede captarlo la célula patógena a la que se une el conjugado de vitamina-mitomicina, o el compuesto de mitomicina puede captarlo otra célula patógena en estrecha proximidad a la misma para interactuar con el ADN de la célula y destruir o inhibir la proliferación de la célula patógena. Alternativamente, podría liberarse el fármaco mediante una proteína disulfuro isomerasa dentro de la célula cuando el grupo de unión liberable es un grupo disulfuro.

65 En otra realización, o en combinación con las realizaciones descritas anteriormente, los conjugados de vitamina-mitomicina pueden actuar a través de un mecanismo independiente de los receptores celulares de vitamina. Por ejemplo, los conjugados pueden unirse a receptores solubles de vitamina presentes en el suero o a proteínas séricas, tales como albúmina, dando como resultado una circulación prolongada de los conjugados con relación a la mitomicina no

conjugada, y un aumento de la actividad de los conjugados hacia la población de células patógenas con relación a la mitomicina no conjugada.

Los conjugados de vitamina-mitomicina según la invención se utilizan para eliminar selectivamente una población de células patógenas en un animal huésped que alberga la población de células patógenas. La invención es aplicable a poblaciones de células patógenas que provocan una variedad de patologías incluyendo cáncer, enfermedades mediadas por macrófagos activados y enfermedades mediadas por cualquier otro tipo de células patógenas que sobreexpresan receptores de vitamina o receptores que se unen a análogos o derivados de vitaminas. Por tanto, la población de células patógenas puede ser una población de células cancerosas que es tumorigénica, incluyendo tumores benignos y tumores malignos, o puede ser no tumorigénica. La población de células cancerosas puede surgir espontáneamente o mediante procesos tales como mutaciones presentes la línea germinal del animal huésped o mutaciones somáticas, o puede inducirse químicamente, viralmente o mediante radiación. La invención puede utilizarse para tratar cánceres tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, enfermedad de Hodgekin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos, leucemias y mielomas. La población de células cancerosas puede incluir cánceres bucal, de tiroides, endocrino, de piel, gástrico, esofágico, laríngeo, de páncreas, de colon, de vejiga, óseo, de ovario, cervicouterino, uterino, de mama, de testículo, de próstata, rectal, de riñón, de hígado y de pulmón.

En realizaciones en las que la población de células patógenas es una población de células cancerosas, el efecto de la administración del conjugado es una respuesta terapéutica medida mediante la reducción o eliminación de la masa tumoral, el mantenimiento de la masa tumoral o de inhibición de la proliferación de células tumorales. En el caso de un tumor, la eliminación puede ser una eliminación de células del tumor primario o de células que han metastatizado o están en el proceso de disociarse del tumor primario. También se contempla según esta invención un tratamiento profiláctico con el conjugado de vitamina-mitomicina para prevenir la reaparición de un tumor tras su extirpación mediante cualquier enfoque terapéutico incluyendo la extirpación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia, o terapia biológica. El tratamiento profiláctico puede ser un tratamiento inicial con el conjugado de vitamina-mitomicina, tal como tratamiento en un régimen diario de dosis múltiples y/o puede ser un tratamiento o serie de tratamientos adicional tras un intervalo de días o meses tras el/los tratamiento(s) inicial(es). En consecuencia, la eliminación de la población de células patógenas incluye eliminación de células, inhibición de la proliferación de células patógenas, mantenimiento de la masa tumoral o un tratamiento profiláctico que previene la reaparición de células patógenas.

El conjugado de la presente invención puede usarse tanto para aplicaciones veterinarias como de medicina clínica en seres humanos. Por tanto, el animal huésped que alberga la población de células patógenas y tratado con conjugados de vitamina-mitomicina puede ser un ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agropecuario, doméstico o salvaje. La presente invención puede aplicarse a animales huésped incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, animales de laboratorio tales como roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, etc.), conejos, monos, chimpancés, animales domésticos tales como perros, gatos y conejos, animales agropecuarios tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, y animales salvajes en cautividad tales como osos, osos pandas, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines y ballenas.

Según la presente invención, los conjugados de vitamina-mitomicina se forman a partir de folatos o derivados/análogos de folato de unión a receptores y mitomicinas. Los conjugados de vitamina-mitomicina pueden seleccionar como diana selectivamente una población de células patógenas en el animal huésped debido a la expresión preferente de un receptor para la vitamina, accesible para la unión de la vitamina, en las células patógenas. El resto de vitamina descrito es ácido fólico. Esta vitamina, y sus análogos y derivados de unión a receptores, constituyen la entidad de selección como diana que puede acoplarse con mitomicinas mediante un grupo de unión escindible para formar los conjugados de folato-mitomicina para su uso según la invención. Los restos de vitamina incluyen ácido fólico, y análogos y derivados de unión a receptores de estas moléculas de folato, y otras moléculas relacionadas de unión al receptor de folato (véase la patente estadounidense número 5.688.488). Un ejemplo de un análogo de vitamina es un análogo de folato que contiene un residuo de ácido glutámico en la configuración D (el ácido fólico normalmente contiene un ácido glutámico en la configuración I, unido a ácido ptericoico). El compuesto de mitomicina se selecciona de mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina.

El sitio de unión para la vitamina es el receptor para folato, o un derivado o análogo del mismo, que puede unirse específicamente a dicho receptor en el que el receptor u otra proteína se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por una población de células patógenas. Una proteína presentada en la superficie expresada de manera única, sobreexpresada o expresada preferentemente por las células patógenas es normalmente un receptor que o bien no está presente o bien está presente a menores concentraciones en células no patógenas, proporcionando un medio para la eliminación selectiva de las células patógenas. En una realización, los ligandos que pueden usarse en los conjugados de la presente invención incluyen los que se unen a receptores expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato, que se une a folato o un análogo o derivado del mismo.

Según la invención los conjugados de vitamina-mitomicina pueden unirse con alta afinidad a receptores en células cancerosas u otras células patógenas. La unión de alta afinidad puede ser inherente al resto de vitamina o la afinidad de unión puede potenciarse mediante el uso de una vitamina modificada químicamente (es decir, un análogo o un derivado) o mediante la unión química particular entre la vitamina y el compuesto de mitomicina que está presente en el conjugado.

## ES 2 324 708 T3

El grupo de unión puede ser cualquier grupo de unión escindible biocompatible, tal como un grupo de unión susceptible de escisión en las condiciones reductoras presentes en las células, un grupo de unión lábil en medio ácido o un grupo de unión lábil con una enzima. Normalmente, el grupo de unión comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Normalmente, se emplean grupos de unión de menor peso molecular (es decir, aquellos que tienen un peso molecular aproximado de aproximadamente 30 a aproximadamente 300).

Generalmente, puede utilizarse cualquier modo de formación de un complejo entre el grupo de unión y el folato, o derivado o análogo de unión al receptor de folato, y entre el grupo de unión y la mitomicina, según la presente invención. El complejo puede formarse mediante conjugación directa del grupo de unión escindible con la vitamina y la mitomicina, por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, iónicos o covalentes. Los enlaces covalentes del folato, o derivado o análogo de unión al receptor de folato, y la mitomicina con el grupo de unión pueden producirse, por ejemplo, a través de la formación de enlaces amida, éster, disulfuro o imino entre grupos ácido, aldehído, hidroxilo, amino, sulfhidrilo o hidrazo. Además, según esta invención, el grupo de unión puede comprender un medio indirecto para asociar el folato con la mitomicina, tal como mediante conexión a través de grupos de unión intermedios, brazos espaciadores o moléculas puente. Ambos medios directos e indirectos para la asociación deben evitar la unión de la vitamina, o derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, al receptor de folato en la membrana celular para el funcionamiento del método de la presente invención.

La invención también proporciona un método de preparación de un conjugado biológicamente activo de fórmula



en la que

B es un folato o un derivado o análogo de unión al receptor de folato del mismo;

X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado de mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina

y L es un grupo de unión divalente que comprende un enlace disulfuro, comprendiendo dicho método las etapas de formar un producto intermedio de tiosulfonato de fórmula  $B-(L')_nSSO_2R$  o un producto intermedio de fórmula  $X-(L')_nSSO_2R$

y hacer reaccionar dicho producto intermedio de tiosulfonato con un compuesto de fórmula  $X-(L')_n-SH$  o  $B-(L'')_{n'}-SH$ , respectivamente, en las que  $L'$  y  $L''$  son, independientemente, grupos de unión divalentes a través de los cuales se une covalentemente el grupo tiol SH a B y X, respectivamente;

n y n' son 1 ó 0; y

R es alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo o arilo o heteroarilo sustituido.

La naturaleza de los grupos de unión  $L'$  y  $L''$  en los productos intermedios no es crítica excepto porque los grupos de unión son preferiblemente escindibles; ni tampoco es crítica la naturaleza del grupo R en el tiosulfonato para la preparación de los conjugados de vitamina. Normalmente se seleccionan precursores de tales grupos de unión para que tengan grupos funcionales o bien nucleófilos o bien electrófilos, o ambos, opcionalmente en una forma protegida con un grupo protector fácilmente escindible para facilitar su uso en la síntesis de la especie intermedia. El grupo de unión -L- en el conjugado, en virtud de su procedimiento de preparación sintético, también puede representarse como una amalgama del grupo de unión intermedio  $L'$  y  $L''$  mediante la fórmula  $-(L')_n-S-S-(L'')_{n'}$ . En el caso de -L'-, la entidad  $X-(L')_n-SH$  debe conservar actividad citotóxica.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de un conjugado de folato-mitomicina eficaz para eliminar una población de células patógenas en un animal huésped cuando se administra en una o más dosis. El conjugado de folato-mitomicina se administra preferiblemente al animal huésped por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intratecal. Alternativamente, el conjugado puede administrarse al animal huésped mediante otros procesos médicamente útiles, y puede usarse cualquier dosis eficaz y forma farmacéutica terapéutica adecuada, incluyendo formas farmacéuticas de liberación prolongada. El conjugado de la presente invención puede usarse en combinación con la extirpación quirúrgica de un tumor, radioterapia, quimioterapia, o terapias biológicas tales como otras inmunoterapias incluyendo, terapia con anticuerpos monoclonales, tratamiento con agentes inmunomoduladores, transferencia adoptiva de células efectoras inmunitarias, tratamiento con factores de crecimiento hematopoyético, citocinas y vacunación.

Los ejemplos de formas farmacéuticas parenterales incluyen disoluciones acuosas del agente activo, en una solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos tales como alcoholes, glicoles, ésteres y amidas líquidos. La forma farmacéutica parenteral según esta invención puede estar en forma de un liofilizado que puede reconstituirse que comprende la dosis del conjugado de vitamina-mitomicina.

En un aspecto preferido de la presente realización, puede administrarse cualquiera de varias formas farmacéuticas de liberación prolongada conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, las matrices de hidratos de carbono biodegradables descritas en las patentes estadounidenses números 4.713.249; 5.266.333; y 5.417.982, o, alternativamente, puede usarse una bomba lenta (por ejemplo, una bomba osmótica).

5 Puede administrarse al huésped al menos una composición adicional que comprende un factor terapéutico en combinación o como adyuvante de la metodología detallada anteriormente, para potenciar la eliminación mediada por vitamina-mitomicina de la población de células patógenas, o puede administrarse más de un factor terapéutico adicional. El/los factor(es) terapéutico(s) puede(n) seleccionarse de un compuesto que puede estimular una respuesta inmunitaria endógena, un agente quimioterápico u otro factor terapéutico que puede complementar la eficacia del complejo de vitamina-mitomicina administrado. El método de la invención puede llevarse a cabo mediante la administración al huésped, además de los conjugados descritos anteriormente, de compuestos o composiciones que pueden estimular una respuesta inmunitaria endógena incluyendo, pero sin limitarse a, citocinas o factores de crecimiento de células inmunitarias tales como interleucinas 1-18, factor de células madre, FGF básico, EGF, G-CSF, GM-CSF, 10 ligando de FLK-2, HILDA, MIP-1 $\alpha$ , TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , M-CSF, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , CD23 soluble, LIF y combinaciones de los mismos.

Pueden usarse combinaciones terapéuticamente eficaces de estos factores. En una realización, por ejemplo, pueden usarse cantidades terapéuticamente eficaces de IL-2, por ejemplo, en cantidades que oscilan desde aproximadamente 5000 U.I./dosis/día hasta aproximadamente 500.000 U.I./dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, o, por ejemplo, en cantidades que oscilan desde aproximadamente 7500 U.I./dosis/día hasta aproximadamente 150.000 U.I./dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, junto con los conjugados de vitamina-mitomicina para eliminar células patógenas en un animal huésped que alberga una población de células de este tipo. Alternativamente, puede usarse IL-2 en combinación con IFN- $\alpha$  en la que puede usarse IL-2, por ejemplo, en cantidades que oscilan desde 0,1 M.U.I./m<sup>2</sup>/dosis/día hasta aproximadamente 15 M.U.I./m<sup>2</sup>/dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, y puede usarse IFN- $\alpha$ , por ejemplo, en cantidades que oscilan desde aproximadamente 0,1 M.U.I./m<sup>2</sup>/dosis/día hasta aproximadamente 7,5 M.U.I./m<sup>2</sup>/dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, junto con los conjugados para eliminar o neutralizar células patógenas en un animal huésped que alberga las células patógenas (M.U.I. = millón de unidades internacionales; m<sup>2</sup> = área de superficie corporal aproximada de un ser humano medio). En otra realización, se usan IL-12 y IFN- $\alpha$  en cantidades terapéuticamente eficaces, y aún en otra realización se usan IL-15 y IFN- $\alpha$  en cantidades terapéuticamente eficaces. En una realización alternativa, se usan IL-2, IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  y GM-CSF en combinación. La invención también contempla el uso de cualquier otra combinación eficaz de citocinas incluyendo combinaciones de otras interleucinas e interferones y factores estimulantes de colonias.

Los agentes quimioterápicos, que son citotóxicos en sí mismos, pueden actuar para potenciar la permeabilidad tumoral, pueden inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales, y similares, también son adecuados para su uso en el método de la invención en combinación con conjugados de vitamina-mitomicina. Tales agentes quimioterápicos incluyen adrenocorticoides, agentes de alquilación, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, estrógenos, antimetabolitos tales como arabinósido de citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina y metotrexato, actinomicina D, gemcitabina, busulfano, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, trimetoprima, dicloxacilina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona, topotecán, etopósido, tamoxifeno, TAXOL<sup>®</sup> (es decir, paclitaxel), ciclofosfamida, ciclosporina, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, bleomicina, digoxina, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, vincristina, vinblastina, mitomicina C, agentes inflamatorios y proinflamatorios, y cualquier otro agente quimioterápico reconocido en la técnica.

El factor terapéutico adicional puede administrarse al animal huésped antes de, tras o al mismo tiempo que el conjugado de vitamina-mitomicina y el factor terapéutico puede administrarse como parte de la misma composición que contiene el conjugado o como parte de una composición diferente a la del conjugado de vitamina-mitomicina. Puede usarse cualquier composición terapéutica de este tipo que contiene el factor terapéutico a una dosis terapéuticamente eficaz en la presente invención incluyendo composiciones que contienen múltiples factores terapéuticos.

En una realización, el factor terapéutico adicional es TAXOL<sup>®</sup> (es decir, paclitaxel; vendido por Bristol Myers Squibb Company con la marca comercial TAXOL<sup>®</sup> y por Ivax Corporation con la marca comercial ONXOL<sup>™</sup>). Según esta invención, puede usarse TAXOL<sup>®</sup>, ONXOL<sup>™</sup>, cualquier otra forma genérica de TAXOL<sup>®</sup> o cualquier compuesto relacionado en combinación con los conjugados de vitamina-mitomicina. Pueden administrarse TAXOL<sup>®</sup>, formas genéricas de TAXOL<sup>®</sup> o compuestos relacionados, por ejemplo, a pacientes a dosis de aproximadamente de 10 a aproximadamente 500 mg/metro cuadrado, de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 mg/ metro cuadrado, de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mg/metro cuadrado o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg/metro cuadrado, pero puede usarse cualquier dosis eficaz en combinación con los conjugados de vitamina-mitomicina.

Adicionalmente, puede usarse cualquier régimen eficaz para la administración de TAXOL<sup>®</sup>, formas genéticas de TAXOL<sup>®</sup> o un compuesto relacionado. Por ejemplo, pueden administrarse TAXOL<sup>®</sup> o compuestos genéricos o relacionados a lo largo de 3 horas una vez cada 3 semanas durante un total de 18 semanas, pero se contempla cualquier otro régimen eficaz según esta invención. Pueden administrarse TAXOL<sup>®</sup> o compuestos genéricos o relacionados por cualquier vía eficaz tal como por vía oral o por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intratecal.

## ES 2 324 708 T3

Puede usarse más de un tipo de conjugado de administración de fármacos. Por ejemplo, el animal huésped puede tratarse con conjugados con diferentes vitaminas (por ejemplo, conjugados de folato-mitomomicina y conjugados de vitamina B<sub>12</sub>-mitomomicina) en un protocolo de dosificación conjunta. En otras realizaciones, el animal huésped puede tratarse con conjugados que comprenden diversas vitaminas unidas a diversas mitomomicinas. Por ejemplo, el animal huésped podría tratarse con un conjugado de folato-mitomomicina C y uno de folato-mitomomicina A, o con un conjugado de folato-mitomomicina C y un conjugado de vitamina B<sub>12</sub>-mitomomicina A. Además, podrían usarse los conjugados de administración de fármacos con las mismas o diferentes vitaminas y las mismas o diferentes mitomomicinas que comprenden múltiples vitaminas y múltiples mitomomicinas como parte del mismo conjugado de administración de fármacos.

La dosificación diaria unitaria del conjugado de vitamina-mitomomicina puede variar significativamente dependiendo del estado del huésped, el estado patológico que se está tratando, el peso molecular del conjugado, su vía de administración y la distribución tisular, y la posibilidad del uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos tales como radioterapia. La cantidad eficaz que ha de administrarse a un paciente se basa en el área de superficie corporal, el peso del paciente y la valoración del médico del estado del paciente. Una dosis eficaz puede oscilar desde aproximadamente 1 ng/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 1  $\mu$ g/kg hasta aproximadamente 500  $\mu$ g/kg y lo más preferiblemente desde aproximadamente 1  $\mu$ g/kg hasta aproximadamente 100  $\mu$ g/kg.

Puede usarse cualquier régimen eficaz para administrar el conjugado de vitamina-mitomomicina. Por ejemplo, puede administrarse el conjugado de vitamina-mitomomicina como dosis únicas, o puede dividirse y administrarse como un régimen diario de dosis múltiples. Además, puede usarse un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a tres días a la semana como alternativa al tratamiento diario, y con el fin de definir esta invención, se considera que tal régimen diario intermitente o escalonado es equivalente al tratamiento cada día y está dentro del alcance de esta invención. En una realización de la invención, el huésped se trata con múltiples inyecciones del conjugado de vitamina-mitomomicina para eliminar la población de células patógenas. En una realización, se le inyecta al huésped múltiples veces (preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 veces) el conjugado de vitamina-mitomomicina, por ejemplo, a intervalos de 12-72 horas o a intervalos de 48-72 horas. Pueden administrarse inyecciones adicionales del conjugado de vitamina-mitomomicina al paciente con un intervalo de días o meses tras la(s) inyección/inyecciones inicial(es) y las inyecciones adicionales previenen la recurrencia del estado patológico provocado por las células patógenas. También puede administrarse cualquier factor terapéutico adicional, tal como un agente quimioterápico (por ejemplo, paclitaxel), tras las inyecciones iniciales para prevenir la recurrencia de la enfermedad.

Los ligandos usados en los conjugados de la presente invención incluyen aquellos que se unen a receptores expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato que se une a folato, o un análogo o derivado del mismo. Los conjugados de folato-mitomomicina pueden usarse para destruir o suprimir la actividad de macrófagos activados que provocan estados patológicos en el huésped. Tales conjugados que seleccionan como diana los macrófagos, cuando se administran a un paciente que padece un estado patológico mediado por macrófagos activados, actúan para concentrar y asociarse a la mitomomicina conjugada en la población de macrófagos activados para destruir los macrófagos activados o suprimir la función de los macrófagos. La eliminación o desactivación de la población de macrófagos activados actúa para detener o reducir la patogénesis mediada por macrófagos activados característica del estado patológico que se está tratando. Los ejemplos de enfermedades que se sabe que están mediadas por macrófagos activados incluyen artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo de trasplantes de órganos (GVHD) e inflamaciones crónicas. Normalmente se continúa la administración del conjugado hasta que se reducen o eliminan los síntomas del estado patológico, y puede administrarse el conjugado en combinación con cualquier factor terapéutico adicional, tal como un agente quimioterápico (por ejemplo, paclitaxel).

Los conjugados se administran preferiblemente por vía parenteral al animal o paciente que padece el estado patológico, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, los conjugados pueden administrarse al animal o paciente mediante otros procedimientos médicamente útiles y pueden administrarse dosis eficaces en formas farmacéuticas de liberación prolongada o convencionales. El conjugado terapéutico puede usarse solo o en combinación con otros métodos terapéuticos reconocidos para el tratamiento de estados patológicos mediados por macrófagos.

### Ejemplo 1

#### *Preparación de los compuestos 5, 7 y 9*

Se prepararon los compuestos 5, 7 y 9 (véanse los esquemas 2 y 3) tal como sigue. En primer lugar, se mezclaron los compuestos 1 y 2 (cuarenta y cinco  $\mu$ moles de cada uno) con agitación bajo argón con 1 ml de metanol anhidro. Tras agitar durante 20 horas, ambos materiales de partida habían desaparecido según se determinó mediante CCF (gel de sílice; CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1). Para preparar el compuesto 5, en un matraz aparte se añadieron 1,0 ml de agua desionizada a cuarenta y dos  $\mu$ moles de compuesto 4 y se purgó la disolución con argón. A esta disolución se le añadió NaHCO<sub>3</sub> 0,1 N hasta que se ajustó el pH a 7, y se mezcló esta disolución con la primera disolución de reacción descrita anteriormente (preparada mezclando los compuestos 1 y 2). Se completó la reacción de conjugación en 30 minutos. Se evaporó el metanol a vacío y se purificó el conjugado con HPLC preparativa (columna Prep Novapak HR C18 19 X 300 mM; fase móvil (A) - tampón fosfato 1,0 mM, pH = 6; fase orgánica (B) - acetonitrilo; condiciones -

## ES 2 324 708 T3

gradiente desde el 99% de A y el 1% de B hasta el 50% de A y el 50% de B en 30 minutos, velocidad de flujo = 15 ml/minuto). Se prepararon los compuestos 7 y 9 usando el mismo protocolo excepto porque se usaron los compuestos 6 y 8, respectivamente, en la segunda disolución en lugar del compuesto 4. Se identificaron los compuestos 5, 7 y 9 mediante RMN 1D (figura 5) y 2D (figura 6) y EM (ES).

### 5 Ejemplo 2

#### *Citotoxicidad de EC72 y mitomicina C*

10 Se evaluó un compuesto denominado EC72 (véase el esquema 1) usando un ensayo de citotoxicidad *in vitro* que predice la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento de células KB positivas para el receptor de folato. Este compuesto comprende un análogo de folato unido a mitomicina C preparado según el protocolo representado en el esquema 2. Se expusieron las células KB durante 15 minutos a 37°C a las concentraciones indicadas de EC72, mitomicina C libre (fármaco nº 1) o a EC72 y al menos un exceso de 100 veces de ácido fólico. Entonces se enjuagaron  
15 las células una vez con nuevo medio de cultivo y se incubaron en nuevo medio de cultivo durante 72 horas a 37°C. Se evaluó la viabilidad celular usando un ensayo ELISA basado en bromodesoxiuridina.

20 Cuando se comparó directamente, la citotoxicidad de EC72 fue igual a la de la mitomicina C libre (véase la figura 1). Se bloqueó la citotoxicidad de EC72 en presencia de ácido fólico libre en exceso, lo que indica que la destrucción celular observada estaba mediada por la unión de folato a su receptor. De manera importante, este resultado también sugiere que los tejidos normales que expresan de poca cantidad a ninguna del receptor de folato no deben verse afectados por el conjugado de EC72.

### 25 Ejemplo 3

#### *Supervivencia de ratones que portan tumores tratados con EC72*

30 Se evaluó *in vivo* la eficacia de EC72 para promover la supervivencia de ratones que portan tumores usando ratones Balb/c que portaban tumores M109. Había dos objetivos en este estudio: i) determinar si el tratamiento intraperitoneal diario con EC72 podía prolongar la vida de ratones que portaban tumores positivos para el receptor de folato más allá de lo que podría hacer la mitomicina C cuando se somete a prueba con un régimen de dosificación idéntico y ii) examinar los efectos patológicos del tratamiento con EC72 en los tejidos normales, incluyendo tejido renal que es un tejido positivo para el receptor de folato. Aunque la mayoría de los tejidos normales contienen niveles muy bajos del receptor de folato, los túbulos proximales del riñón expresan cifras apreciables de receptores de folato. Por tanto, la  
35 evaluación *in vivo* de EC72 también permitió la evaluación de la extensión del daño específico del riñón provocado por la administración sistémica de conjugados de folato-mitomicina.

40 Se administró a ratones Balb/c (5 ratones/grupo) una inyección intraperitoneal con  $1 \times 10^6$  células M109. Entonces se administró a los ratones una inyección intraperitoneal una vez al día con 1800 nmoles/kg de EC72 o mitomicina C (a los ratones control se les inyectó PBS) comenzando el día 5 tras la inoculación de células tumorales (ILS = *increased life span*, aumento de la duración de vida (es decir, tiempo medio de supervivencia)).

45 Tal como se muestra en la figura 2, todos los ratones control murieron en el día 22 tras la inoculación del tumor. Aunque se observó un aumento en la duración de vida (ILS) del 39% para los animales tratados con mitomicina C no modificada, los animales tratados con EC72 tuvieron un promedio de un aumento en la duración de vida del 178%.

50 Se repitió el mismo experimento (excepto porque se administraron 30 inyecciones diarias con EC72 o mitomicina C) para confirmar la actividad antitumoral mediada por EC72 observada, y para confirmar si el efecto de EC72 estaba mediado por la unión de folato a su receptor. Por tanto, se administraron a un grupo de animales inyecciones intraperitoneales de EC72 más un exceso de 10 veces de ácido fólico libre. Tal como se muestra en la figura 3, el grupo de animales tratados con EC72 mostró el mayor aumento en la duración de vida (es decir, tiempo medio de supervivencia; un 185% con respecto a los del grupo control con PBS), mientras que los animales en el grupo con mitomicina C sólo mostraron un aumento aproximado del 25%. Además, 1 de los 4 animales tratados con EC72 apareció libre de tumor en el día 70 tras la inoculación de células tumorales. El efecto antitumoral del conjugado de EC72 se redujo  
55 significativamente (un aumento del 112% en el tiempo medio de supervivencia) mediante la inyección conjunta de un exceso moderado de ácido fólico, y todos los ratones en este grupo murieron finalmente debido a la carga tumoral.

60 También se extrajeron los órganos principales en los animales tratados tanto con EC72 como con mitomicina C (tras su sacrificio), y se enviaron a un patólogo independiente para su examen. Tal como se describe en la tabla 2 a continuación, los animales tratados con mitomicina C padecieron una extensa mielosupresión, que es un efecto secundario característico del tratamiento con mitomicina C. De hecho, todos los animales en este grupo murieron debido a evidentes efectos secundarios relacionados con la mitomicina C. Sorprendentemente, los animales tratados con EC72 no presentaron evidencia de mielosupresión ni daño renal (es decir, el bazo, la médula ósea del fémur y los riñones le parecieron todos normales al patólogo experto). De manera interesante, el examen de la sangre extraída de  
65 los ratones tratados con EC72 indicó niveles de creatina y concentración sérica de urea normales tras 30 inyecciones diarias consecutivas con EC72. Por tanto, los conjugados de folato-mitomicina C parecen ser agentes quimioterápicos eficaces que no provocan una lesión no deseada de los tejidos normales, incluyendo los riñones, positivos para el receptor de folato.

# ES 2 324 708 T3

TABLA 2

Artículo de prueba	Dosis	Programa / vía	Duración	Hallazgos patológicos
Fármaco nº1	1800 nmol/kg	q1d, i.p.	21 días	Se consumieron por completo las células de la médula del hueso (fémur) Bazo anómalo: pérdida de todo el tejido de médula derivado del bazo El hígado, riñón, corazón, cerebro, pulmón, músculo e intestino parecieron normales visualmente Sin evidencia de neoplasia en órganos principales
EC72	1800 nmol/kg	q1d, i.p.	44 días	La médula del hueso (fémur) era normal El bazo pareció normal El riñón pareció normal Se encontró neoplasia ocasional en hígado, pulmón e intestino; sin evidencia de hemorragia o degeneración Los animales murieron debido a la carga tumoral

## Ejemplo 4

### *Supervivencia de ratones que portan tumores a los que se les inyectó EC72 por vía intravenosa*

Se evaluó la actividad antitumoral de EC72 cuando se administró por vía intravenosa (i.v.) a animales que portaban tumores, en ratones Balb/c que portaban tumores M109 subcutáneos. Por tanto, se siguió un protocolo similar al descrito en el ejemplo 3 excepto porque los compuestos se administraron por vía i.v. (descrito a continuación) y los tumores eran subcutáneos. Cuatro días tras la inoculación del tumor bajo el cutis de la axila derecha, se inyectó a los ratones por vía i.v. qd x 5 durante seis semanas 1800 nmoles/kg de EC72. Se determinó el crecimiento tumoral a intervalos de 2 días en cada grupo de tratamiento hasta que los tumores crecieron hasta al menos 1500 mm<sup>3</sup>. Las venas de la cola se magullaron excesivamente y se volvieron inaccesibles tras 12 inyecciones i.v. de modo que se continuó la dosificación por vía i.p. siguiendo el mismo programa qd x 5. Tal como se muestra en la figura 4, el tratamiento con EC72 fue eficaz en el retardo del crecimiento del tumor M109. De manera interesante, sí que comenzó a aumentar la tasa de crecimiento de los tumores justo tras hacerse el cambio a la dosificación i.p. Por tanto, EC72 puede no haber alcanzado el tumor subcutáneo distal de manera eficaz tras la administración i.p. de EC72, una limitación que no se encuentra cuando se administra EC72 por vía i.v. durante la fase inicial del tratamiento.

## Ejemplo 5

### *Supervivencia de ratones que portan tumores sólidos tratados con EC72*

Se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 4 excepto porque se inyectó a los ratones por vía i.v. a lo largo de todo el periodo de tratamiento y se trataron con EC72 durante 4 semanas. Se inyectó a ratones Balb/c (n = 5) por vía subcutánea debajo del cutis de la axila derecha 1 x 10<sup>6</sup> células M109 y se trataron qd x 5 durante 4 semanas con 1800 nmol/kg de EC72. Se administró EC72 por vía i.v. comenzando el día designado tras la inoculación de células tumorales (PTI, *post tumor inoculation* (tras la inoculación del tumor); véase la tabla 3). Se monitorizó diariamente la

## ES 2 324 708 T3

supervivencia de los animales, y los ratones que mostraron una respuesta completa eran aquellos que estaban libres de tumor en el día 60 PTI.

En el modelo de tumor subcutáneo, la supervivencia disminuyó con la duración en el retardo de la administración de EC72. Por tanto, tal como se resume en la tabla 3, el rendimiento era máximo si se comenzaba el tratamiento con EC72 en el 1 día PTI, en el que resultaron 2 de 5 respuestas completas y 3 de 5 animales tuvieron un aumento en la duración de vida del 133% (ILS; es decir, respuesta parcial). Por el contrario, el retardo del tratamiento con EC72 hasta 12 días PTI sólo dio como resultado un ILS del 8% con 0 de 5 respuestas completas. Además, disminuyeron el tiempo medio de supervivencia (días) y el % de ILS con el aumento del retardo en el inicio del tratamiento con EC72.

<b>Tabla 3</b>					
<b>Animales/ cohorte</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=8</b>
<b>Inicio del tratamiento</b>	<b>PTI 1</b>	<b>PTI 3</b>	<b>PTI 7</b>	<b>PTI 12</b>	<b>Controles sin tratar</b>
<b>Supervivencia media (días)</b>	<b>56</b>	<b>54</b>	<b>28</b>	<b>26</b>	<b>24</b>
<b>% de ILS</b>	<b>133</b>	<b>125</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>n/d</b>
<b>Respuestas parciales</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>n/d</b>
<b>Respuestas completas</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

### Ejemplo 6

#### *Supervivencia de ratones que portan tumores sólidos tratados con EC72 y TAXOL®*

Se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 5 excepto porque se inyectó a los animales por vía i.v. al comienzo del periodo de tratamiento y se les inyectó por vía i.p. después en el periodo de tratamiento. Para investigar si EC72 y TAXOL® en combinación podrían aumentar de manera eficaz la supervivencia de ratones que portan tumores sólidos, se formaron tumores M109 subcutáneos en ratones Balb/c (n = 5 para cada grupo de tratamiento) durante 12 días (es decir, un tiempo PTI cuando el inicio del tratamiento con EC72 solo fue ineficaz (véase la tabla 3)). Entonces se trataron los ratones con TAXOL® (es decir, paclitaxel) con o sin EC72, y se midieron tanto los volúmenes del tumor primario como la supervivencia de los animales.

Doce días PTI, se trataron los ratones con TAXOL® (20 mg/kg, por vía i.v. en los días 12, 15, 19, 22 y 26 PTI) con o sin EC72 (1800 nmol/kg qd x 5 durante 4 semanas; por vía i.v. en los días 12, 15, 19, 22 y 26 PTI y por vía i.p. todos los días restantes). Se calcularon los volúmenes tumorales usando la ecuación  $V = a \times b^2/2$ , en la que "a" es la longitud del tumor y "b" es la anchura expresadas en milímetros. Se midieron los tumores usando calibres.

Tal como se muestra en la figura 7, los tumores en los animales control sin tratar crecieron rápidamente, y en el día 50 PTI, alcanzaron un tamaño con el que se requirió su sacrificio. Los tumores en los animales tratados con TAXOL® no crecieron hasta el día 29 PTI, tras el cual se reanudó su crecimiento. Aunque el tratamiento con 20 mg/kg de TAXOL® solo dio como resultado 1,3 log de destrucción celular (LCK, *log cell kill*), los animales tratados con TAXOL® solo parecieron enfermos, experimentaron una pérdida de peso y ninguno de los 5 ratones en la cohorte fueron supervivientes a largo plazo. Por el contrario, los tumores en los ratones tratados con TAXOL® y EC72 en combinación disminuyeron de tamaño durante el periodo de dosificación, y este régimen dio como resultado 1,8 de LCK en 3 de los 5 ratones en esta cohorte, y 2 de los 5 ratones estuvieron libres de tumor a los 90 días PTI. Además, todos los ratones tratados con TAXOL® en combinación con EC72 mantuvieron su peso y parecieron sanos durante todo el periodo de dosificación. Estos resultados muestran que EC72 y TAXOL® actúan de manera sinérgica para prevenir el crecimiento tumoral porque EC72 solo no produce una respuesta antitumoral en este modelo de tumor subcutáneo cuando se inició el tratamiento con EC72 tratamiento 12 días PTI (véase la tabla 3), y la respuesta con EC72 y TAXOL® en combinación era mucho mayor que con TAXOL® solo.

### Ejemplo 7

#### *Supervivencia de ratones que portan tumores sólidos tratados con EC72 y TAXOL®*

Se siguió el procedimiento descrito en el ejemplo 6 excepto porque se dosificó TAXOL® a 15 mg/kg y se sometieron a prueba 6 ratones/cohorte. Tal como se muestra en la figura 8, los tumores en los animales control sin tratar crecieron a una tasa exponencial, y en el día 50 PTI, alcanzaron un tamaño con el que se requirió su sacrificio. Por el contrario, los tumores en ratones tratados con TAXOL® no crecieron hasta el día 21 PTI, tras lo cual se reanudó

## ES 2 324 708 T3

su crecimiento exponencial normal aparente. El tratamiento con TAXOL® dio como resultado 0,6 de LCK con un aumento del 135% en el tiempo medio de supervivencia en 4 de los 6 animales tratados, y 2 de los 6 ratones tuvieron una respuesta completa (véase la tabla 4 en la que RC = respuesta completa, RP = respuesta parcial y NR = no hay respuesta). Como en el ejemplo 6, se obtuvieron resultados sorprendentemente mejores con los animales tratados con TAXOL® que también se trataron con EC72. Por tanto, la combinación de TAXOL® y EC72 produjo 1,5 de LCK con un aumento del 185% en el tiempo medio de supervivencia en 2 de los 6 ratones, y, de manera importante, 4 de los 6 ratones tuvieron una respuesta completa (véase la figura 8 y la tabla 4). Tomados en conjunto, estos resultados y los resultados mostrados en la figura 7 demuestran que TAXOL® y EC72 actúan de manera sinérgica para inhibir el crecimiento tumoral.

TABLA 4

Dosis de taxol (mg/kg)	Dosis de EC72 (nmol/kg)	Log de destrucción celular (LCK)	Tiempo medio de supervivencia (% de T/C)	RC	RP	NR
15	0	0,6	135	2	4	0
15	1800	1,5	187	4	2	0

También se monitorizó la toxicidad de cada régimen sometido a prueba, midiendo la pérdida de peso, análisis bioquímico de sangre y patología tisular. Los animales tratados con TAXOL® en combinación con EC72 parecieron sanos y no perdieron peso a lo largo de todo el periodo de dosificación. Además, los resultados de patología tisular de los ratones tratados con TAXOL® y EC72 confirmaron que no había una degeneración de los órganos principales en estos animales (tabla 5).

TABLA 5

	TAXOL® 15 mg/kg, n=6 ratones		TAXOL® 15 mg/kg + EC72 n=6 ratones	
	Normal	Degeneración	Normal	Degeneración
<b>Corazón</b>	6		5	
<b>Hígado</b>	5	1(1)	4	2(1)
<b>Bazo</b>	6		6	
<b>Riñón</b>	6		5	1(2)
<b>Hueso</b>	6		6	
"0,5"= presente ocasionalmente, "1"= leve, "2"= moderada, "3"= notable				

### Ejemplo 8

#### *Ensayo de afinidad relativa*

Se determinó la afinidad de EC72 por los receptores de folato (RF) con respecto a folato según un método descrito previamente (Westerhof, G. R., J. H. Schomagel, *et al.* (1995) *Mol. Pharm.* 48: 459-471) con una ligera modificación. En resumen, se tripsinizaron suavemente células positivas para RF en tripsina al 0,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego se diluyeron con RPMI libre de folato (FFRPMI, *folate-free RPMI*) que contenía un 10% de suero de ternero fetal inactivado por calor (HIFCS, *heat-inactivated fetal calf serum*). Tras una centrifugación de 5 min. a 800 x g y un lavado con PBS, se suspendió el sedimento celular final en FFRPMI 1640 (sin suero). Se incubaron las células durante 15 min. en hielo con <sup>3</sup>H-ácido fólico 100 nM en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de EC72 o folato. Se centrifugaron las muestras a 10.000 x g durante 5 min., y luego se suspendieron los sedimentos celulares en tampón, se transfirieron a viales individuales que contenían 5 ml de cóctel de centelleo y luego se contaron para determinar la radiactividad. Los tubos de control negativo contenían sólo el <sup>3</sup>H-ácido fólico en FFRPMI (sin competidor). Los tubos de control positivo contenían una concentración final de ácido fólico 1 mM, y se restaron las CPM en estas muestras (que representan la unión no específica del marcador) de todas las muestras. En particular, se definieron las afinidades relativas como la inversa de la razón molar de compuesto requerido para desplazar el 50% del <sup>3</sup>H-ácido fólico unido al RF en células KB, y la afinidad relativa del ácido fólico

## ES 2 324 708 T3

por RF se fijó en 1. Tal como se muestra en la figura 9, EC72 tiene una afinidad relativa de 0,59, lo que indica que este conjugado puede competir de manera eficaz con el ácido fólico (el ligando nativo) por la unión al receptor de folato.

### Ejemplo 9

5

#### *Respuesta a la dosis in vitro*

Se sembraron células KB en placas Falcon de 12 pocillos y se dejó que se formaran monocapas casi confluentes durante la noche. Tras un enjuagado con 1 ml de FFRPMI/HIFCS nuevo, cada pocillo recibió 0,5 ml de FFRPMI/HIFCS que contenía concentraciones crecientes de EC72 en presencia o ausencia de ácido fólico 0,1 mM (competidor). Se incubaron las células durante 15 min. a 37°C y luego se enjuagaron cuatro veces con 0,5 ml de FFRPMI/HIFCS. Entonces se añadieron 0,5 ml de FFRPMI/HIFCS nuevo a cada pocillo y se capturaron las células durante un total de 72 h a 37°C. Dos horas antes del final de la incubación, se sustituyeron los medios en cada pocillo por 0,5 ml de FFRPMI/HIFCS que contenía 5  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina. Entonces se lavaron las monocapas 3 veces con 0,5 ml de PBS y luego se precipitaron con 1 ml de ácido tricloroacético frío al 10%. Se recogió la disolución de ácido tricloroacético y se desechó, y se disolvió secuencialmente el material precipitado en 0,5 ml de NaOH 0,25 N y dodecilsulfato de sodio al 1% durante 15 min. a temperatura ambiente. Entonces se contaron las muestras para determinar la radiactividad usando un contador gamma Packard. Se expresaron los valores tabulados finales como un porcentaje de radiactividad incorporada en las muestras de células sin tratar. Tal como se muestra en la figura 10, EC72 presenta alta actividad sensible a la dosis frente a células KB positivas para RF ( $CI_{50} \sim 5$  nM), y la actividad es específica puesto que un exceso de ácido fólico libre bloqueó de manera eficaz cualquier inhibición de la síntesis de ADN.

### Ejemplo 10

#### 25 *Respuesta a la dosis in vivo*

Se obtuvieron ratones de seis a siete semanas de edad (raza Balb/C hembras) de Harlan, Inc., Indianápolis, IN. Se mantuvieron los ratones con comida libre de folato de Harlan durante un total de tres semanas antes del inicio de y durante este experimento. Se inocularon células tumorales M109 P<sub>0</sub> positivas para el receptor de folato (0,5 x 10<sup>6</sup> células por animal) en la parte superior de la cavidad peritoneal 4 días antes del inicio de la dosificación. Se dosificaron las formulaciones indicadas en la figura 11 por vía intraperitoneal qd x 30 empezando en el día 4 tras la inoculación del tumor, y se monitorizó diariamente la supervivencia de los animales. EC72 presentó una actividad dependiente de la dosis en ratones que portaban el tumor M109. Al nivel de dosis de 1800 nmol/kg de EC72 (saturable para receptores de folato *in vivo*), se observó un aumento de la duración de vida del 240%, mostrando 1 de 4 animales una respuesta completa.

### Ejemplo 11

#### 40 *Actividad in vivo sobre el tumor negativo para el receptor de folato*

Se obtuvieron ratones de seis a siete semanas de edad (raza Balb/C hembras) de Harlan, Inc., Indianápolis, IN. Se mantuvieron los ratones con comida libre de folato de Harlan durante un total de tres semanas antes del inicio de y durante este experimento. Se inocularon células tumorales 4T-1 negativas para el receptor de folato (1 x 10<sup>6</sup> células por animal) debajo del cutis de la axila derecha. Se dosificaron las formulaciones indicadas en la figura 12 por vía intraperitoneal qd x 30 empezando en el día 4 tras la inoculación del tumor, y se monitorizaron diariamente el volumen tumoral así como la supervivencia de los animales. EC72 no tuvo actividad frente a un tumor 4T-1 subcutáneo negativo para el receptor de folato.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de fórmula general

5

B-L-X

10 en la que el grupo B es un folato, o un análogo o un derivado del mismo, que se une a un receptor de folato accesible en la superficie que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por una población de células patógenas;

en la que el grupo L comprende un grupo de unión escindible y siendo el grupo de unión escindible un grupo disulfuro; y

15

en la que el grupo X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado del grupo que consiste en mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina.

2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el grupo de unión se escinde en condiciones reductoras.

20

3. Conjugado de fórmula general

B-L-X

25

en la que el grupo B es un folato, o un análogo o un derivado del mismo, que se une a un receptor de folato accesible en la superficie que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por la población de células patógenas;

30

en la que el grupo L comprende un grupo de unión escindible y siendo el grupo de unión escindible un grupo disulfuro; y

35

en la que el grupo X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado del grupo que consiste en mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina para su uso en un método de eliminación selectiva de una población de células patógenas en un animal huésped que alberga dicha población de células en la que los miembros de dicha población celular tienen un sitio de unión accesible en la superficie para folato.

4. Conjugado según la reivindicación 3, en el que el grupo de unión se escinde en condiciones reductoras.

40

5. Conjugado según la reivindicación 3, en el que la población de células patógenas es una población de células cancerosas.

45

6. Conjugado según la reivindicación 3, que comprende además en combinación con o como adyuvante del conjugado un factor terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente de destrucción celular, un potenciador de la penetración tumoral, un agente quimioterápico, una célula inmunitaria citotóxica y un compuesto que puede estimular una respuesta inmunitaria endógena.

7. Conjugado según la reivindicación 6, en el que el factor terapéutico es un agente quimioterápico.

50

8. Conjugado según la reivindicación 7, en el que el agente quimioterápico es paclitaxel.

9. Composición farmacéutica que comprende un conjugado de fórmula general

55

B-L-X

60 en la que el grupo B es un folato, o un análogo o un derivado del mismo, que se une a un receptor de folato accesible en la superficie que se expresa de manera única, se sobreexpresa o se expresa preferentemente por una población de células patógenas;

en la que el grupo L comprende un grupo de unión escindible y siendo el grupo de unión escindible un grupo disulfuro; y

65

en la que el grupo X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado del grupo que consiste en mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

## ES 2 324 708 T3

10. Composición según la reivindicación 9, en la que el grupo de unión se escinde en condiciones reductoras.

11. Composición según la reivindicación 9, que comprende además un factor terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente de destrucción celular, un potenciador de la penetración tumoral, un agente quimioterápico y un compuesto que puede estimular una respuesta inmunitaria endógena.

12. Composición según la reivindicación 11, en la que el factor terapéutico es un agente quimioterápico.

13. Composición según la reivindicación 12, en la que el agente quimioterápico es paclitaxel.

14. Método de preparación de un conjugado biológicamente activo de fórmula



en la que

B es un folato o un derivado o análogo de unión al receptor de folato del mismo;

X comprende un compuesto de mitomicina seleccionado del grupo que consiste en mitomicina A, mitomicina B, mitomicina C, mitomicina D, mitomicina E, mitomicina F, mitomicina J y porfiromicina;

y L es un grupo de unión divalente que comprende un enlace disulfuro, comprendiendo dicho método las etapas de formar un producto intermedio de tiosulfonato de fórmula  $\text{B-(L'')}_n\text{SSO}_2\text{R}$  o un producto intermedio de fórmula  $\text{X-(L')}_n\text{SSO}_2\text{R}$

y hacer reaccionar dicho producto intermedio de tiosulfonato con un compuesto de fórmula  $\text{X-(L')}_n\text{-SH}$  o  $\text{B-(L'')}_n\text{-SH}$ , respectivamente, en las que L' y L'' son, independientemente, grupos de unión divalentes a través de los cuales se une covalentemente el grupo tiol SH a B y X, respectivamente;

n y n' son 1 ó 0; y

R es alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo o arilo o heteroarilo sustituido.

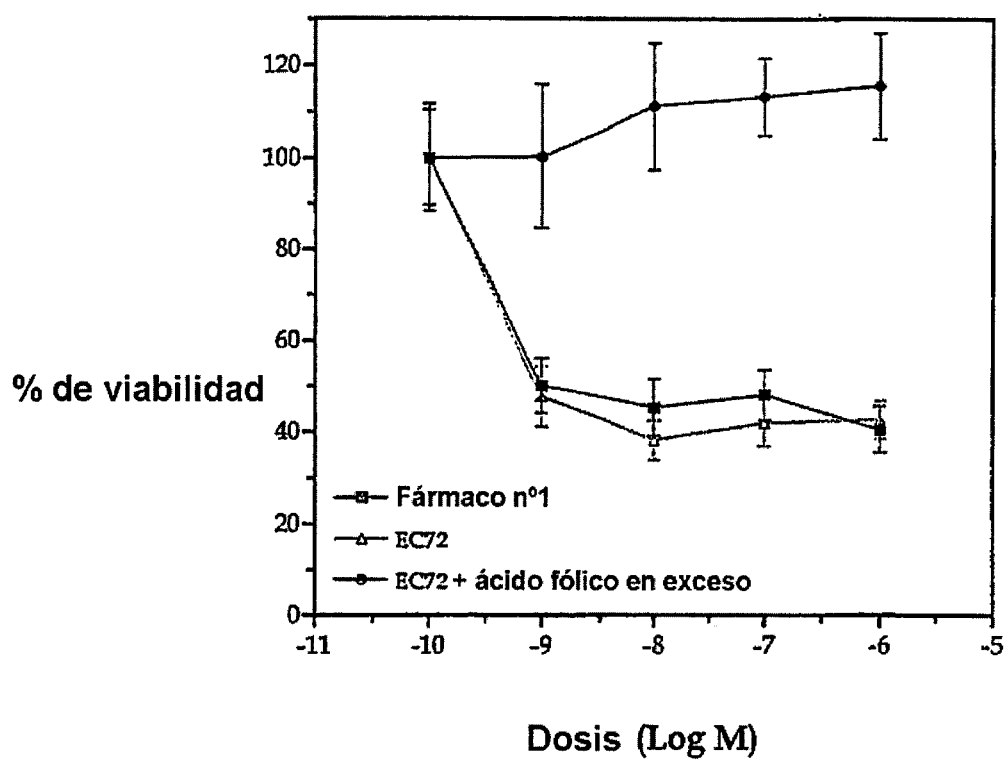


Fig. 1

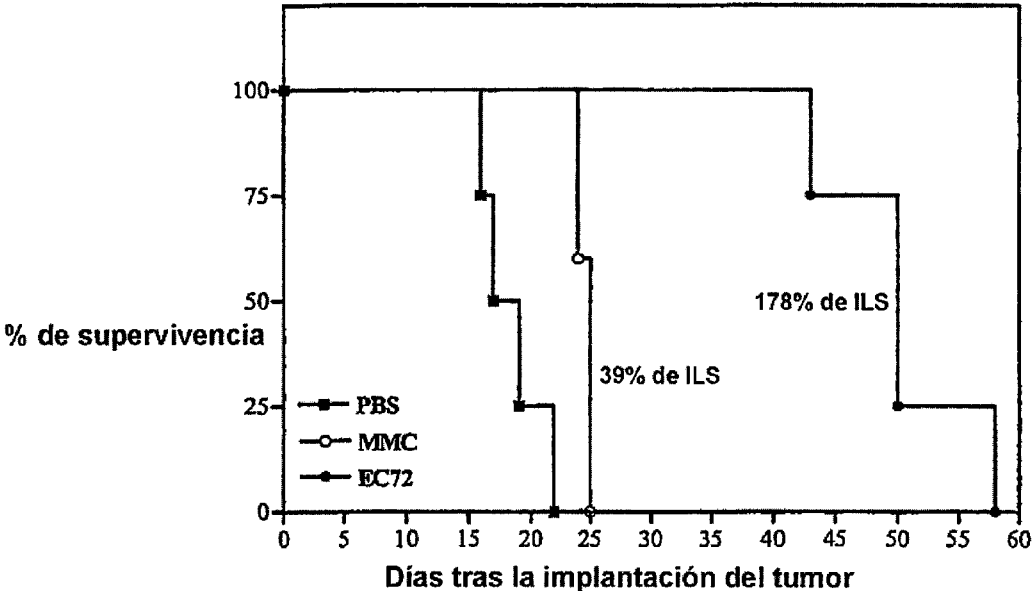


Fig. 2

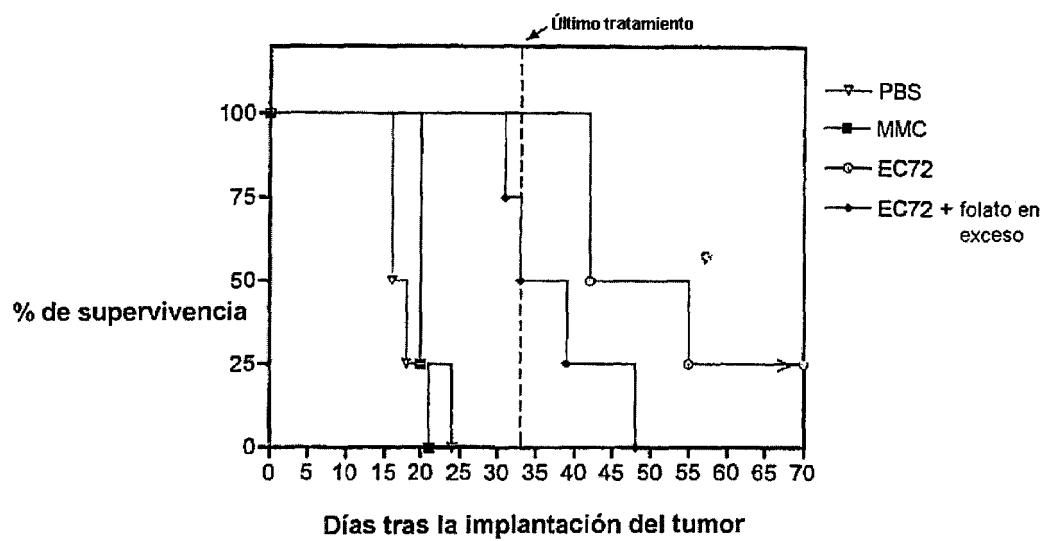


Fig. 3

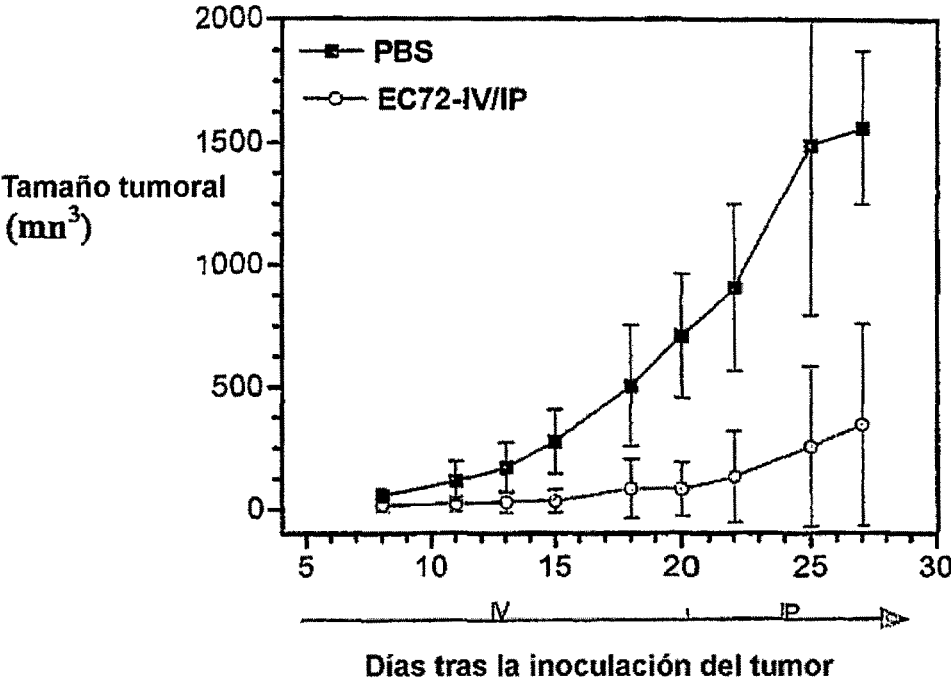


Fig. 4

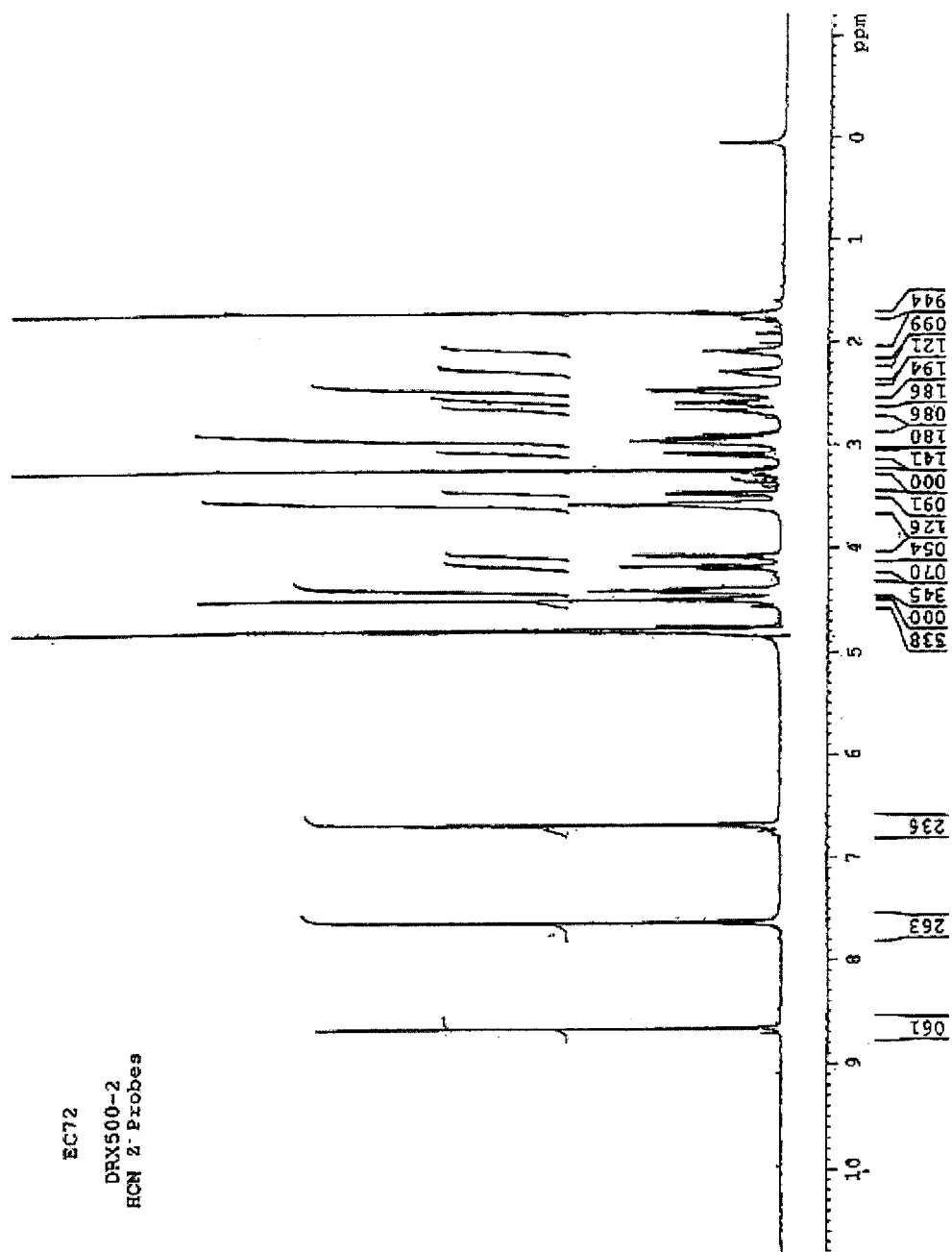


Fig. 5

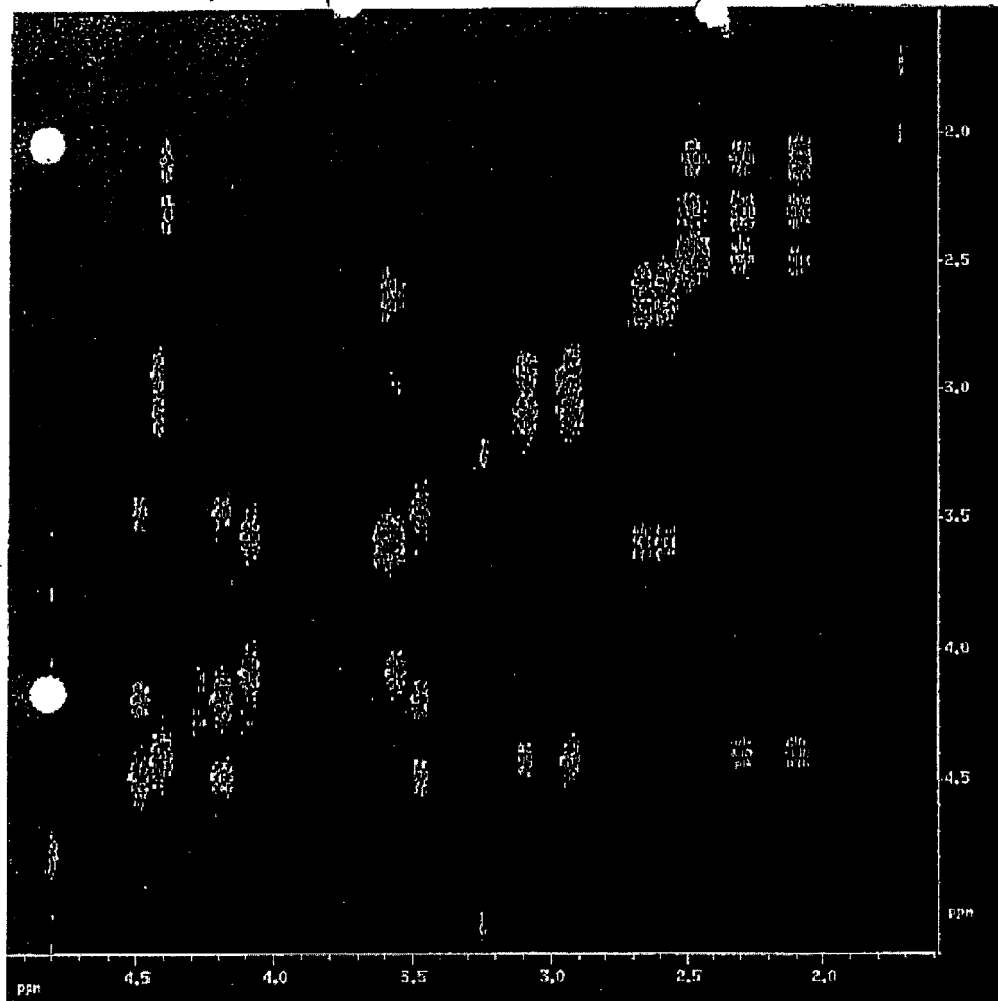


FIG. 6

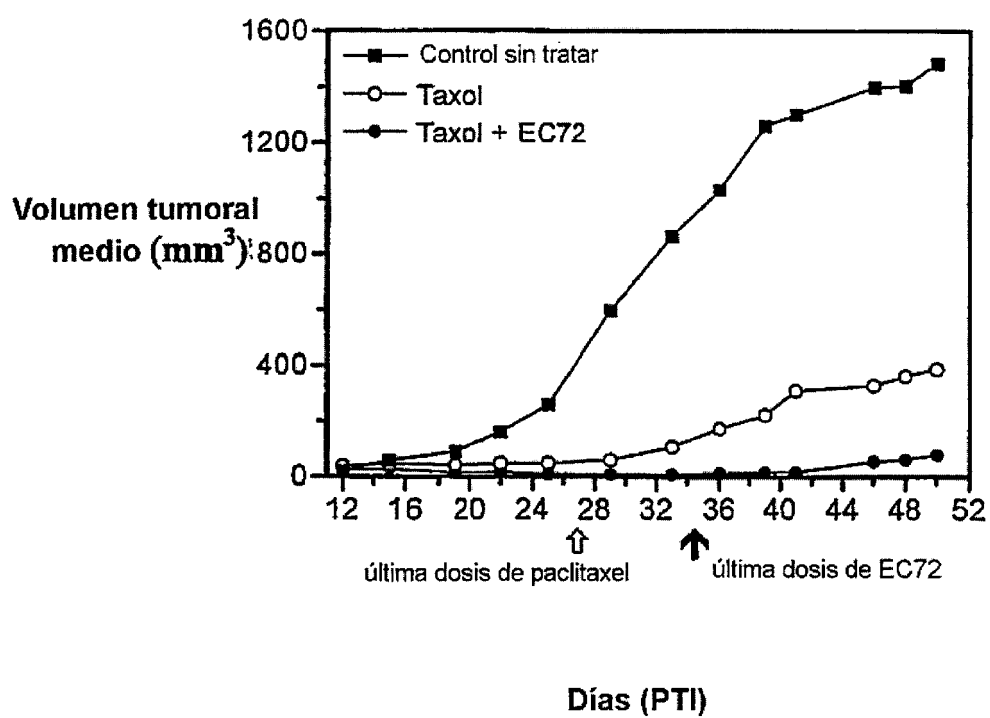


Fig. 7

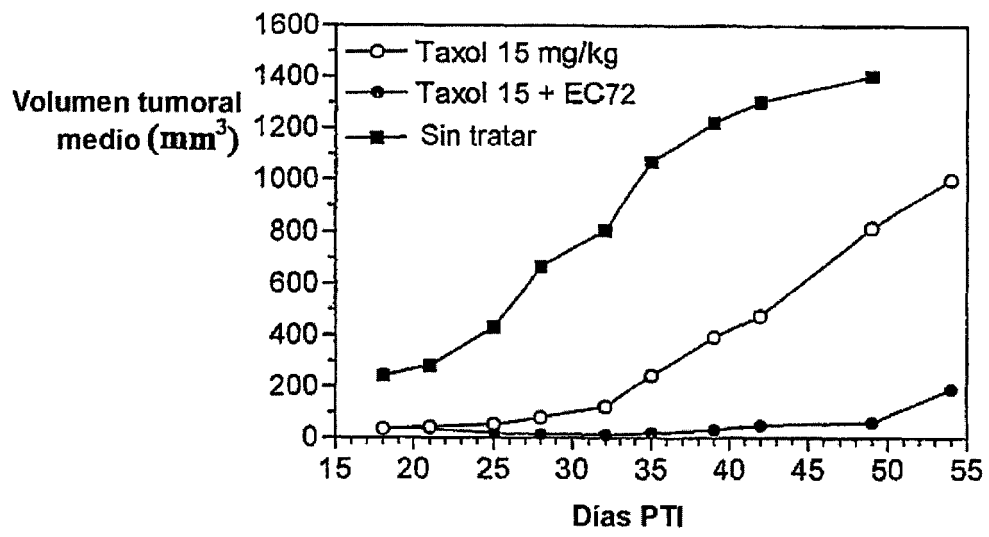


Fig. 8

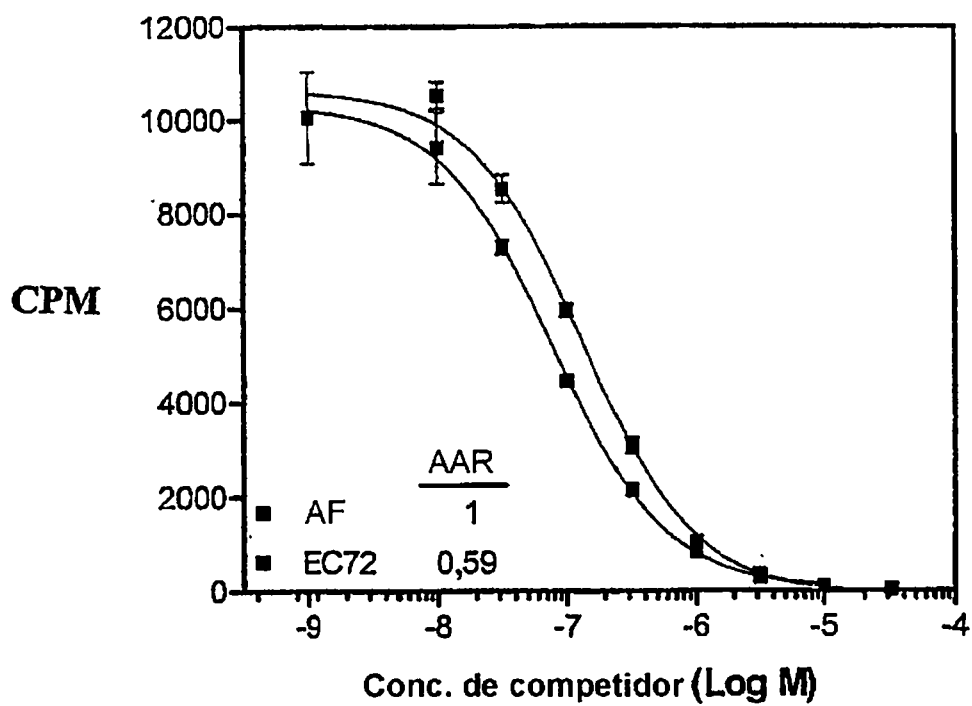


FIG. 9

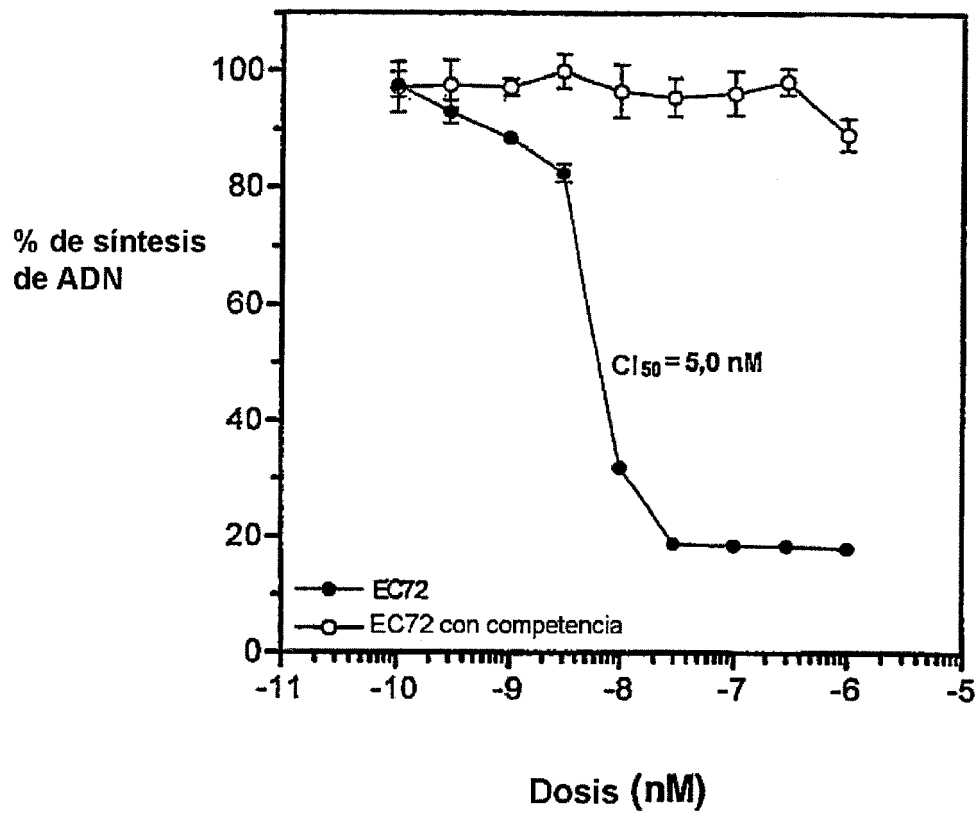


FIG. 10

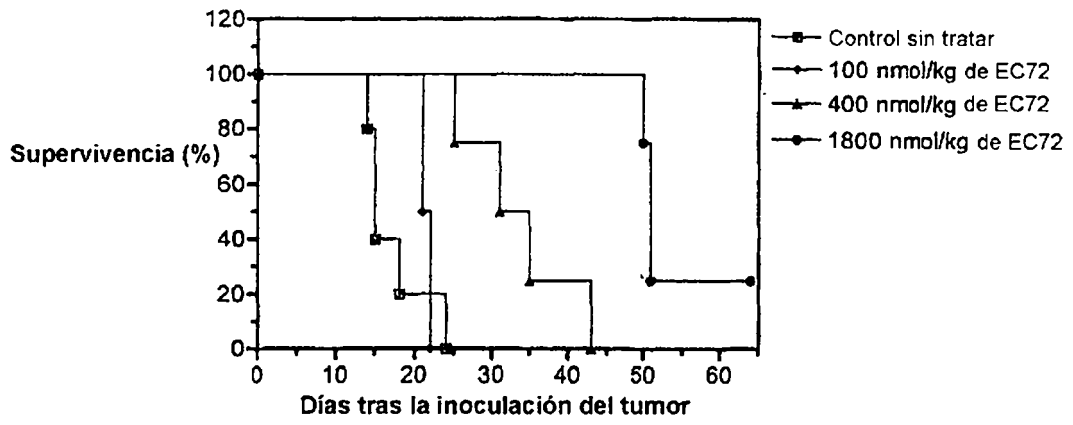


FIG. 11

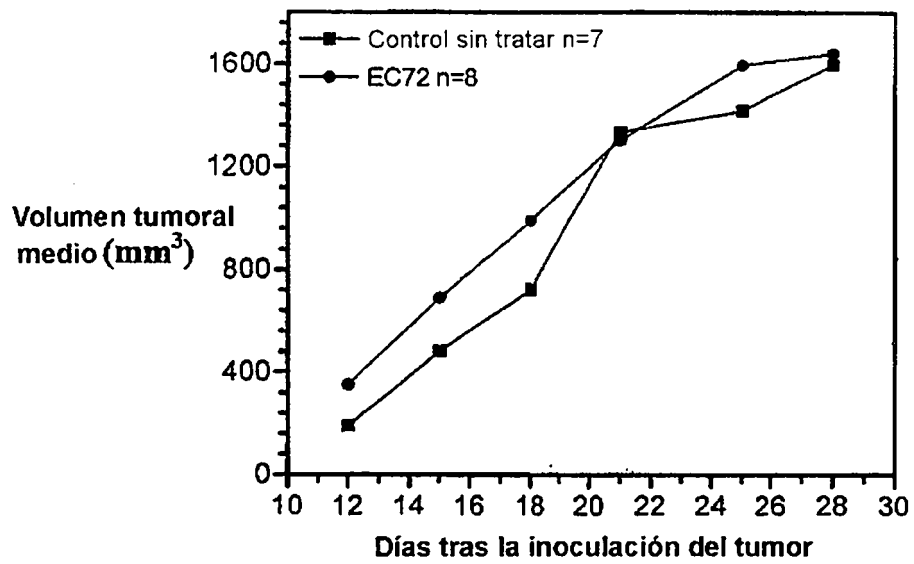


FIG. 12