

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 006**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2017 PCT/EP2017/054911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17149077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2017 E 17707350 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2022 EP 3423104**

54 Título: **Conjugados de amanitina**

30 Prioridad:

03.03.2016 EP 16000511

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

13.10.2022

73 Titular/es:

**HEIDELBERG PHARMA RESEARCH GMBH
(100.0%)
Gregor-Mendel-Straße 22
68526 Ladenburg, DE**

72 Inventor/es:

**LUTZ, CHRISTIAN;
ANDERL, JAN;
MÜLLER, CHRISTOPH;
SIMON, WERNER;
WERNER-SIMON, SUSANNE;
HECHLER, TORSTEN y
KULKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 925 006 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 amanitina

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un conjugado que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; (b) un resto de unión a diana; y (c) opcionalmente, un engarce que une dicha amatoxina y dicho resto de unión a diana. La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado.

Antecedentes de la invención

Las amatoxinas son péptidos cíclicos que comprenden 8 aminoácidos que se encuentran en las setas *Amanita phalloides* (véase la **Fig. 1**). Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamíferos y, por tanto, también la transcripción y la biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre la amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte ($K_D = 3$ nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un procedimiento muy lento, lo que hace improbable la recuperación de una célula afectada. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado tiempo, la célula sufrirá muerte celular programada (apoptosis).

El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para la terapia tumoral ya se había explorado en 1981 mediante el acoplamiento de un anticuerpo anti-Thy 1.2 a la α -amanitina usando un engarce unido al anillo indol del Trp (aminoácido 4; véase la **Fig. 1**) a través de diazotación (Davis y Preston, *Science* 213 (1981) 1385-1388). Davis y Preston identificaron el sitio de fijación como la posición 7'. Morris y Venton demostraron también que la sustitución en la posición 7' da como resultado un derivado que mantiene la actividad citotóxica (Morris y Venton, *Int. J. Peptide Protein Res.* 21 (1983) 419-430).

La solicitud de patente EP 1 859 811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describió conjugados en los que el átomo de C y del aminoácido de amatoxina 1 de la β -amanitina estaba directamente acoplado, es decir, sin una estructura engarzadora, a la albúmina o al anticuerpo monoclonal HEA125, OKT3 o PA-1. Además, se demostró el efecto inhibitorio de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7), células de linfoma de Burkitt (Raji) y células de linfoma T (Jurkat). Se sugirió el uso de engarces, incluyendo engarces que comprenden elementos tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo y similares, pero realmente no se mostraron dichas construcciones y no se proporcionaron más detalles, tales como sitios de fijación en las amatoxinas.

Las solicitudes de patente WO 2010/115629 y WO 2010/115630 (ambas publicadas el 14 de octubre de 2010) describen conjugados en los que anticuerpos, tales como los anticuerpos anti-EpCAM tales como el anticuerpo humanizado huHEA125, se acoplan a amatoxinas a través de (i) el átomo de C y del aminoácido 1 de amatoxina, (ii) el átomo de C 6' del aminoácido 4 de amatoxina o (iii) a través del átomo de C δ del aminoácido 3 de amatoxina, en cada caso directamente o a través de un engarce entre el anticuerpo y las amatoxinas. Los engarces sugeridos comprenden elementos tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo y similares. Además, se demostraron los efectos inhibidores de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (estirpe celular MCF-7), carcinoma pancreático (estirpe celular Capan-1), cáncer de colon (estirpe celular Colo205) y colangiocarcinoma (estirpe celular OZ).

La solicitud de patente WO 2012/119787 describe que los restos de unión a diana pueden fijarse a las amatoxinas a través de engarces en sitios de fijación adicionales en el aminoácido triptófano 4, es concreto, las posiciones 1'-N, sin interferencia con la interacción de dichas amatoxinas con su diana, la ARN polimerasa II dependiente de ADN de células de mamíferos.

Se sabe que las amatoxinas son relativamente atóxicas cuando se acoplan a portadores biomoleculares grandes, tales como moléculas de anticuerpos, y que ejercen su actividad citotóxica solo después de que el portador biomolecular se escinde. A la luz de la toxicidad de las amatoxinas, en particular para las células hepáticas, es de suma importancia que los conjugados de amatoxina para la terapia tumoral dirigida permanezcan altamente estables después de su administración en el plasma y que la liberación de la amatoxina se produzca después de la interiorización en las células diana. En este contexto, mejoras pequeñas de la estabilidad del conjugado pueden tener consecuencias drásticas para el margen terapéutico y la seguridad de los conjugados de amatoxina para enfoques terapéuticos.

La solicitud de patente WO 2012/041504 describe conjugados de una amatoxina con una molécula de unión que usan un resto de urea como engarce a la molécula de unión. Se pudo demostrar que dicho enlace es significativamente más estable que un enlace éster.

Por tanto, ya se han logrado avances significativos en el desarrollo de conjugados a base de amatoxina para usos terapéuticos. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto que las construcciones a base de α y β -amatoxina no eran completamente estables en condiciones de estrés en plasma y daban como resultado un grado sustancial de productos entrecruzados (véanse las Figuras 2 a 4). Sin embargo, la estabilidad de los conjugados que comprenden una amatoxina altamente tóxica es de suma importancia para el uso previsto como molécula terapéutica para la administración a seres humanos.

Objeto de la invención

Por tanto, todavía existía una gran necesidad de variantes de amatoxina con una estabilidad mejorada. La solución a este problema, es decir, la identificación de ciertas modificaciones de la cadena principal de ocho restos de aminoácidos que forman la estructura básica de la amatoxina, no se proporcionó ni se sugirió en la técnica anterior.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la observación inesperada de que una forma variante de las amatoxinas con (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi, muestra una estabilidad aumentada en condiciones de estrés y un índice terapéutico mejorado.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; (b) un resto de unión a diana; y (c) un engarce como se define en las reivindicaciones que une dicha amatoxina y dicho resto de unión a diana.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una construcción que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; y (b) un resto engarce, en particular un engarce como se define en las reivindicaciones que porta un grupo reactivo para unir dicha amatoxina a un resto de unión a diana.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los números en negrita (de 1 a 8) designan la numeración convencional de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. También se muestran las designaciones convencionales de los átomos en los aminoácidos 1, 3 y 4 (letras griegas α a γ , letras griegas α a δ y números de 1' a 7', respectivamente).

La **Fig. 2** muestra los resultados de un experimento de ensayo de estrés en una transferencia Western de anti-amanitina. Un conjugado de trastuzumab-amanitina (Her-30.0643, conjugación de lisina a través de 6'-OH, engarce estable) se incubó durante 5 días a 37 °C en PBS, pH 7,4, lo que condujo a un entrecruzamiento intercatenario e intracatenario extenso; el entrecruzamiento de cadenas de anticuerpos podría prevenirse mediante la adición de cisteína libre.

La **Fig. 3** muestra que la α -amanitina muestra una fuerte reactividad con la cisteína en tampón PBS, pH 7,4. α -amanitina a 1 mg/ml, cisteína a 10 mg/ml en PBS, pH 7,4 a 37 °C después de 24 h, 48 h y 6 d HPLC-FI C18.

La **Fig. 4** muestra que la β -amanitina muestra una fuerte reactividad con la cisteína en tampón PBS, pH 7,4. β -amanitina a 1 mg/ml, cisteína a 10 mg/ml en PBS, pH 7,4 a 37 °C después de 24 h, 48 h y 6 d HPLC-FI C18.

La **Fig. 5** muestra que una variante 6'-desoxi en el aminoácido 4 ("amanina") muestra una reactividad reducida con la cisteína. Amanina a 1 mg/ml, cisteína a 10 mg/ml en PBS, pH 7,4 a 37 °C después de 24 h, 48 h y 6 d HPLC-FI C18.

La **Fig. 6** y la **Fig. 7** muestran que una variante desoxi doble **HDP 30.2105** (6'-desoxi en el aminoácido 4 y S-desoxi en el aminoácido 8; fórmula **I** con $R^3 = -OR^5$ y cada $R^5 = H$) muestra una ausencia completa de reactividad con la cisteína. **HDP 30.2105** a 1 mg/ml, cisteína a 10 mg/ml en PBS, pH 7,4 a 37 °C después de 24 h, 48 h y 6 d HPLC-FI C18; * impureza.

La **Fig. 8** muestra un derivado de α -amanitina **HDP 30.1699** con engarce escindible en el resto 6-OH del AA4,

derivado de β -amanitina **HDP 30.2060** con engarce escindible en la posición γ del AA1 y variante de amatoxina doble desoxi **HDP 30.2115** con engarce escindible en la posición γ del AA1.

La **Fig. 9** muestra un análisis por transferencia Western de los derivados de amatoxina **HDP 30.1699**, **HDP 30.2060** y **HDP 30.2115** conjugados con anticuerpo T-D265C después de la incubación a 37 °C en plasma humano, plasma de ratón y solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 0, 4 y 10 días. La detección se realizó con un anticuerpo anti-amanitina policlonal de conejo y un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante. **HDP 30.1699** y **HDP 30.2060** mostraron entrecruzamientos considerables y pérdida del resto amatoxina. La variante de amanitina doble desoxi **HDP 30.2115** muestra una gran estabilidad y entrecruzamientos significativamente reducidos.

La **Fig. 10** muestra la citotoxicidad de los derivados de amatoxina **HDP 30.1699**, **HDP 30.2060** y **HDP 30.2115** conjugados con el anticuerpo T-D265C. Los elementos de ensayo se incubaron en plasma humano a 37 °C durante 0 y 4 días. El ensayo de citotoxicidad se realizó en células SKBR-3 durante 96 h. Los CAF a base de **HDP 30.1699** y **HDP 30.2060** muestran una notable pérdida de citotoxicidad después de 4 días de estrés en plasma mientras que el derivado desoxigenado **HDP 30.2115** todavía muestra actividad picomolar

La **Fig. 11** muestra la citotoxicidad de los derivados de amatoxina **HDP 30.1699**, **HDP 30.2060** y **HDP 30.2115** conjugados con el anticuerpo T-D265C. Los elementos de ensayo se incubaron en plasma de ratón a 37 °C durante 0 y 4 días. El ensayo de citotoxicidad se realizó en células SKBR-3 durante 96 h. Los CAF a base de **HDP 30.1699** y **HDP 30.2060** muestran una notable pérdida de citotoxicidad después del estrés en plasma mientras que el derivado desoxigenado **HDP 30.2115** permanece casi sin cambios.

La **Fig. 12** muestra la citotoxicidad de los derivados de amatoxina **HDP 30.1699**, **HDP 30.2060** y **HDP 30.2115** conjugados con el anticuerpo T-D265C. Los elementos de ensayo se incubaron en PBS a 37 °C durante 0 y 4 días. El ensayo de citotoxicidad se realizó en células SKBR-3 durante 96 h. Todos los CAF muestran una estabilidad adecuada en un entorno no enzimático.

La **Fig. 13** compara la actividad antitumoral de diferentes conjugados de anticuerpo chiBCE19-D265C-amatoxina en el modelo de xenoinjerto Raji s.c. - experimento de dosis única. Dependiendo del engarce y la estructura de la toxina, se han observado diferencias significativas en la actividad antitumoral. La variante de desoxi-amanina chiBCE19-30.2115 (6'-desoxi en el aminoácido 4 y S-desoxi en el aminoácido 8) mostró la mejor actividad antitumoral de todos los CAF de amatoxina, con un índice terapéutico significativamente mejor que el correspondiente engarce escindible CAF chiBCE19-30.1699 (conjugación de lisina a través de 6'-OH; S=O en el aminoácido 8).

La **Fig. 14** muestra el análisis de supervivencia de Kaplan Meier en un modelo de tumor Raji sistémico - experimento de dosis única. En resumen, se inocularon $2,5 \times 10^6$ células tumorales Raji (linfoma de Burkitt humano) en 200 μ l de PBS/ratón por vía intravenosa el día 0. La terapia (dosis única, i.v.) se inició el día 3 posterior a la inoculación de las células tumorales. La variante de desoxi-amanina chiBCE19-30.2115 (6'-desoxi en el aminoácido 4 y S-desoxi en el aminoácido 8) mostró una supervivencia superior a los derivados de α -amanitina **HDP 30.1699**, **HDP 30.0880** y **HDP 30.0643**, así como el correspondiente derivado de MMAE.

Descripción detallada de la invención

Antes de que la presente invención se describa en detalle a continuación, ha de entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares que se describen en el presente documento, ya que estos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende limitar el ámbito de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto en la materia.

En particular, los términos usados en el presente documento se definen como se describe en "*A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)*", Leuenberger, H. G. W, Nagel, B. y Kölbl, H. editores (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un elemento integrante, una composición o una etapa, o un grupo de elementos integrantes o etapas establecido, aunque cualquier elemento integrante, composición o etapa, o grupo de elementos integrantes, composiciones o etapas adicional también pueden estar presentes opcionalmente, incluyendo realizaciones en las que no esté presente ningún elemento integrante, composición o etapa, o grupo de elementos integrantes, composiciones o etapas adicional. En dichas últimas realizaciones, la expresión "que comprende" se usa indistintamente con "que consiste en".

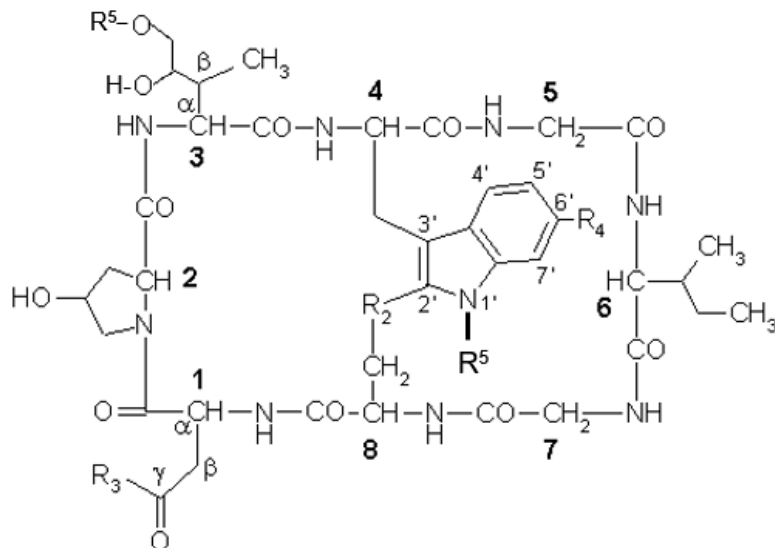
La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto definido de este modo puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La presente invención se basa en la observación inesperada de que una forma variante de amatoxinas con (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi, muestra una estabilidad aumentada en condiciones de estrés y un índice terapéutico mejorado.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; (b) un resto de unión a diana; y (c) un engarce como se define en las reivindicaciones que une dicha amatoxina y dicho resto de unión a diana.

Zhao y col., *ChemBioChem* 16 (2015) 1420-1425, notificaron la síntesis de dicho núcleo de di-desoxi amatoxina. Sin embargo, el procedimiento de Zhao y col. dio como resultado una mezcla de cuatro diastereómeros diferentes y solo uno de ellos presentó la toxicidad deseada de los productos naturales. Por tanto, como identificaron de forma completamente correcta Zhao y col., la producción del diastereómero tóxico individual en forma pura todavía representaba una necesidad clave (Zhao y col., *Loc. Cit.*, pág. 1424, columna izquierda). Aunque Zhao y col. propusieron una larga lista de posibles vías para conseguir dicho resultado; las propuestas proporcionadas no son más que una invitación a realizar una investigación. Adicionalmente, aunque Zhao y col. pudieron confirmar que la variante sintética mantiene esencialmente la toxicidad del producto natural correspondiente, no muestran ninguna ventaja de su nuevo compuesto y, en particular, no proporcionan ninguna enseñanza ni siquiera ninguna sugerencia de que los derivados de amatoxina con un núcleo di-desoxi de acuerdo con la presente invención muestren una mayor estabilidad en condiciones de estrés en plasma y no dan como resultado productos entrecruzados. Por tanto, Zhao y col. no proporcionan ningún incentivo particular para que un experto en la materia realice los esfuerzos necesarios para dichas actividades de investigación.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un conjugado que tiene la estructura I



en donde:

R² es S;
R³ se selecciona entre -NHR⁵, -NH-OR⁵ y -OR⁵;
R⁴ es H; y

en donde uno de R⁵ es -L_n-X, en donde L es un engarce, en particular un engarce escindible como se define en las reivindicaciones, n se selecciona entre 0 y 1, y X es un resto de unión a diana, y en donde los R⁵ restantes son H.

En el contexto de la presente invención, el término "amatoxina" incluye todos los péptidos cíclicos que comprenden 8 aminoácidos aislados del género *Amanita* y descritos en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T., Faulstich H., *CRC Crit Rev. Biochem.* 5 (1978) 185-260), que comprenden las posiciones específicas de acuerdo con (i) (es decir, donde el

resto indol del resto de aminoácido triptófano no tiene ningún sustituyente que contenga oxígeno en la posición 6', en particular donde la posición 6' porta un átomo de hidrógeno) y (ii) (es decir, en los que el resto sulfóxido de tioéter de las amatoxinas de origen natural se reemplaza por un sulfuro), y además incluye todos los análogos semisintéticos de los mismos y todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de componentes básicos de acuerdo con la estructura maestra de los compuestos naturales (cíclicos, 8 aminoácidos), adicionalmente todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de los aminoácidos hidroxilados, en donde cualquiera de dicho derivado o análogo porta al menos las posiciones (i) y (ii) mencionadas anteriormente y es funcionalmente activo mediante la inhibición de la ARN polimerasa II de mamífero.

Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamíferos. Son amatoxinas preferidas aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico o derivado de ácido carboxílico tal como una carboxamida o ácido hidroxámico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo capturador de tiol) que pueden hacerse reaccionar con moléculas engarzadoras o restos de unión a diana como se ha definido anteriormente. Son amatoxinas particularmente adecuadas para los conjugados de la presente invención variantes di-desoxi de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanulina o ácido amanulínico o variantes mono-desoxi de amanina, amaninamida, γ -amanina o γ -amaninamida como se muestra en la Fig. 1, así como sales, derivados químicos, análogos semisintéticos y análogos sintéticos de los mismos.

En una realización particular, el conjugado de la presente invención tiene una pureza superior al 90 %, en particular superior al 95 %.

En el contexto de la presente invención, el término "pureza" se refiere a la cantidad total de conjugados que están presentes. Una pureza superior al 90 %, por ejemplo, significa que, en 1 mg de una composición que comprende un conjugado de la presente invención, hay más del 90 %, es decir, más de 900 μ g de dicho conjugado. La parte restante, es decir, las impurezas pueden incluir material de partida sin reaccionar y otros reactivos, disolventes, productos de escisión y/o productos secundarios.

En una realización particular, una composición que comprende un conjugado de la presente invención comprende más de 100 mg, en particular más de 500 mg y más en particular más de 1 g de dicho conjugado. Por tanto, se excluye explícitamente la cantidad traza de un conjugado de la presente invención que podría estar presente en preparaciones complejas de conjugados de la técnica anterior, por ejemplo, a partir de la reducción parcial de sulfóxidos naturales.

La expresión "resto de unión a diana", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que puede unirse específicamente a una molécula diana o epítipo diana. Son restos de unión a diana preferidos en el contexto de la presente solicitud (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; (ii) proteínas de tipo anticuerpo; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a diana" adecuados para su uso en la presente invención normalmente tienen una masa molecular de 40.000 Da (40 kDa) o mayor.

Como se usa en el presente documento, se considera que un primer compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) se une específicamente a un segundo compuesto (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína diana), si tiene una constante de disociación K_D a dicho segundo compuesto de 100 μ M o menor, en particular de 50 μ M o menor, en particular de 30 μ M o menor, en particular de 20 μ M o menor, en particular de 10 μ M o menor, en particular de 5 μ M o menor, más en particular de 1 μ M o menor, más en particular de 900 nM o menor, más en particular de 800 nM o menor, más en particular de 700 nM o menor, más en particular de 600 nM o menor, más en particular de 500 nM o menor, más en particular de 400 nM o menor, más en particular de 300 nM o menor, más en particular de 200 nM o menor, incluso más en particular de 100 nM o menor, aún más en particular de 90 nM o menor, incluso más en particular de 80 nM o menor, incluso más en particular de 70 nM o menor, incluso más en particular de 60 nM o menor, incluso más en particular de 50 nM o menor, incluso más en particular de 40 nM o menor, incluso más en particular de 30 nM o menor, incluso más en particular de 20 nM o menor e incluso más en particular de 10 nM o menor.

En el contexto de la presente solicitud, las expresiones "molécula diana" y "epítipo diana", respectivamente, se refieren a un antígeno y a un epítipo de un antígeno, respectivamente, que están específicamente unidos por un resto de unión a diana. En particular, la molécula diana es un antígeno asociado a tumor, en particular un antígeno o un epítipo que está presente sobre la superficie de uno o más tipos de células tumorales a una concentración aumentada y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de células no tumorales. En particular, dicho antígeno o epítipo está presente sobre la superficie de uno o más tipos de células tumorales, pero no sobre la superficie de células no tumorales. En realizaciones particulares, el resto de unión a diana se une específicamente a un epítipo de un antígeno seleccionado entre: PSMA, CD19, CD269, sialil Lewis^x, HER-2/neu y molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). En otras realizaciones, dicho antígeno o epítipo se expresa preferentemente sobre células implicadas en enfermedades autoinmunitarias. En realizaciones particulares de este tipo, el resto de unión a diana se une específicamente a un epítipo del receptor de IL-6 (IL-6R).

La expresión "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. De este modo, la expresión "fragmento de unión a antígeno del mismo" se refiere a un fragmento de un anticuerpo que

comprende al menos un dominio de unión a antígeno funcional. También se incluyen proteínas similares a inmunoglobulinas que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, presentación de fagos para unirse específicamente a una molécula diana, por ejemplo, a una proteína diana seleccionada entre: PSMA, CD19, CD269, sial Lewis^a, Her-2/neu y EpCAM. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Los "anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos" adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados (en particular injertados con CDR), desinmunizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos mediante un banco de expresión Fab, diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. y col., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 90 (1993) 6444-8), nanocuerpos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos a disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo los anticuerpos monocatenarios, pueden comprender el o los dominios variables solos o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de un dominio o de dominios variables con una región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos que pueden usarse en la invención pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. En particular, los anticuerpos son de origen humano, de roedor (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias o conejo), pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro. Se prefiere en particular que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Como se usa en el presente documento, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bancos de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe por ejemplo en la Patente de los EE. UU. n.º 5.939.598 de Kucherlapaty y Jakobovits.

La expresión "proteína similar a anticuerpo" se refiere a una proteína que se ha genomodificado (por ejemplo, mediante mutagénesis de bucles) para unirse específicamente a una molécula diana. Normalmente, dicha proteína similar a anticuerpo comprende al menos un bucle de péptido variable fijado en ambos extremos a un armazón de proteína. Esta doble restricción estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína similar a anticuerpo a niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle peptídico variable normalmente consiste en de 10 a 20 aminoácidos. La proteína de armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. En particular, la proteína de armazón es una pequeña proteína globular. Las proteínas similares a anticuerpo incluyen, sin limitación, aficuerpos, anticalinas y proteínas de repetición de anquirina modificadas (para revisión, véase: Binz y col., *Nat Biotechnol.* 2005, 1257-68). Las proteínas similares a anticuerpo pueden derivar de grandes bancos de mutantes, por ejemplo, pueden seleccionarse de grandes bancos de presentación de fagos y pueden aislarse de forma análoga a los anticuerpos normales. Además, las proteínas de unión similares a anticuerpos pueden obtenerse mediante mutagénesis combinatoria de restos expuestos a la superficie en proteínas globulares.

La expresión "aptámero de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha genomodificado a través de series repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a una molécula diana (para una revisión véase: Brody y Gold, *J Biotechnol.* 74 (2000) 5-13). El aptámero de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. Los aptámeros pueden contener modificaciones, por ejemplo, nucleótidos modificados tales como pirimidinas sustituidas con 2'-flúor.

Un "engarce" en el contexto de la presente invención se refiere a una estructura que está conectando dos componentes, estando cada uno unido a un extremo del engarce. El engarce utilizado en la presente invención se define en las reivindicaciones. En el caso de que el engarce sea un enlace (realización que no forma parte de la presente invención), un enlace directo de la amatoxina al anticuerpo puede disminuir la capacidad de la amatoxina para interactuar con la ARN polimerasa II. En realizaciones particulares, el engarce aumenta la distancia entre dos componentes y alivia la interferencia estérica entre estos componentes, tal como en el presente caso entre el anticuerpo y la amatoxina. En realizaciones particulares, el engarce tiene una cadena continua de entre 1 y 30 átomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos) en su cadena principal, es decir, la longitud del engarce se define como la conexión más corta medida mediante el número de átomos o enlaces entre el resto amatoxina y el anticuerpo, en donde un lado de la estructura del engarce se ha hecho reaccionar con la amatoxina y, el otro lado está disponible para la reacción o se ha hecho reaccionar, con un anticuerpo. En el contexto de la presente invención, un engarce es, en particular, un grupo alquileo C₁₋₂₀, heteroalquileo C₁₋₂₀, alquilenilo C₂₋₂₀, heteroalquilenilo C₂₋₂₀, alquinileno C₂₋₂₀, heteroalquinileno C₂₋₂₀, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroaralquileo, opcionalmente sustituido. El engarce puede contener uno o más elementos estructurales tales como restos carboxamida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos hidrocarbonados y similares. El engarce también puede contener combinaciones de dos

o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el engarce más de una vez, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces. En algunas realizaciones, el engarce puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el engarce tiene que fijarse ya sea en una sola etapa o en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y el anticuerpo. Para ese fin, el engarce portará dos grupos, en particular en un extremo proximal y distal, que pueden (i) formar un enlace covalente con un grupo presente en uno de los componentes que se han de unir, en particular un grupo activado sobre una amatoxina o el péptido de unión a diana o (ii) que se activa o puede activarse para formar un enlace covalente con un grupo sobre una amatoxina. En consecuencia, se prefiere que los grupos químicos estén en el extremo distal y proximal del engarce, que son el resultado de dicha reacción de acoplamiento, por ejemplo, un éster, un éter, un uretano, un enlace peptídico, etc.

En realizaciones particulares, el engarce L es una cadena lineal de entre 1 y 20 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, en particular de entre 2 y 18 átomos, más en particular de entre 5 y 16 átomos y aún más en particular de entre 6 y 15 átomos. En realizaciones particulares, al menos el 60 % de los átomos de la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos de la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

En realizaciones particulares, el engarce L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquilenilo, heteroalquilenilo, alquinileno, heteroalquinileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroaralquileo, que comprende de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde dicho engarce está opcionalmente sustituido.

El término "alquileo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal bivalente que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, incluyendo grupos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, los grupos alquileo pueden ser grupos alquileo inferiores. La expresión "alquileo inferior" se refiere a grupos alquileo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono y en ciertas realizaciones de 1 a 5 o de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquileo incluyen, pero no se limitan a, metileno ($-\text{CH}_2-$), etileno ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), n-propileno, n-butileno, n-pentileno y n-hexileno.

El término "alquilenilo" se refiere a grupos bivalentes de cadena lineal que tienen de 2 a 20 átomos de carbono, en los que al menos uno de los enlaces carbono-carbono es un doble enlace, mientras que otros enlaces pueden ser enlaces simples o enlaces dobles adicionales. El término "alquinileno" en el presente documento se refiere a grupos que tienen de 2 a 20 átomos de carbono, en donde al menos uno de los enlaces carbono-carbono es un enlace triple, mientras que otros enlaces pueden ser enlaces simples, dobles o enlaces triples adicionales. Los ejemplos de grupos alquilenilo incluyen etenileno ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 1-propenileno, 2-propenileno, 1-butenileno, 2-butenileno, 3-butenileno y similares. Los ejemplos de grupos alquinileno incluyen etinileno, 1-propinileno, 2-propinileno y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquileo" tiene por objeto referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero ningún heteroátomo, y donde dicho anillo está completamente saturado, y el término "cicloalquilenilo" tiene por objeto referirse a un anillo bivalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero no contiene ningún heteroátomo, y dicho anillo está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno). Los ejemplos de cicloalquilenos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y cicloheptileno. Los ejemplos de cicloalquilenos incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenileno y ciclohexenileno.

Como se usan en el presente documento, los términos "heterocicloalquileo" y "heterocicloalquilenilo" tienen por objeto referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema de anillo monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo tiene entre 3 y aproximadamente 12 átomos, y donde dicho anillo consiste en carbono átomos y al menos un heteroátomo, en particular al menos un heteroátomo seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en N, O y S, refiriéndose heterocicloalquileo a dicho anillo que está completamente saturado y refiriéndose heterocicloalquilenilo a un anillo que está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno o heteroarileno).

El término "arileno" significa un anillo bivalente o sistema de anillo que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo o sistema de anillo tiene entre 3 y 20 átomos de carbono, pero no tiene ningún heteroátomo, consistiendo dicho anillo o sistema de anillo en un resto aromático como se define por la regla de electrones π "4n+2", incluyendo fenileno.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarileno" se refiere a un anillo bivalente o sistema de anillo que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo o sistema de anillo tiene entre 3 y 20 átomos, consistiendo dicho anillo o sistema de anillo en un resto aromático definido por la regla de electrones π "4n+2" y conteniendo átomos de carbono y uno o más heteroátomos de nitrógeno, azufre y/u oxígeno.

En el contexto de la presente invención, el término "sustituido" tiene por objeto indicar que uno o más hidrógenos presentes en la cadena principal de un engarce se reemplazan por una selección del grupo o grupos indicados, siempre que la valencia normal del átomo indicado, o la del átomo apropiado del grupo que está sustituido, no se

exceda y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. La expresión "opcionalmente sustituido" tiene por objeto significar que el engarce está sin sustituir o sustituido, como se define en el presente documento, con uno o más sustituyentes, como se define en el presente documento. Cuando un sustituyente es un grupo ceto (u oxo, es decir =O), un grupo tio o imino o similar, entonces se reemplazan dos hidrógenos en el átomo de la cadena principal del engarce. Los sustituyentes de ejemplo incluyen, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, acilo, aroilo, heteroaróilo, carboxilo, alcoxi, ariloxi, aciloxi, aroiloxi, heteroaróiloxi, alcóxicarbonilo, halógeno, (tio)éster, ciano, fosforilo, amino, imino, (tio)amido, sulfhidrilo, alquiltio, aciltio, sulfonilo, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, nitro, azido, haloalquilo, incluyendo perfluoroalquilo (tal como trifluorometilo), haloalcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonoamino, fosforilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, alquilcarboxi, alquilcarboxiamida, oxo, hidroxilo, mercapto, amino (opcionalmente monosustituido o disustituido, por ejemplo, con alquilo, arilo o heteroarilo), imino, carboxamida, carbamoilo (opcionalmente monosustituido o disustituido, por ejemplo, con alquilo, arilo o heteroarilo), amidino, aminosulfonilo, acilamino, aroílamino, (tio)ureido, (ariltio)ureido, alquil(tio)ureido, cicloalquilo(tio)ureido, ariloxi, aralcoxi o $-O(CH_2)_n-OH$, $-O(CH_2)_n-NH_2$, $-O(CH_2)_n-COOH$, $-(CH_2)_n-COOH$, $-C(O)O(CH_2)_nR$, $-(CH_2)_nN(H)C(O)OR$ o $-N(R)S(O)_2R$ en los que n es 1-4 y R se selecciona independientemente entre hidrógeno, -alquilo, -alquenilo, -alquinilo, -cicloalquilo, -cicloalquenilo, -(heterocicloalquilo unido a C), -(heterocicloalquenilo unido a C), -arilo y -heteroarilo, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Los expertos en la materia entenderán que los sustituyentes, tales como heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, etc. o los grupos funcionales tales como -OH, -NHR, etc., pueden a su vez estar sustituidos, si es apropiado. Los expertos en la materia también entenderán que los propios restos sustituidos pueden estar sustituidos también cuando sea apropiado.

En realizaciones particulares, el engarce L comprende un resto seleccionado entre uno de los siguientes restos: un disulfuro (-S-S-), un éter (-O-), un tioéter (-S-), una amina (-NH-), un éster (-OC(=O)- o -C(=O)-O-), una carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un uretano (-NH-C(=O)-O- o -OC(=O)-NH-) y un resto urea (-NH-C(=O)-NH-).

En realizaciones particulares de la presente invención, el engarce L comprende un número de m grupos seleccionados entre la lista de: alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, cicloalquilenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilenilo, heteroalquinilenilo, heterocicloalquilenilo, arilenilo, heteroarilenilo, aralquilenilo y un grupo heteroaralquilenilo, en los que cada grupo puede estar opcionalmente sustituido independientemente, el engarce comprende adicionalmente un número de n restos seleccionados independientemente entre uno de los siguientes restos: un disulfuro (-S-S-), un éter (-O-), un tioéter (-S-), una amina (-NH-), un éster (-OC(=O)- o -C(=O)-O-), una carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un uretano (-NH-C(=O)-O- o -OC(=O)-NH-) y un resto urea (-NH-C(=O)-NH-), en los que $m = n + 1$. En realizaciones particulares, m es 2 y n es 1 o m es 3 y n es 2. En realizaciones particulares, el engarce comprende 2 o 3 grupos alquilenilo sin sustituir y 1 o 2, respectivamente, restos de disulfuro, éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, uretano o urea que unen los grupos alquilenilo sin sustituir.

En una realización particular, el engarce L no comprende un grupo heteroarilenilo.

En realizaciones particulares, los átomos de C de la cadena lineal son independientemente parte de grupos metileno opcionalmente sustituidos (-CH₂-). En realizaciones particulares de este tipo, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente entre halógeno y alquilo C₁₋₆, en particular metilo.

En realizaciones particulares, el engarce L es un engarce estable.

En este contexto, la expresión "engarce estable" se refiere a un engarce que es estable (i) en presencia de enzimas y (ii) en un entorno intracelular reductor.

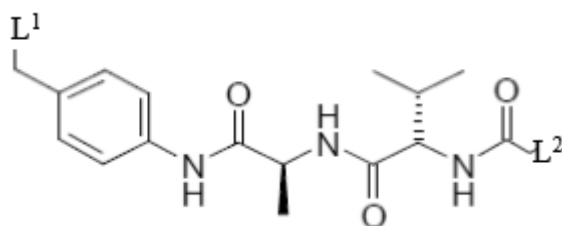
En realizaciones particulares (que no forman parte de la invención), el engarce estable no contiene (i) una subestructura escindible por enzimas y/o (ii) un grupo disulfuro. En realizaciones particulares de este tipo, el engarce tiene una longitud de hasta 12 átomos, en particular de 2 a 10, más en particular de 4 a 9 y, lo más particularmente, de 6 a 8 átomos.

En otras realizaciones particulares, el engarce es un engarce escindible como se define en las reivindicaciones.

La expresión "engarce escindible" se puede referir a un engarce que es (i) escindible por una enzima o (ii) un engarce reducible. En realizaciones particulares, la expresión solo se refiere a un engarce que es escindible por una enzima (no a un engarce reducible).

En el contexto de la presente invención, la expresión "engarce que es escindible ... por una enzima" se refiere a un engarce que puede ser escindido por una enzima, en particular por una peptidasa lisosómica, tal como la Cathepsina B, dando como resultado la liberación intracelular de la carga de toxina conjugada con el anticuerpo dirigido después de la interiorización (véase Dubowchik y col., *Bioconjug Chem.* 13 (2002) 855-69). En realizaciones particulares, el engarce escindible comprende un dipéptido seleccionado entre: Phe-Lys, Val-Lys, Phe-Ala, Val-Ala, Phe-Cit y Val-Cit, en particular en donde el engarce escindible comprende adicionalmente un espaciador p-aminobencilo (PAB) entre los dipéptidos y la amatoxina.

En realizaciones particulares de este tipo, el engarce escindible comprende una estructura L¹-L*-L²

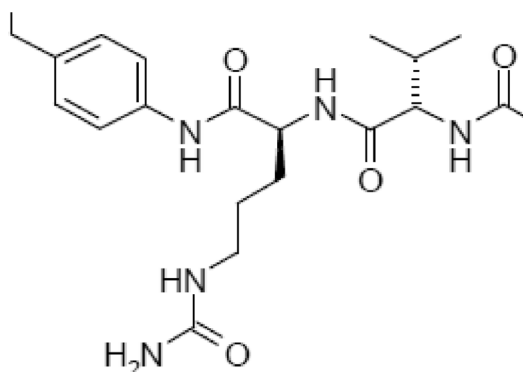


L1-L*-L2

en donde L¹ es una parte del engarce que conecta L* con la amatoxina, en particular, en donde L¹ está conectado con L* a través de un grupo -NH- o un grupo -O-, en particular un grupo -C(=O)-NH-, un grupo -C(=O)-NH-O- o un grupo -C(=O)-O-, y

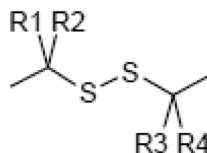
en donde L² es una parte del engarce que conecta L* con el resto de unión a diana, en particular en donde L¹ está conectado con L* a través de un resto -(CH₂)_m-, siendo m un número entero seleccionado entre 1 a 8, en particular 1 a 5, o a través de un resto -(CH₂CH₂O)_n-, siendo n un número entero seleccionado entre 1 a 3, en particular 1 a 2.

En otras realizaciones particulares de este tipo, L* tiene la siguiente estructura



En realizaciones particulares, el engarce L¹ es una cadena lineal de entre 1 y 4 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, en particular entre 1 y 3 átomos de carbono, más en particular entre 1 y 2 átomos e incluso más en particular de solo 1 átomo. En realizaciones particulares, al menos el 50 % de los átomos de la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos de la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

La expresión "engarce reducible" se refiere a un engarce que puede escindirse en el entorno reductor intracelular, en particular un engarce que contiene un grupos disulfuro, dando como resultado la liberación intracelular de la carga de toxina conjugada con el resto de unión a diana después de la interiorización por el entorno reductor intracelular (véase Shen y col., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 10905-10908). En realizaciones particulares, el engarce reducible comprende un resto



en donde R1 a R4 se seleccionan independientemente entre H y metilo.

En realizaciones particulares de este tipo (que no forman parte de la invención), dicho engarce escindible tiene una longitud de hasta 20 átomos, en particular de 6 a 18, más en particular de 8 a 16 y, lo más particularmente, de 10 a 15 átomos. En realizaciones particulares de este tipo, la parte del engarce que une la amatoxina de acuerdo con la presente invención y el grupo disulfuro escindible es una cadena lineal de 3 o 4 átomos de C, en particular de 3 átomos de C. En realizaciones particulares, los 3 o 4 átomos de C de la cadena lineal están unidos por enlaces simples. En realizaciones particulares, el engarce es un grupo n-propileno.

En realizaciones particulares, el engarce como se define en las reivindicaciones está presente y está conectado por un lado con una posición en la amatoxina de fórmula I seleccionada entre

- 5 (i) en el caso de un conjugado de fórmula I con $R^3 = -NHR^5$, el átomo de nitrógeno del grupo amida en el átomo de C y del aminoácido 1 de amatoxina (enlace amida);
- (ii) en el caso de un conjugado de fórmula I con $R^3 = -OR^5$, el átomo de oxígeno del grupo ácido en el átomo de C y del aminoácido 1 de amatoxina (enlace éster);
- (iii) en el caso de un conjugado de fórmula I con $R^3 = -NHR^5$, el átomo de oxígeno del grupo ácido hidroxámico en el átomo de C y del aminoácido 1 de amatoxina;
- 10 (iv) el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo en el átomo de C o del aminoácido 3 de amatoxina, en particular a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
- (v) el nitrógeno de anillo del aminoácido 4.

15 En realizaciones particulares de este tipo, el engarce como se define en las reivindicaciones está presente y está conectado por un lado con una posición en la amatoxina de fórmula I seleccionada de (ii) a (v) mostradas anteriormente. En realizaciones particulares, el engarce como se define en las reivindicaciones está presente y está conectado por un lado con una posición en la amatoxina de fórmula I seleccionada de (iv) a (v) mostradas anteriormente.

20 El acoplamiento del engarce al resto de unión a diana puede conseguirse mediante diversos procedimientos bien conocidos por un experto habitual en la materia, en particular en la técnica de los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF).

25 En realizaciones particulares, dicho engarce está conectado con el resto de unión a diana a través de un resto urea (...-engarce-NH-C(=O)-NH-resto de unión a diana). En realizaciones particulares de este tipo, el resto urea es resultado de una reacción de una amina primaria originalmente presente en el resto de unión a diana, tal como un grupo amino de una cadena lateral de lisina, con un derivado de ácido carbámico ...-engarce-NH-C(O)-Z, en donde Z es un grupo saliente que puede reemplazarse por una amina primaria.

30 En otras realizaciones particulares, dicho engarce está presente y está conectado con el resto de unión a diana a través de un resto tioéter (...-engarce-S-resto de unión a diana). De este modo, en realizaciones de este tipo, la presente invención se refiere a un conjugado de fórmula genérica:



35 en donde Didesoxiamatoxina es una amatoxina de acuerdo con la presente invención, L es un engarce, X^* es un resto resultante del acoplamiento de un grupo tiol con un grupo reactivo al tiol, S es el átomo de azufre de dicho grupo tiol, en particular el grupo tiol de un resto de aminoácido cisteína y Tbm es un resto unión a diana, en particular un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional que comprende dicho resto de aminoácido cisteína. En realizaciones particulares, dicho resto de aminoácido cisteína (i) está ubicado en un dominio de anticuerpo seleccionado entre CL, CH1, CH2 y CH3; (ii) está ubicado en una posición donde la secuencia de la estirpe germinal que presenta la homología más próxima a la secuencia de dicho dominio de anticuerpo contiene un resto de aminoácido diferente de la cisteína; y (iii) está ubicado en una posición que está expuesta a disolventes.

45 En el contexto de la presente invención, la expresión "grupo reactivo al tiol" se refiere a un grupo que reacciona selectivamente con el grupo tiol de, por ejemplo, una cisteína libre de un anticuerpo, en particular en un valor de pH en el intervalo entre 6,0 y 8,0, más en particular en un valor de pH en el intervalo entre 6,5 y 7,5. En particular, el término "selectivamente" significa que menos del 10 % de las reacciones de acoplamiento de una molécula que comprende un grupo reactivo al tiol con un anticuerpo que comprende al menos un resto de cisteína libre son reacciones de acoplamiento con restos no de cisteína del anticuerpo, tales como restos de lisina, en particular menos del 5 %, más en particular menos del 2 %. En realizaciones particulares, el grupo reactivo al tiol se selecciona entre bromoacetamida, yodoacetamida, maleimida, una maleimida que tiene un grupo saliente en la posición 3, en particular un grupo saliente seleccionado entre -Br, y tiol sustituido (véase, por ejemplo, el documento US 9.295.729), una 1,2-dihidropiridazin-3,6-diona que tiene un grupo saliente en la posición 4, en particular un grupo saliente seleccionado entre -Br y tiol sustituido (véase, por ejemplo, el documento US 9.295.729), metilsulfonil-benzotiazol, metilsulfonil-feniltetrazol, metilsulfonil-feniloxadiazol (véase Toda y col., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52 (2013) 12592-6), un 3-arilpropionitrilo (véase Kolodych y col., *Bioconjugate Chem.* 2015, 26, 197-200) y 5-nitro-piridin-2-il-disulfuro (...-L-S-S-(5-nitro-piridina-2-ilo).

60 En realizaciones particulares, dicha posición o grupo funcional, que está conectado por un lado con el engarce y que puede estar conectado directa o indirectamente con una posición o grupo funcional presente en un resto de unión a diana es un resto que puede reaccionar con dos grupos tiol presentes en un resto de unión a diana o en dos restos de unión a diana. En realizaciones particulares, el grupo reactivo al tiol es una maleimida que tiene dos grupos salientes en las posiciones 3 y 4, en particular seleccionados entre 3,4-dibromomaleimida, 3,4-bis(arilitio)-maleimida, en particular 3,4-difeniltio-maleimida y 3,4-bis(heteroarilitio)-maleimida, en particular 3,4-bis(2-piridinil-sulfanil)-maleimida, y. En otras realizaciones particulares, el grupo reactivo al tiol es una 1,2-dihidropiridazina-3,6-diona que tiene dos

grupos salientes en las posiciones 4 y 5, en particular seleccionados entre 4,5-bromo-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, 4,5-bis(ariltio)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, en particular 4,5-difeniltio-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona y 4,5-bis(heteroariltio)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, en particular 4,5-bis(2-piridinil-sulfanil)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona.

En realizaciones particulares, el resto que es resultado del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo reactivo al tiol se selecciona entre: acetamida sustituida con tiol; succinimida sustituida con tiol; ácido succinámico sustituido con tiol; heteroarilo sustituido con tiol, en particular benzotiazol sustituido con tiol, feniltetrazol sustituido con tiol y feniloxadiazol sustituido con tiol; y un disulfuro, en donde un átomo de azufre deriva de un resto cisteína del anticuerpo. En realizaciones particulares, el resto que es resultado del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo reactivo al tiol es una succinimida sustituida con tiol.

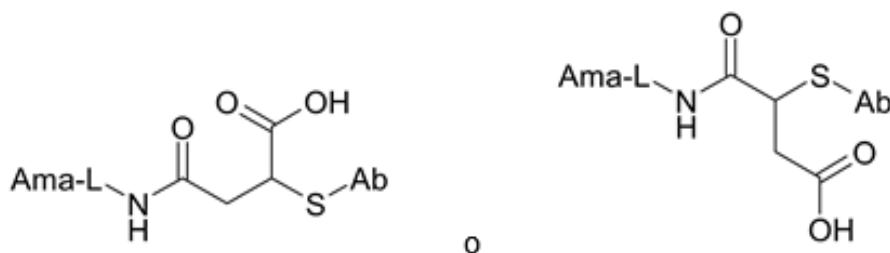
En realizaciones particulares, el engarce L en el resto L-X*-S presente en la fórmula genérica de la sección [0070], se selecciona entre el siguiente grupo de restos:

(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_3-S-S-(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_3-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_3-S-S-(CH_2)_3-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_4-S-S-(CH_2)_4-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_2-CMe_2-S-S-(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_2-S-S-CMe_2-(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-(CH_2)_3-S-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Cit-Val-CO(CH_2)_5-X-S-$	(lado Tbm)
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Ala-Val-CO(CH_2)_5-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Ala-Val-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Ala-Phe-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Lys-Phe-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Cit-Phe-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Val-Val-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Ile-Val-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-His-Val-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Met-Val-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);
(lado didesoxiamatoxina)	$-CH_2-C_6H_4-NH-Asn-Lys-CO(CH_2)_2-X-S-$	(lado Tbm);

y en donde -NH- y -CO- que flanquean las secuencias dipeptídicas representan restos amino y carbonilo del engarce que forma enlaces amida con el extremo carboxi y amino del dipéptido, respectivamente.

En el contexto de la presente invención, la expresión "un resto resultante del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo reactivo al tiol" se refiere a una estructura que es resultado de (i) la sustitución nucleófila de un grupo saliente Y presente en un grupo reactivo al tiol por el átomo de azufre de un resto cisteína, por ejemplo, un grupo bromoacetamida, una yodoacetamida, un grupo 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, una alquilsulfona o una heteroarilsulfona; (ii) la adición del grupo HS de un resto cisteína a un doble enlace activado de un grupo reactivo al tiol, por ejemplo, maleimida o (iii) un intercambio disulfuro de un disulfuro o metano-tiosulfonato activado con el átomo de azufre de una cisteína resto, por ejemplo, con piridina-2-tiol, 5-nitropiridin-2-tiol o metanosulfonato como grupo saliente; o (iv) cualquier otra reacción química que dé como resultado un enlace estable entre el átomo de azufre de un resto cisteína y un resto reactivo que es parte del grupo reactivo al tiol.

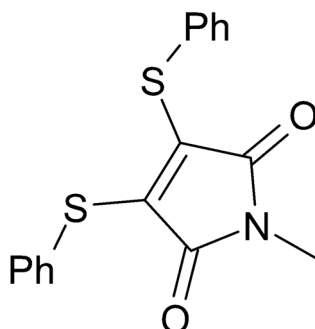
El resto primario que es resultado del acoplamiento del grupo tiol puede derivatizarse adicionalmente opcionalmente, por ejemplo, el succinimidil-tioéter resultado de una maleimida puede hidrolizarse a tioéteres de ácido succinámico de las siguientes estructuras genéricas



En otras realizaciones particulares, el acoplamiento específico de sitio puede conseguirse mediante la reducción de

un puente disulfuro presente en el resto de unión a diana y haciendo reaccionar los dos restos cisteína con un resto puente X* presente en una construcción Didesoxixamatoxina-L-X* (véase Badescu y col., "Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates". *Bioconjugate Chemistry*, 25 (2014) 1124-1136).

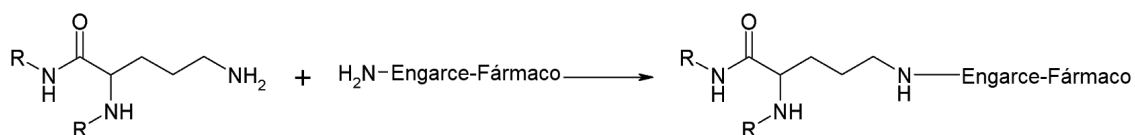
- 5 En una realización similar, el acoplamiento específico de sitio puede conseguirse mediante la reducción de un puente disulfuro presente en el resto de unión a diana y haciendo reaccionar los dos restos de cisteína con un resto puente X* presente en una construcción Didesoxixamatoxina-L-X*, en particular en donde X* es



- 10 (véase Bryden y col., *Bioconjug Chem*, 25 (2014) 611-617; Schumacher y col., *Org Biomol Chem*, 2014, 7261-7269).

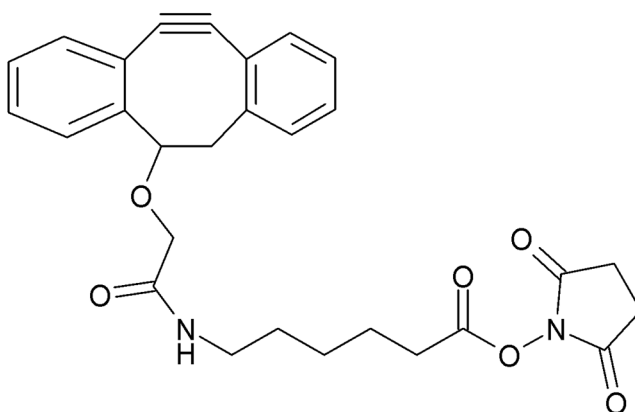
En otra realización particular, el acoplamiento se consigue mediante acoplamiento regioespecífico de un grupo amino presente en el engarce a un resto glutamina presente en el resto de unión a diana a través de una transaminasa, en particular mediante acoplamiento a la glutamina Q295 de un anticuerpo.

15



20 En una realización particular, el acoplamiento se consigue mediante conjugación específica de sitio con restos de unión a diana que comprenden cadenas laterales de N-glucano. En particular, la cadena lateral de N-glucano puede degradarse enzimáticamente, seguido de trans-glucosilación con una azido-galactosa. Usando química clic, dicho resto de unión a diana modificado puede acoplarse a construcciones Didesoxixamatoxina-L-X* modificadas apropiadamente, en las que X* es, por ejemplo, un dibenzo-ciclooctino (DIBO) o un resto análogo que comprende un triple enlace C-C. Por ejemplo, una construcción Didesoxixamatoxina-L-NH2 puede acoplarse a DIBO-SE

25



DIBO-SE

- 30 mediante sustitución nucleófila del resto hidroxí-succinimida. La construcción de engarce modificada con DIBO resultante puede acoplarse después al derivado de azido mencionado anteriormente. En una realización alternativa, el resto de unión a diana puede modificarse mediante la incorporación de un aminoácido no natural que permite la química clic, en particular mediante la incorporación de una para-azidometil-L-fenilalanina (pAMF).

- 35 En realizaciones particulares, el engarce L en -L-X* es una cadena lineal de al menos 5, en particular al menos 10, más en particular entre 10 y 20 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, en particular entre 10 y

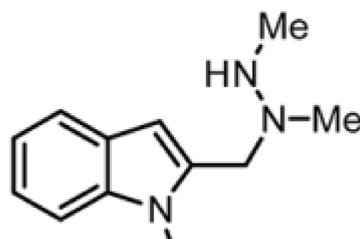
18 átomos, más en particular entre 10 y 16 átomos e incluso más en particular entre 10 y 15 átomos. En realizaciones particulares, al menos el 60 % de los átomos de la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos de la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

5 En realizaciones alternativas, la posición o grupo funcional, que puede estar directa o indirectamente conectada a una posición o grupo funcional presente en un resto de unión a diana, no es un grupo etinilo, o, más en general, no es un grupo alquinilo o no es un grupo que puede hacerse reaccionar con un dipolo 1,3 en una cicloadición 1,3-dipolar (química clic).

10 En otras realizaciones particulares, el acoplamiento específico de sitio de una construcción Didesoxixamatoxina-L-X* a un resto de unión a diana puede conseguirse mediante la incorporación de un aminoácido no natural que comprenda un grupo ceto, en particular p-acetilfenilalanina (pAcPhe), en el resto de unión a diana y haciendo reaccionar dicho resto de unión a diana modificado con una construcción Didesoxixamatoxina-L-X*, en donde X* es un resto hidroxilamina.

15 En una realización adicional, puede introducirse un grupo formilo mediante enzima generadora de formilglicina (EGF), que es altamente selectiva para un grupo cisteína en una secuencia de reconocimiento CxPxR para generar un marcador de aldehído. Dicho marcador de aldehído puede hacerse reaccionar con un grupo X* apropiado presente en una construcción Didesoxixamatoxina-L-X*, en particular en donde X* es

20



(véase Agarwal y col., *Bioconjugate Chem* 24 (2013) 846-851).

25 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en

30 cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

Como se usa en el presente documento, "tratar", "trata" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas

35 característicos del trastorno o los trastornos que se tratan; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno o los trastornos que se tratan; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno o los trastornos en pacientes que han tenido anteriormente el trastorno o los trastornos; y (e) limitar o prevenir la reaparición de síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el trastorno o los trastornos.

40 Como se usa en el presente documento, el tratamiento puede comprender administrar un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a un paciente, en donde "administrar" incluye la administración *in vivo*, así como administración directa al tejido *ex vivo*, tal como injertos de vena.

En realizaciones particulares, se usa una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de la presente invención.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para conseguir el fin pretendido. La cantidad eficaz de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que ha de recibir el agente terapéutico y el fin de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un experto en la

50 materia de acuerdo con procedimientos establecidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una amatoxina de acuerdo con la presente invención o un conjugado de la presente invención de una amatoxina con un resto de unión a diana y que comprende adicionalmente uno o más diluyentes, vehículos, excipientes, cargas, aglutinantes,

55 lubricantes, deslizantes, disgregantes, adsorbentes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales

y, más en particular, en seres humanos.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se usa en forma de un medicamento administrado por vía sistémica. Esto incluye parenterales, que comprenden, entre otros, inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan en forma de ampollas o los denominados inyectables listos para su uso, por ejemplo, jeringuillas listas para su uso o jeringuillas de un solo uso y, aparte de esto, en frascos perforables para la extracción múltiple. La administración de inyectables puede ser en forma de aplicación subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.c.). En particular, es posible producir las formulaciones de inyección adecuadas respectivamente como una suspensión de cristales, soluciones, sistemas nanoparticulares o de coloides dispersos como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables pueden producirse adicionalmente como concentrados, que pueden disolverse o dispersarse con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también puede prepararse en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposómicas y microemulsiones. De forma similar a los inyectables, las formulaciones de infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también pueden aplicarse en forma de infusiones permanentes tanto en pacientes ingresados como en terapias ambulatorias, por ejemplo, a través de minibombas.

Es posible añadir formulaciones de fármacos parenterales, por ejemplo, albúmina, plasma, expansor, sustancias tensioactivas, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias formadoras de complejos o sustancias poliméricas, en particular como sustancias que influyen en la adsorción de los conjugados de resto de unión a diana-toxina de la invención a proteínas o polímeros, o también pueden añadirse con el objetivo de reducir la adsorción de los conjugados de resto de unión a diana-toxina de la invención a materiales como instrumentos de inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

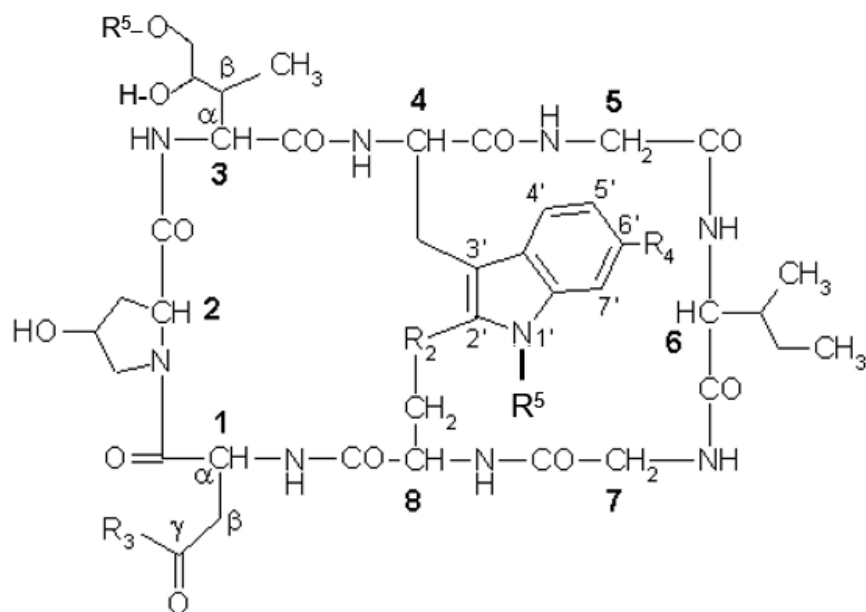
Las amatoxinas de la presente invención que comprenden un resto de unión a diana pueden unirse a microvehículos o nanopartículas en fármacos parenterales como, por ejemplo, partículas finamente dispersadas a base de poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter-uretanos. Las formulaciones parenterales también pueden modificarse como preparaciones de depósito, por ejemplo, basadas en el "principio de unidad múltiple", si los conjugados de resto de unión a diana-toxina de la invención se introducen en forma finamente dispersa, dispersa y suspendida, respectivamente, o como una suspensión de cristales en el medicamento o basadas en el "principio de unidad única" si el conjugado de resto de unión a la diana-toxina de la invención se incluye en una formulación, por ejemplo, en un comprimido o una varilla que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de unidades únicas y unidades múltiples con frecuencia consisten en los denominados polímeros biodegradables como, por ejemplo, poliésteres de ácido láctico y ácido glicólico, poliéter uretanos, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

Son adyuvantes y vehículos añadidos durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas como fármacos parenterales, en particular, *aqua sterilisata* (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor del pH como, por ejemplo, ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, así como sales de los mismos, sustancias tampón para ajustar valores de pH, sustancias para la isotonización como, por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato ácido de sodio, glucosa y fructosa, tensioactivos y agentes tensioactivos, respectivamente, y emulsionantes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween®) o, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®), así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo, gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos como, por ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster hidroxipropílico y éster metílico de ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como, por ejemplo, sulfito de sodio y estabilizadores como, por ejemplo, EDTA.

Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una realización preferida, se añaden agentes espesantes para evitar la sedimentación de los conjugados de resto de unión a diana-toxina de la invención, o tensioactivos y polielectrolitos para garantizar la resuspendibilidad de sedimentos y/o agentes formadores de complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible conseguir complejos del principio activo con diversos polímeros. Son ejemplos de dichos polímeros polietilenglicol, poliestireno, carboximetilcelulosa, Pluronic® o éster de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitol. Los conjugados de restos de unión a diana-toxinas de la invención también pueden incorporarse en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo, con ciclodextrinas. En realizaciones particulares, pueden añadirse agentes dispersantes como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados pueden usarse agentes de armazón como manitol, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una construcción que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; y (b) un resto engarce como se define en las reivindicaciones que porta un grupo reactivo para unir dicha amatoxina a un resto de unión a diana.

En una realización particular, la presente invención se refiere a una construcción que tiene la estructura II



II

5

en donde:

R^2 es S;

R^3 se selecciona entre NHR^5 , $-NH-OR^5$ y OR^5 ;

10 R^4 es H; y

en donde uno de R^5 es $-L-Y$, en donde L es un engarce como se define en las reivindicaciones e Y es un grupo reactivo para unir dicha construcción a un resto de unión a diana.

Ejemplos

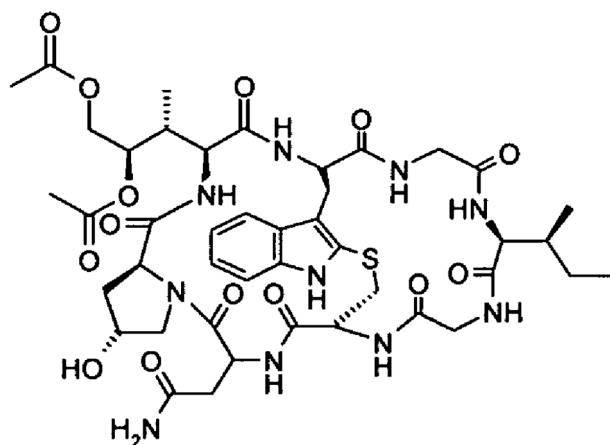
15

A continuación, la invención se explica con más detalle mediante ejemplos no limitantes:

1. Síntesis de la molécula precursora didesoxi sintética K

20

La síntesis de la molécula precursora didesoxi K se describe en el documento WO 2014/009025 en el Ejemplo 5.5.

**K**

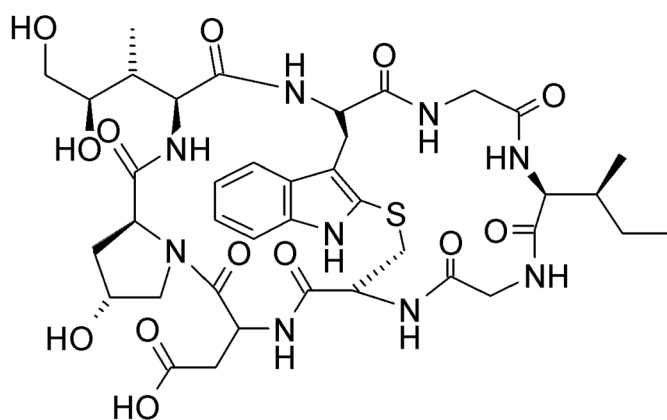
El compuesto **K** puede desprotegerse mediante tratamiento con solución de NH_3 metanólico 7 N (3,0 ml) y agitación durante la noche.

5

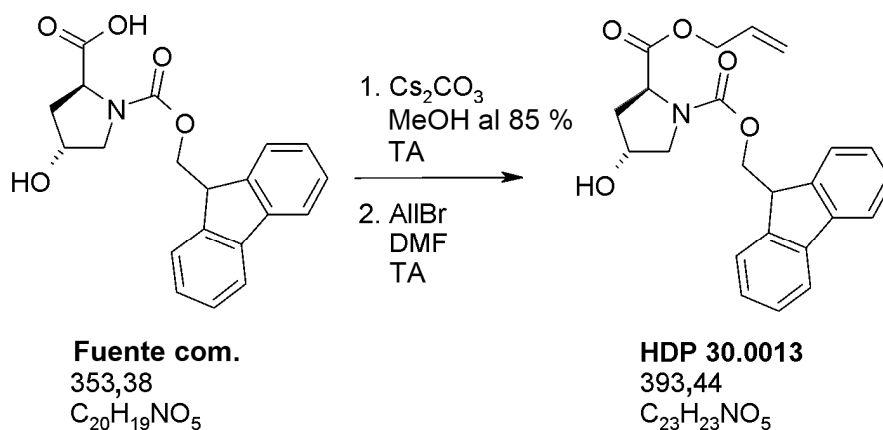
2. Síntesis del precursor dideoxi sintético HDP 30.2105

Se pueden sintetizar moléculas precursoras dideoxi que comprenden un grupo $-\text{COOH}$ en lugar del grupo carboxamida en el aminoácido 1 (**HDP 30.1895**) y se pueden desproteger para dar como resultado **HDP 30.2105**.

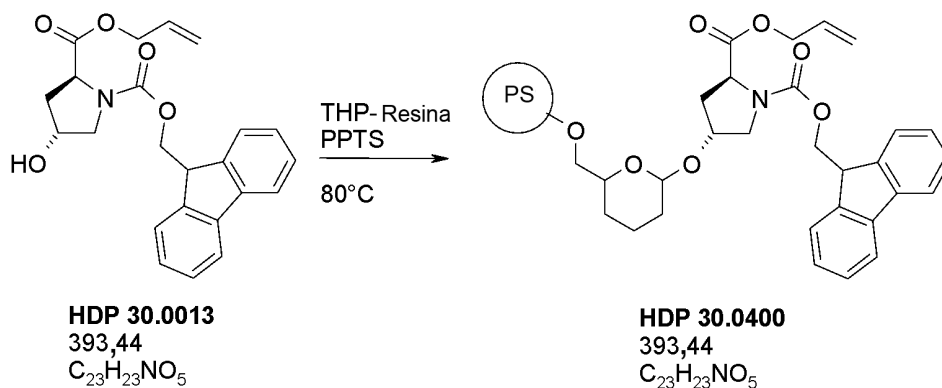
10

**HDP 30.2105**

15

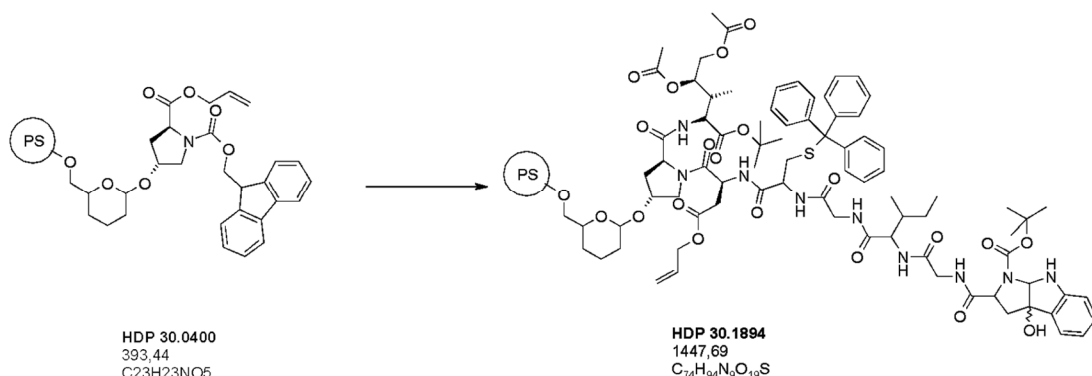
Etapla 1: Éster 1-(9H-fluoren-9-ilmetílico) del éster 2-alílico del ácido 4-hidroxi-pirrolidin-1,2-dicarboxílico (HDP 30.0013)

Se suspendió FmocHypOH (10,0 g, 28,3 mmol) en 100 ml de MeOH al 80 % y se añadió Cs_2CO_3 (4,6 g, 14,1 mmol). La suspensión se agitó a 50 °C durante 30 minutos hasta la disolución completa. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se resolvió en 100 ml de DMF. Se añadió gota a gota bromuro de alilo (1,6 ml, 3,6 g, 29,7 mmol) y la reacción se agitó durante la noche a TA. La DMF se separó por destilación y el residuo se disolvió en terc-butilmetiléter. Los precipitados se filtraron y la solución transparente se absorbió en Celite antes de la cromatografía en columna. El compuesto se purificó sobre 220 g de gel de sílice con un gradiente de n-hexano/acetato de etilo. Rendimiento: 11,5 g, 100 %

Etapla 2: Carga de resina (HDP 30.0400)

Se añadieron **HDP 30.0013** (5,0 g, 14,1 mmol), 4-toluenosulfonato de piridinio (1,33 g, 5,3 mmol) a una suspensión de resina de 1,3-dihidro-2H-piran-2-il-metoximetilo (5,0 g, THP-resina 1,0 mmol/g) en 40 ml de dicloroetano. La reacción se agitó a 80 °C durante la noche. Después de enfriar, la resina se filtró y se lavó exhaustivamente con dicloroetano, dimetilformamida, acetonitrilo, diclorometano y terc-butilmetiléter. La carga fue de 0,62 mmol/g (determinada por espectroscopía UV del grupo fluoreno-metilo después de la desprotección)

Etapas 3: Síntesis del precursor en fase sólida (HDP 30.1894)



Pretratamiento de la resina:

- 5 Se trató **HDP 30.0400** (0,5 g, 0,31 mmol) con ácido N,N-dimetilbarbitúrico (483 mg, 3,1 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (69 mg, 0,06 mmol). La resina se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, la resina se lavó exhaustivamente con diclorometano, N-metil-2-pirrolidona, acetonitrilo, diclorometano y terc-butilmetiléter y se desecó a presión reducida.

- 10 Procedimiento de acoplamiento:

Todos los reactivos y agentes de reacción se disolvieron en diclorometano/N-metil-2-pirrolidona que contenía Triton-X100 al 1 % (Disolvente A).

- 15 Se disolvió **HDP 30.0477** (257 mg, 0,38 mmol) en 3,0 ml de Disolvente A y se trataron con 3,0 ml de una solución de PyBOP 0,2 N (333 mg, 0,63 mmol, 2,0 eq), 3,0 ml de una solución de HOBt 0,2 N (130 mg, 0,63 mmol, 2,0 eq) y 439 μ l de DIEA (4,0 eq). La reacción se calentó hasta 50 °C durante 8 minutos mediante irradiación de microondas (20 W, reactor de microondas CEM) y se lavó con N-metil-2-pirrolidona después del acoplamiento.

- 20 Desprotección:

La desprotección se realizó mediante la adición de 6,0 ml de piperidina al 20 % en N-metil-2-pirrolidona a 50 °C durante 8 minutos. La resina se lavó con N-metil-2-pirrolidona.

- 25 (Nota: sin desprotección después del acoplamiento del aminoácido final)

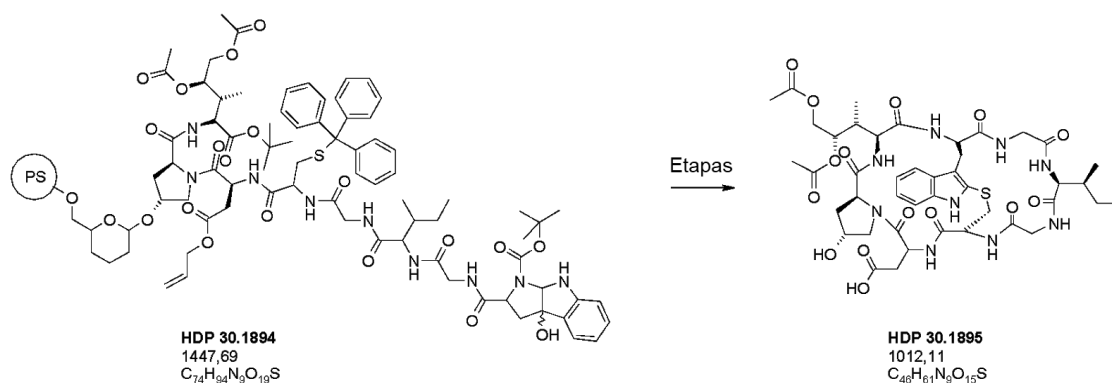
Todos los demás aminoácidos se acoplaron siguiendo el protocolo anterior, los pesos se muestran a continuación:

- 30 0,63 mmol, 498 mg de Fmoc Asp(OAll)OH
0,63 mmol, 738 mg de Fmoc Cys(Tri)OH
0,63 mmol, 375 mg de Fmoc GlyOH
0,63 mmol, 445 mg de Fmoc IleOH
0,63 mmol, 375 mg de Fmoc GlyOH
0,38 mmol, 242 mg de N-Boc-HPIOH (**HDP 30.0079**)

- 35 Se sintetizó éster terc-butílico del ácido 4,5-diacetoxi-2-amino-3-metil-pentanoico; clorhidrato (**HDP 30.0477**) como se describe en el documento WO 2014/009025.

- Se preparó N-Boc-HPIOH (**HDP 30.0079**) de acuerdo con Zanotti, Giancarlo; Birr Christian; Wieland Theodor; *International Journal of Peptide & Protein Research* 18 (1981) 162-8.

Etapa 4: HDP 30.1895



Eliminación de la resina y formación del anillo B

- 5 La resina se agitó con 10 ml de ácido trifluoroacético que contenía triisopropilsilano al 5 % durante 30 minutos y finalmente se eluyó en un matraz de 50 ml. La resina se lavó dos veces con metanol (10 ml cada vez). Los eluidos combinados se concentraron al vacío y se resuspendieron en 2-4 ml de metanol. La solución metanólica se vertió dos veces en 50 ml de éter dietílico frío para la precipitación del péptido. Después de la centrifugación, el precipitado se lavó con dietiléter (2 veces) y se desecó a presión reducida. El precipitado de color blanco se solubilizó en
- 10 aproximadamente 4-5 ml de metanol (0,5 ml por 100 mg) y se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa preparativa. Se purificaron aproximadamente 100 mg de precipitado en bruto por ciclo. Las fracciones se analizaron por espectrometría de masas, se combinaron y el metanol se separó por destilación a presión reducida. La fase acuosa se liofilizó.

- 15 Rendimiento: 24,4 mg, 23,7 μ mol
Espectrometría de masas: $[M+H]^+$, 1030,5

Formación del anillo A

- 20 El producto intermedio liofilizado anterior se disolvió en 25 ml de dimetilformamida y se trató con difenilfosforilazida (63 μ l, 1185 μ mol, 5 eq) y diisopropiletilamina (201 μ l, 1185 μ mol, 5 eq). La reacción se agitó durante la noche (20 horas). La conversión se controló mediante cromatografía de fase inversa y finalmente se inactivó con 100 μ l de agua. La mezcla se concentró a presión reducida y se volvió a disolver en 1-2 ml de metanol. La precipitación del producto se realizó por adición gota a gota a 20 ml de éter dietílico. El precipitado se lavó dos veces con dietiléter y se desecó a presión reducida. La siguiente etapa se realizó sin purificación adicional.
- 25 Espectrometría de masas: $[M+Na]^+$, 1034,6

Desprotección del éster:

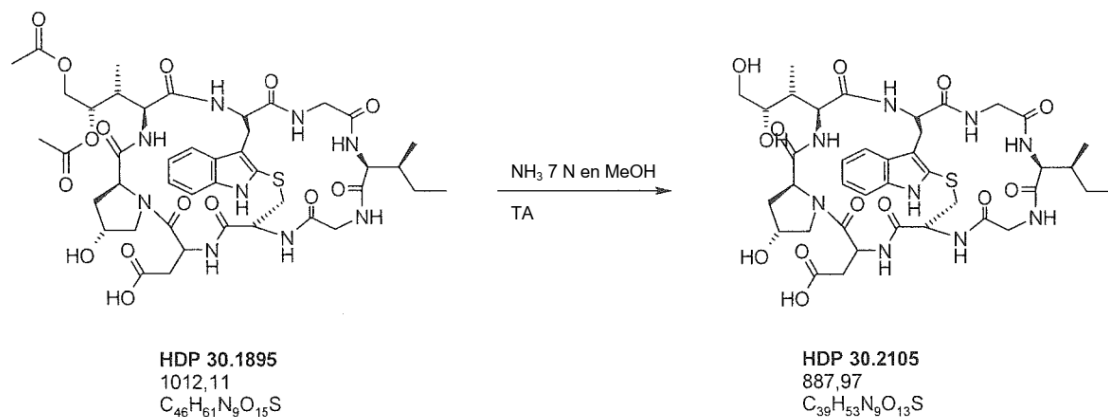
- 30 Al producto de ciclación en bruto, se le añadieron 2,5 ml de diclorometano, ácido dietilbarbitúrico (22,3 mg, 118,5 μ mol) y $Pd(PPh_3)_4$ (27 mg, 23,7 μ mol). La reacción se agitó a TA durante la noche. La reacción puede monitorizarse mediante HPLC-FI. Después de la conversión completa, la mezcla se añadió gota a gota a 20 ml de dietiléter enfriado y el precipitado se lavó dos veces con dietiléter. Después de desecar a presión reducida, el precipitado se disolvió en metanol (1,0 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa preparativa.

- 35 Rendimiento: 15,0 mg

Espectrometría de masas: $[M+H]^+$, 972,3; $[M+Na]^+$, 994,5

40

Etapa 5: HDP 30.2105

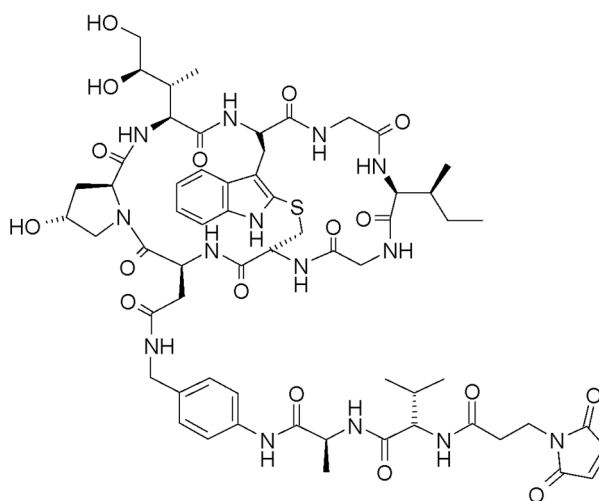


Se disolvió **HDP 30.1895** (15,0 mg, 15,3 μ mol) en solución de NH_3 metanólico 7 N (3,0 ml) y se agitaron durante la noche. La conversión se confirmó mediante espectrometría de masas. Después de la conversión completa, la reacción se concentró al vacío, se suspendió en terc-butanol al 80 % y se liofilizó. El producto se purificó mediante HPLC preparativa.

Rendimiento: 12,1 mg

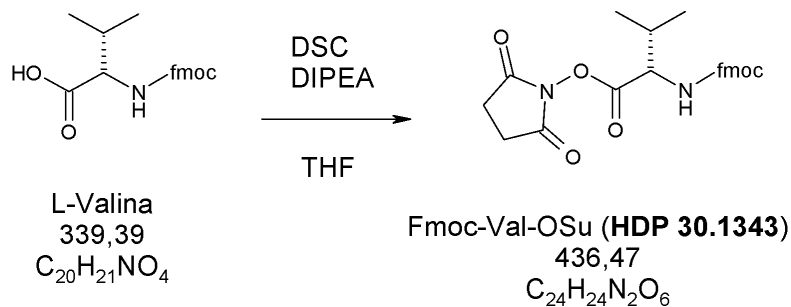
Espectrometría de masas: $[M+H]^+$, 888,0; $[M+Na]^+$, 910,2

3. Síntesis del precursor didesoxi sintético HDP 30.2115



Puede sintetizarse una molécula precursora dideoxy que comprende un grupo reactivo al tiol con un engarce escindible a partir del producto del ejemplo 2 en 7 etapas como se indica a continuación:

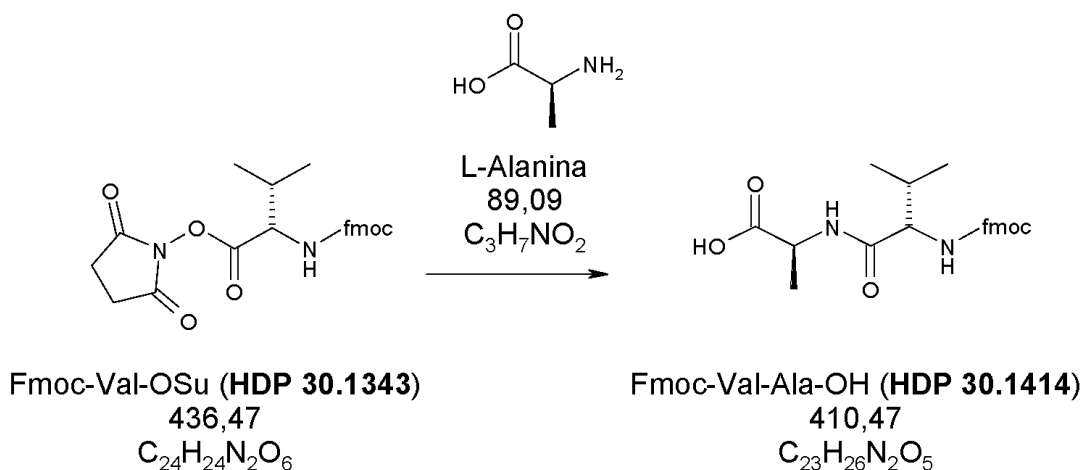
Etapa 1: Fmoc-Val-OSu (HDP 30.1343)



Este compuesto se preparó de acuerdo con R. A. Firestone y col., documento US 6.214.345. Se trataron Fmoc-Val-

OH (20,24 g; 59,64 mmol) y N-hidroxisuccinimida (6,86 g = 1,0 eq.) en tetrahidrofurano (200 ml) a 0 °C con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (12,30 g; 1,0 eq.). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de argón durante 6 horas y después el subproducto sólido de diciclohexilurea (DCU) se separó mediante filtración y se lavó con THF y el disolvente se retiró mediante rotavapor. El residuo se disolvió en 300 ml de diclorometano, se enfrió en un baño de hielo durante 1 hora y se filtró de nuevo para retirar la DCU adicional. El diclorometano se evaporó y la espuma sólida (26,51 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

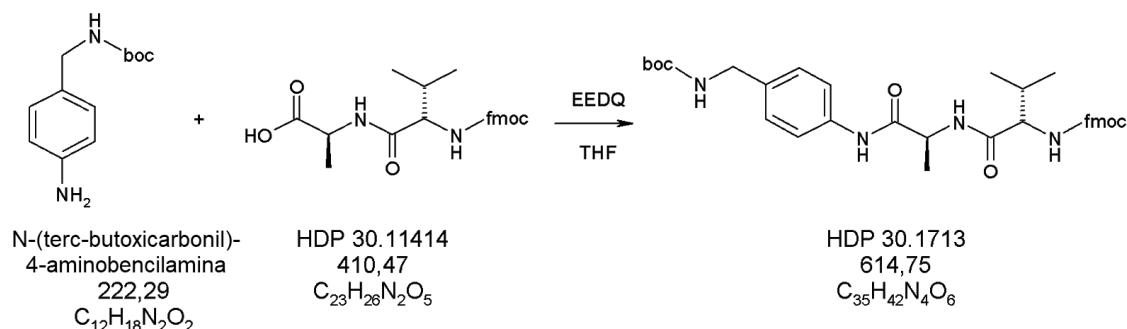
Etapa 2: Fmoc-Val-Ala-OH (HDP 30.1414)



El producto de la etapa 2 se preparó de forma análoga a P. W Howard y col., documento US 2011/0256157. Se preparó una solución de L-alanina (5,58 g; 1,05 eq.) y carbonato ácido de sodio (5,51 g; 1,1 eq.) en 150 ml de agua y se añadió a una solución de **HDP 30.1343** (26,51 g, máximo 59,6 mmol) en 225 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se agitó durante 50 h a TA. Después de consumirse el material de partida, la solución se repartió entre 240 ml de ácido cítrico 0,2 M y 200 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se separó y se extrajo con acetato de etilo (200 ml, 3 veces). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera (300 ml cada uno), se desecaron ($MgSO_4$) y el disolvente se evaporó hasta aproximadamente 200 ml. El producto puro precipitó en este momento y se separó mediante filtración. El licor madre se evaporó a sequedad y el residuo se agitó durante 1 hora con 100 ml de MTBE para dar como resultado material cristalino adicional. Las dos tandas de producto se combinaron para obtener 18,01 g (74 %) de polvo de color blanco. (p.f.: 203-207 °C)

EM (IEN+)	$[M+Na]^+$	encontrado: 410,94;	calc.: 411,19 ($C_{23}H_{27}N_2O_5$)
	$[M+Na]^+$	encontrado: 433,14;	calc.: 433,17 ($C_{23}H_{27}N_2O_5$)
	$[2M+H]^+$	encontrado: 842,70;	calc.: 843,36 ($C_{46}H_{52}N_4NaO_{10}$)

Etapa 3: Fmoc-Val-Ala-PAB-NHBoc (HDP 30.1713)



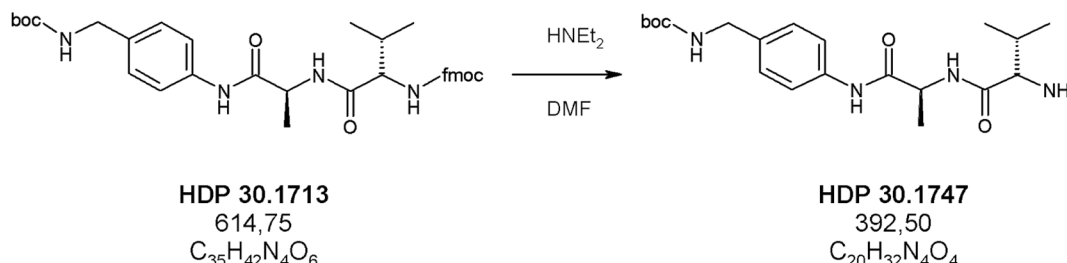
Se disolvieron el producto de la etapa 2 **HDP 30.1414** (1,76 g; 4,28 mmol) y 4-[(N-Boc)aminometil]anilina (1,00 g; 1,05 eq.) en 26 ml de tetrahidrofurano abs. Se añadió 2-etoxi-N-(etoxicarbonil)-1,2-dihidroquinolina (EEDQ 1,11 g; 1,05 eq.) y la mezcla se agitó a TA, protegida de la luz. Con la reacción en curso, se formó una materia gelatinosa a partir de la solución inicialmente transparente. Después de 40 h, la mezcla de reacción se diluyó con 25 ml de terc-butilmetiléter (MTBE) y se agitó durante 1 h. Posteriormente, la precipitación se separó mediante filtración con succión, se lavó con MTBE y se desecó al vacío hasta 2,30 g (rendimiento del 85 %) de un sólido de color blanco.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,87 (s, 1H), 8,11 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,74 (c, $J = 8,4$, 7,9 Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,45-7,23 (m, 7H), 7,17 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 4,44 (p, $J = 7,0$ Hz, 1H), 4,36-4,17

(m, 3H), 3,96-3,89 (m, 1H), 2,01 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,31 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 0,90 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,87 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170,84, 170,76, 156,04, 155,63, 143,77, 143,69, 140,60, 137,41, 134,99, 127,50, 127,26, 126,93, 125,22, 119,95, 118,97, 77,60, 65,62, 59,95, 48,86, 46,62, 42,93, 30,28, 28,16, 19,06, 18,10, 18,03.

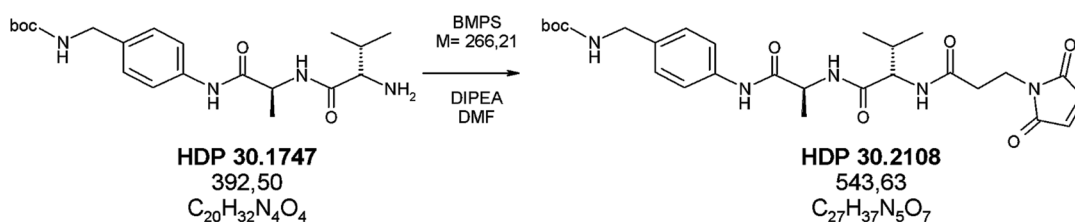
Etapa 4: H-Val-Ala-PAB-NHBoc (HDP 30.1747)



El compuesto de la etapa 3 **HDP 30.1713** (1,230 g, 2,00 mmol) se colocó en un matraz de 100 ml y se disolvió en 40 ml de dimetilformamida (DMF). Se añadió dietilamina (7,5 ml) y la mezcla se agitó a TA. La reacción se monitorizó mediante CCF (cloroformo/metanol/HOAc 90:8:2). Después de consumirse el material de partida (30 minutos), los compuestos volátiles se evaporaron y el residuo se evaporó junto con 40 ml de DMF recién preparada para retirar las trazas de dietilamina. El producto en bruto se usó sin purificación adicional para la siguiente etapa.

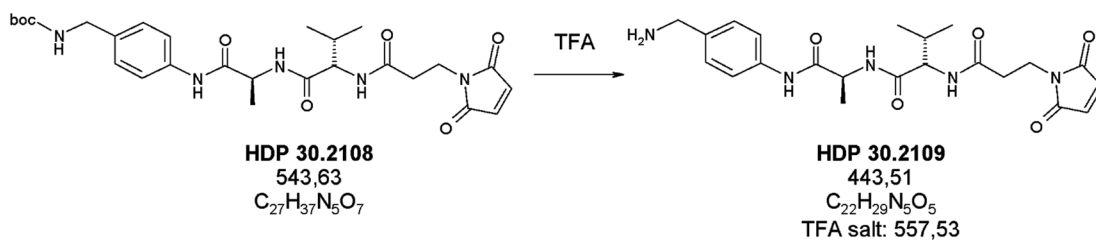
EM (IEN+)	[MH] ⁺	encontrado: 393,26;	calc.: 393,25 ($\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$)
	[M+Na] ⁺	encontrado: 415,35;	calc.: 415,23 ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_4$)
	[2M+H] ⁺	encontrado: 785,37;	calc.: 785,49 ($\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_8\text{O}_8$)

Etapa 5: BMP-Val-Ala-PAB-NHBoc (HDP 30.2108)



El producto en bruto de la etapa 4 **HDP 30.1747** (máximo 2,00 mmol) se disolvió en 40 ml de DMF, se añadieron éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(maleimido)propiónico (BMPS 532 mg, 1,0 eq.) y N-etildisopropilamina (510 μl , 1,5 eq.) y la mezcla se agitó 3 horas a TA. Después del consumo del material de partida **HDP 30.1747** (CCF: cloroformo/metanol/HOAc 90:8:2) los compuestos volátiles se evaporaron y el residuo se agitó con 50 ml de MTBE hasta que se formó una suspensión fina (1 h). El precipitado se separó mediante filtración con succión, se lavó con MTBE y se desecó. El producto en bruto (1,10 g) se disolvió en 20 ml de diclorometano/metanol 1:1, se añadió kieselgur (tierra de diatomeas purificada) (15 g) y los disolventes se extrajeron. El material sólido se colocó sobre una columna de gel de sílice de 80 g y se eluyó con un gradiente lineal de metanol al 0-10 % en diclorometano. Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron a 793 mg (73 % en dos etapas) de un sólido amorfo.

EM (IEN+) [M+Na]⁺ encontrado: 566,24; calc.: 566,26 ($\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{NaO}_7$)
 RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,75 (s, 1H), 8,09 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,98 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,29-7,23 (m, 1H), 7,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,98 (s, 2H), 4,39 (p, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,13 (dd, $J = 8,4$, 6,7 Hz, 1H), 4,06 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H), 3,67-3,56 (m, 2H), 2,49-2,41 (m, 2H), 1,96 (h, $J = 6,8$ Hz, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,30 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 0,86 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,82 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).
 RMN de ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170,80, 170,63, 170,60, 169,72, 155,65, 137,45, 134,94, 134,44, 127,26, 118,95, 77,62, 57,71, 48,92, 42,95, 33,96, 33,64, 30,17, 28,17, 19,02, 18,06, 17,82.

Etapa 6: BMP-Val-Ala-PAB-NH₂ (HDP 30.2109)

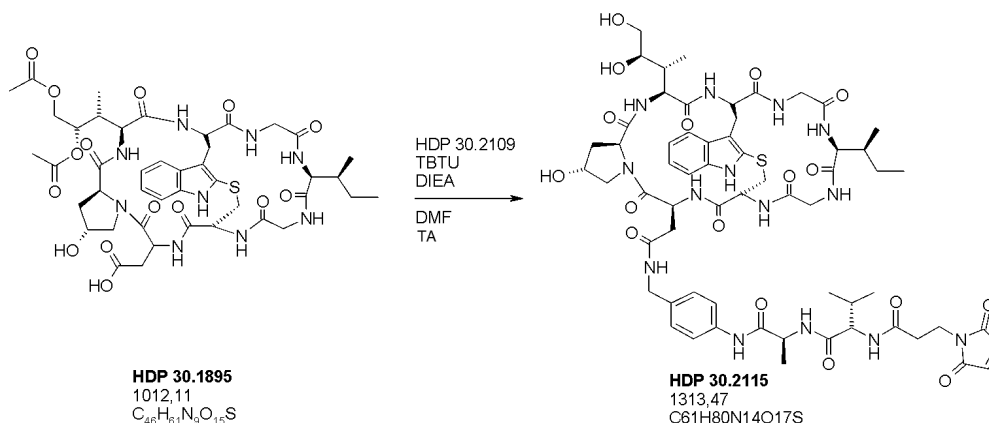
El producto de la etapa 5 **HDP 30.2108** (400 mg, 736 μ mol) se disolvió en 4.000 μ l de ácido trifluoroacético y se agitó durante 2 min. Posteriormente, los compuestos volátiles se evaporaron a TA y los restos se evaporaron conjuntamente dos veces con 4.000 μ l de tolueno. El residuo se disolvió en 5.000 μ l de 1,4-dioxano/agua 4:1, se solidificó en nitrógeno líquido y se liofilizó: 410 mg (cuant.) de polvo incoloro.

EM (IEN+)	[M+Na] ⁺	encontrado: 415,35;	calc.: 466,21 ($C_{22}H_{29}N_5NaO_5$)
	[2M+H] ⁺	encontrado: 887,13;	calc.: 887,44 ($C_{44}H_{59}N_{10}O_{10}$)

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,89 (s, 1H), 8,13 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,66-7,60 (m, 2H), 7,41-7,34 (m, 2H), 6,98 (s, 2H), 4,39 (p, J = 7,1 Hz, 1H), 4,11 (dd, J = 8,2, 6,6 Hz, 1H), 3,97 (c, J = 5,6 Hz, 2H), 3,69-3,58 (m, 2H), 2,49-2,40 (m, 2H), 1,96 (h, J = 6,8 Hz, 1H), 1,32 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,86 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,83 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

RMN de ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 171,24, 170,78, 170,72, 169,85, 158,12 (c, J = 33,2 Hz, TFA), 158,25, 157,99, 157,73, 139,19, 134,53, 129,45, 128,52, 119,02, 116,57 (c, J = 296,7 Hz, TFA), 57,78, 49,08, 41,90, 34,00, 33,68, 30,21, 19,07, 18,16, 17,76.

Etapa 6: HDP 30.2115



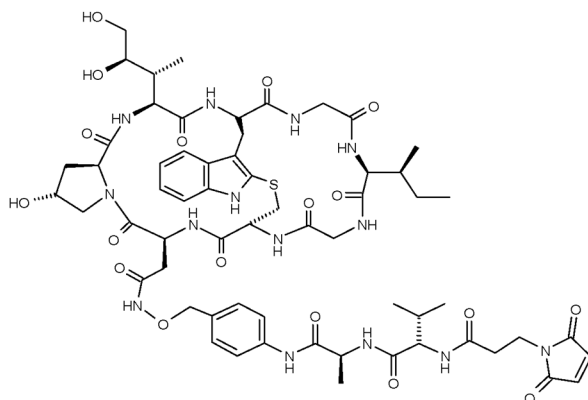
Se trató **HDP 30.2105** (15,0 mg, 16,5 μ mol) con 429 μ l de una solución 0,1 M de **HDP 30.2109** (25,2 μ mol, 1,5 eq), 492 μ l de TBTU 0,1 M (25,2 μ mol, 1,5 eq) y 492 μ l de DIEA 0,2 M (49,1 μ mol, 3,0 eq) a TA. La reacción se monitorizó mediante HPLC-FI. Después de completarse, la reacción se inactivó con 100 μ l de H₂O agitada durante 15 minutos y se inyectó en una HPLC-FI preparativa.

Rendimiento: 12,2 mg, 56 %

Espectrometría de masas: 1313,2 [M+H]⁺, 1335,5 [M+Na]⁺

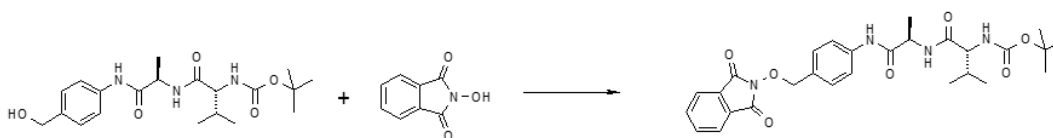
4. Síntesis de precursor dideoxi sintético HDP 2179

4.1 Síntesis de HDP 30.2179



HDP 30.2179

5 4.2 Síntesis de HDP 30.2007



HDP 30.1680

HDP 30.2007

Se disolvieron 770,0 mg (1,96 mmol) de **HDP 30.1960**, preparado de acuerdo con el documento EP 15 000 681.5, 319,2 mg (1,96 mmol) de N-hidroxifthalimida y 513,3 (1,96 mmol) de trifenilfosfina en 40 ml de tetrahidrofurano seco. En atmósfera de argón se añadieron 889,2 μ l (1,96 mmol) de una solución de diazocarbóxilato de etilo en tolueno (40 %) durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a TA y se evaporó a sequedad. El residuo sólido se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de CHCl_3 a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (30/1) como eluyente. Se obtuvo **HDP 30.2007** en bruto en forma de un sólido de color amarillo. El producto en bruto se purificó adicionalmente en una columna de gel de sílice con un gradiente de n-hexano a n-hexano/acetato de etilo/metanol (10/10/1) como eluyente. Se obtuvo **HDP 30.2007** en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 270,0 mg (22 %).

EM (IEN+) encontrado: 561,14 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc.: 561,24 ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_7$)
 EM (IEN+) encontrado: 1,099,70 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc.: 1099,48 ($\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{N}_8\text{NaO}_{14}$)

4.3 Síntesis de HDP 30.2011



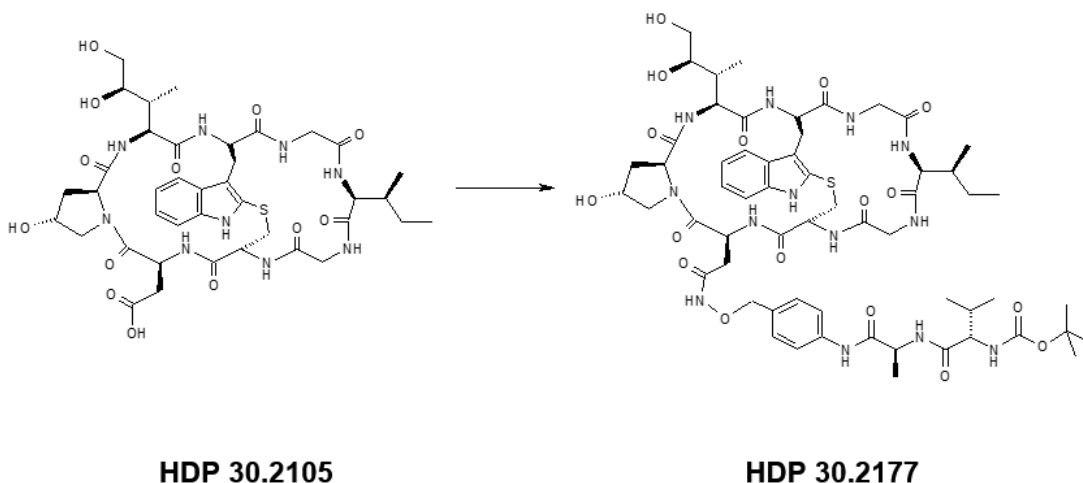
HDP 30.2007

HDP 30.2011

Se suspendieron 270,0 mg (0,50 mmol) de **HDP 30.2007** en 16 ml de diclorometano. En atmósfera de argón, se añadieron 50,3 μ l (1,04 mmol) de hidrato de hidrazina de una vez y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h en atmósfera de argón y a TA. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con diclorometano. Los filtrados se evaporaron y el residuo se desecó a alto vacío. Se obtuvo **HDP 30.2011** en forma de un sólido de color blanco y se usó para las siguientes etapas sin purificación adicional. Rendimiento: 199,0 mg (97 %).

EM (IEN+) encontrado: 431,50 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc.: 431,24 ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_5$)

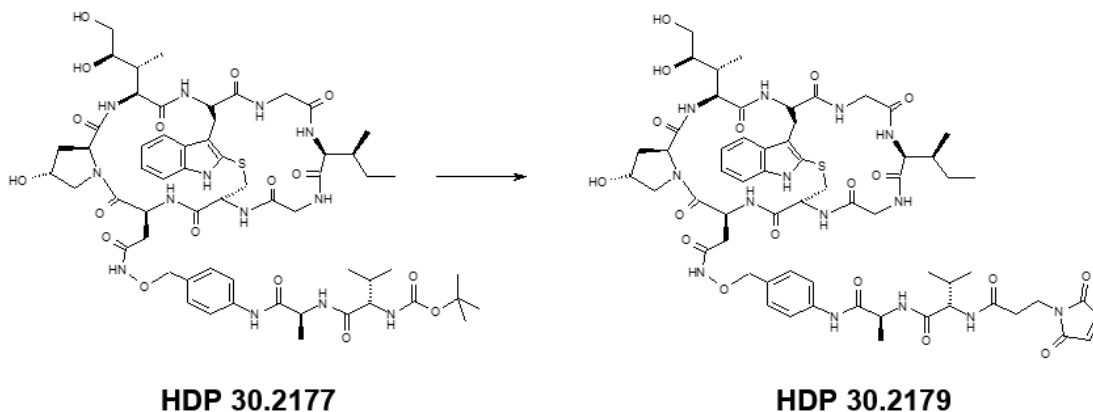
4.4 Síntesis de HDP 30.2177



Se disolvieron 20,59 mg (23,17 μmol) de **HDP 30.2105** en 1.200 ml de dimetilformamida seca (DMF). La solución se purgó con argón y se trató con 18,85 mg (46,10 μmol) de **HDP 30.2011** disuelto en dimetilformamida seca (DMF), 24,05 mg (46,10 μmol) de PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) disuelto en 450 ml de dimetilformamida seca (DMF) y 86,20 μl (82,30 mmol) de solución de N-etil-diisopropilamina (DIPEA) en DMF (100 μl de DIPEA disuelto en 500 μl de DMF). La mezcla de reacción se agitó a TA en atmósfera de argón. Después de 5 h, el volumen de reacción se diluyó con metil-t-butiléter frío (MTBE). El precipitado de color blanco se centrifugó y se lavó con MTBE frío. El sólido en bruto se purificó por HPLC FI18 (LunaTM 10 μ , 250x21 mm, Phenomenex®, 290 nm) con un gradiente de H₂O al 95 %/MeOH al 5 % a MeOH al 95 %/H₂O al 5 % y un caudal de 15 ml/min. La fracción de producto a 17,5 minutos se recogió, se evaporó y se liofilizó en agua hasta 13,84 mg (47 %) de **HDP 30.2177** en forma de un sólido amorfo de color blanco.

15	EM (IEN+) encontrado: 1278,45 [MH] ⁺ ; calc.: 1277,58 (C ₅₉ H ₈₃ N ₁₃ O ₁₇ S)
	EM (IEN+) encontrado: 1.300,84 [M+Na] ⁺ ; calc.: 1300,58 (C ₅₉ H ₈₃ N ₁₃ NaO ₁₇ S)

4.5 Síntesis de HDP 30.2179



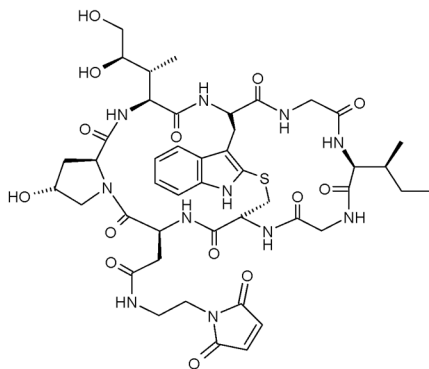
Se disolvieron 13,84 mg (10,82 μmol) de **HDP 30.2177** en 2.000 μl de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 5 minutos a TA. El exceso de TFA se retiró con un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 33 °C y el residuo restante se trató con 5 ml de metanol y se evaporó a sequedad. El residuo oleoso se desecó a alto vacío, formando un sólido de color blanco. El sólido se disolvió en 1.700 μl de dimetilformamida seca (DMF) y se trató con 5,77 mg (21,67 μmol) de N-succinimidil-3-maleimidopropionato (BMPS). Se añadieron 75,40 μl de solución de DIPEA (50 μl de DIPEA disueltos en 450 μl de DMF seco). La mezcla de reacción se agitó en argón durante 5 h y se trató con 20 ml de MTBE frío. El precipitado se centrifugó, se lavó con MTBE frío y se desecó. El producto en bruto se purificó por HPLC FI18 (LunaTM 10 μ , 250 x 21 mm, Phenomenex®, 290 nm) con un gradiente de H₂O al 95 %/MeOH al 5 % a MeOH al 95 %/H₂O al 5 % y un caudal de 15 ml/min. La fracción de producto a 14,5 minutos se recogió, se evaporó y se liofilizó en agua para producir 7,40 mg (51 %) de **HDP 30.2179** en forma de un sólido amorfo de color blanco.

30	EM (IEN+) encontrado: 1351,50 [M+Na] ⁺ ; calc.: 1351,55 (C ₆₁ H ₈₀ N ₁₄ NaO ₁₈ S)
----	--

Además, puede sintetizarse una molécula precursora didesoxi alternativa que comprende un grupo -CO-NHOH en lugar del grupo carboxamida en el aminoácido 1, por ejemplo, haciendo reaccionar el precursor de carboxilato **HDP**

30.2105 con O-bencil-hidroxilamina en condiciones de condensación convencionales (PyBOP, DCC, anhídrido mixto, etc.). El grupo bencílico del derivado de ácido O-bencil-hidroxiámico obtenido de este modo de **HDP 30.2105** puede retirarse fácilmente en condiciones catalíticas de hidrógeno (Pd/H₂), formando el grupo -CO-NHOH libre. Esta función de ácido hidroxiámico puede alquilarse a -CO-NHOR con diferentes componentes básicos de alquil-engarce halogenado u O-tosilado. Esta alquilación tiene lugar en condiciones básicas con LiOH, NaOH, KO-t-Bu u otras bases adecuadas.

5. Síntesis del precursor didesoxi sintético HDP 30.2191



Puede sintetizarse una molécula precursora didesoxi que comprende un grupo reactivo al tiol con un engarce estable a partir del producto del ejemplo 2 como se indica a continuación:

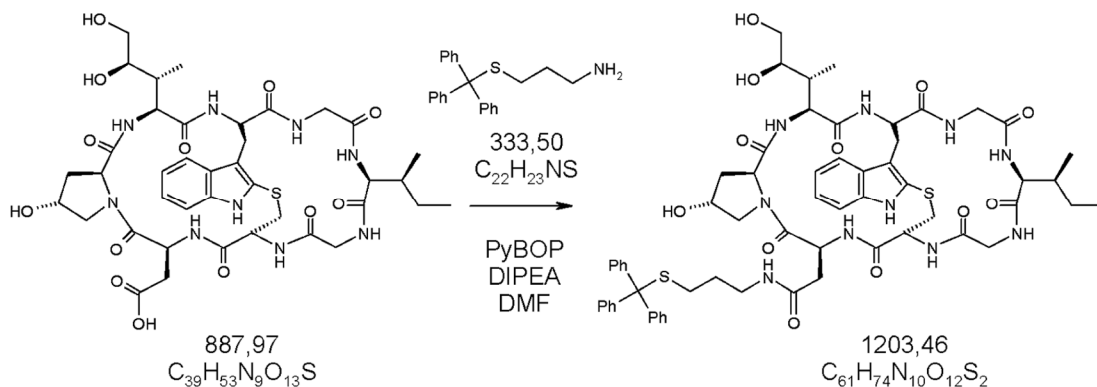
Se disolvió producto del ejemplo 2 (**HDP 30.2105**), 11,00 mg (12,39 μ mol) en 123,9 μ l de DMF seca. Posteriormente, se añadieron soluciones 1 M de N-hidroxisuccinimida y diisopropilcarbodiimida en DMF (123,9 μ l, 10 eq. cada una). Después de 1 h a TA, se añadió una solución 1 M de sal trifluoroacetato de N-(2-aminoetil)maleimida en DMF y la mezcla de reacción se agitó durante 4 h adicionales. Después, la mezcla de reacción se vertió gota a gota en 10 ml de MTBE a 0 °C. El precipitado resultante se recogió por centrifugación y se lavó con 10 ml adicionales de MTBE. El residuo se purificó por HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente de metanol al 5-100 %. El producto que contenía fracciones se evaporó y se liofilizó en t-butanol/agua para dar como resultado 9,27 mg (54 %) del compuesto del título en forma de polvo incoloro.

EM (IEN+)	[MH] ⁺ encontrado: 1010,3;	calc.: 1010,4 (C ₄₅ H ₆₀ N ₁₁ O ₁₄ S)
	[M+Na] ⁺ encontrado: 1032,5;	calc.: 1032,39 (C ₄₅ H ₅₉ N ₁₁ NaO ₁₄ S)

6. Síntesis de precursor didesoxi sintético HDP 30.2157

Puede sintetizarse una molécula precursora didesoxi que comprende un grupo reactivo al tiol con engarce reducible a partir del producto del ejemplo 2 como se indica a continuación:

Etapas 1:



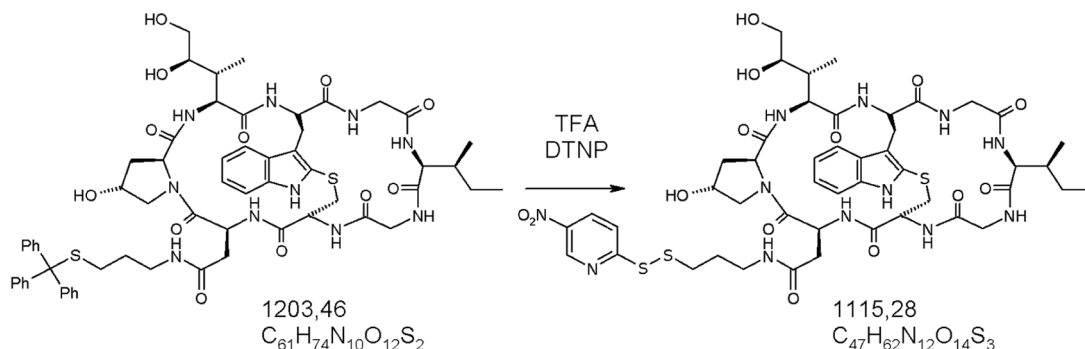
Se disolvió producto del ejemplo 2 (**HDP 30.2105**), 11,36 mg (12,97 μ mol) en 512 μ l de DMF seca. Posteriormente, se añadieron soluciones 0,1 M de PyBOP en DMF (512 μ l, 4 eq.) y 8,70 μ l (4 eq.) de DIPEA. Después de 1 minuto, se añadió una solución 0,1 M de 3-[(trifenilmetil)sulfanyl]propan-1-amina en diclorometano y la mezcla de reacción se agitó durante 3,5 horas adicionales. Después, la mezcla de reacción se vertió gota a gota en 10 ml de MTBE a 0 °C. El precipitado resultante se recogió por centrifugación y se lavó con 10 ml adicionales de MTBE. El residuo se purificó

por HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente de metanol al 5-100 %. El producto que contenía fracciones se evaporó y se liofilizó a partir de t-butanol/agua 4:1 para dar como resultado 9,52 mg (62 %) de producto en forma de un sólido amorfo.

EM (IEN+) [M+Na]⁺ encontrado: 1225,30; calc.: 1225,48 (C₆₁H₇₄N₁₀NaO₁₂S₂)

5

Etapla 2:



- 10 Al producto de la etapa 1 (9,52 mg, 7,91 μ mol) se le añadió una solución 0,5 M de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina), DTNP en ácido trifluoroacético (79,1 μ l, 5 eq.). Después de 4 minutos, la mezcla de reacción se precipitó en 10 ml de MTBE a 0 °C. Los sólidos resultantes se recogieron por centrifugación y se lavaron con 10 ml adicionales de MTBE. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa en una columna C18 con un gradiente de metanol al 5-100 % con TFA al 0,05. La fracción pura se evaporó y el residuo se liofilizó en 2 ml de t-butanol/agua 4:1 para proporcionar
- 15 7,48 mg (85 %) de **HDP 30.2157** en forma de un polvo ligeramente amarillento.
EM (IEN+) 1146,97 [M+H]⁺, 1169,17 [M+Na]⁺

7. Síntesis del conjugado chiBCE19-D265C-30.2115

- 20 Conjugación de **HDP 30.2115** con 10 mg de chiBCE19-D265C

Su usaron 10 mg de Thiomab chiBCE19-D265C en tampón PBS para la conjugación con **HDP 30.2115**.

Ajuste de la solución de anticuerpo a EDTA 1 mM:

- 25 2 ml de solución de anticuerpo (10,0 mg) + 20 μ l de EDTA 100 mM, pH 8,0
Anticuerpo total: 10 mg = $6,8 \times 10^{-8}$ mol

Desprotección de cisteínas por reacción de anticuerpo con 40 eq. de TCEP:

- 30 - 2 ml de solución de anticuerpo ($6,8 \times 10^{-8}$ mol) + 54,5 μ l de solución de TCEP 50 mM ($2,72 \times 10^{-6}$ mol).
- Se incubó durante 3 horas a 37 °C en un agitador.
- Dos diálisis consecutivas a 4 °C en 2,0 l de PBS x1, EDTA 1 mM, pH 7,4 en un Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM, primera diálisis aproximadamente 4 h, segunda diálisis durante la noche
- Se concentró hasta aproximadamente 4,0 ml usando filtros Ultra Centrifugal de Amicon 50.000 LPM.

35

Oxidación por reacción de anticuerpo con 20 eq. de ácido deshidroascórbico (dhAA):

- aproximadamente 2 ml de solución de anticuerpo ($6,8 \times 10^{-8}$ mol) + 27,2 μ l de solución de dhAA 50 mM recién preparada ($1,36 \times 10^{-6}$ mol).
40 - Se incubó durante 3 horas a TA en un agitador.

Conjugación con amanitina usando 6 eq. de **HDP 30.2115** e interrupción con 25 eq. de N-acetil-L-cisteína:

Se solubilizaron 0,7 mg de **HDP 30.2115** en 70 μ l DMSO = 10 μ g/ μ l

- 45 - aproximadamente 2 ml de solución de anticuerpo (= 9,5 mg, $6,46 \times 10^{-8}$ mol) + 50,9 μ l de **HDP 30.2115** (= 509 μ g, $3,88 \times 10^{-7}$ mol).
- Se incubó 1 hora a TA.
- Se interrumpió mediante la adición de 16 μ l de N-acetil-L-cisteína 100 mM ($1,62 \times 10^{-6}$ mol).
- Se incubó 15 minutos a TA (o durante la noche a 4 °C).
50 - Se purificó cada mezcla de reacción con columnas PD-10 equilibradas con 1 x PBS, pH 7,4. Se identificaron las fracciones que contenían proteínas con el reactivo de Bradford en parafilm y se juntaron las fracciones que contenían proteínas.
- Diálisis de cada solución de anticuerpo a 4 °C durante la noche en 2,0 l de PBS, pH 7,4 y casetes de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM.

Determinación de la concentración de proteína y la proporción de fármaco-anticuerpo (RFA) mediante espectros UV (absorción a 280 nm y 310 nm) usando anticuerpo desnudo frente a CAF ajustado a concentraciones idénticas de proteína.

Se ajustó la concentración de proteína a 5,0 mg/ml ($3,4 \times 10^{-5}$ M) y se llevó a condiciones estériles mediante filtración. Se almacenó a 4 °C.

8. Síntesis del conjugado chiBCE19-D265C-30.2179

Conjugación de **HDP 30.2179** con 10 mg de chiBCE19-D265C

Su usaron 10 mg de Thiomab chiBCE19-D265C en tampón PBS para la conjugación con **HDP 30.2179**.

Ajuste de la solución de anticuerpo a EDTA 1 mM:

2 ml de solución de anticuerpo (10,0 mg) + 20 µl de EDTA 100 mM, pH 8,0
Anticuerpo total: 10 mg = $6,8 \times 10^{-8}$ mol

Desprotección de cisteínas por reacción de anticuerpo con 40 eq. de TCEP:

- 2 ml de solución de anticuerpo ($6,8 \times 10^{-8}$ mol) + 54,5 µl de solución de TCEP 50 mM ($2,72 \times 10^{-6}$ mol).
- Se incubó durante 3 horas a 37 °C en un agitador.
- Dos diálisis consecutivas a 4 °C en 2,0 l de PBS x1, EDTA 1 mM, pH 7,4 en un Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM, primera diálisis aproximadamente 4 h, segunda diálisis durante la noche
- Se concentró a aproximadamente 4,0 ml usando filtros Ultra Centrifugal de Amicon 50.000 LPM.

Oxidación por reacción de anticuerpo con 20 eq. de ácido deshidroascórbico (dhAA):

- aproximadamente 2 ml de solución de anticuerpo ($6,8 \times 10^{-8}$ mol) + 27,2 µl de solución de dhAA 50 mM recién preparada ($1,36 \times 10^{-6}$ mol).
- Se incubó durante 3 horas a TA en un agitador.

Conjugación con amanitina usando 6 eq. de **HDP 30.2179** e interrupción con 25 eq. de N-acetil-L-cisteína:

Se solubilizaron 0,7 mg de **HDP 30.2179** en 70 µl DMSO = 10 µg/µl

- aproximadamente 2 ml de solución de anticuerpo (= 9,5 mg, $6,46 \times 10^{-8}$ mol) + 51,5 µl de **HDP 30.2179** (= 515 µg, $3,88 \times 10^{-7}$ mol).
- Se incubó 1 hora a TA.
- Se interrumpió mediante la adición de 16 µl de N-acetil-L-cisteína 100 mM ($1,62 \times 10^{-6}$ mol).
- Se incubó 15 minutos a TA (o durante la noche a 4 °C).
- Se purificó cada mezcla de reacción con columnas PD-10 equilibradas con 1 x PBS, pH 7,4. Se identificaron las fracciones que contenían proteínas con el reactivo de Bradford en parafilm y se juntaron las fracciones que contenían proteínas.
- Diálisis de cada solución de anticuerpo a 4 °C durante la noche en 2,0 l de PBS, pH 7,4 y casetes de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM.

Determinación de la concentración de proteína y la proporción de fármaco-anticuerpo (RFA) mediante espectros UV (absorción a 280 nm y 310 nm) usando anticuerpo desnudo frente a CAF ajustado a concentraciones idénticas de proteína.

Se ajustó la concentración de proteína a 5,0 mg/ml ($3,4 \times 10^{-5}$ M) y se llevó a condiciones estériles mediante filtración. Se almacenó a 4 °C.

9. Conjugación de HDP 30.2115 con 30 mg de DIG-D265C

Se usaron 30 mg de anticuerpo genomodificado con cisteína en PBS a 5,0 mg/ml para la conjugación con **HDP 30.2115**

- Ajustar la solución de anticuerpo a EDTA 1 mM:
- 6 ml de solución de anticuerpo (30 mg) + 60 µl de EDTA 100 mM, pH 8,0
Anticuerpo total: $2,05 \times 10^{-7}$ mol

Desprotección de cisteínas mediante reacción de anticuerpo con 40 eq. de TCEP:

- 6 ml de solución de anticuerpo ($2,05 \times 10^{-7}$ mol) + 164 µl de solución de TCEP 50 mM ($8,21 \times 10^{-6}$ mol).

- Se incubó durante 3 horas a 37 °C.
- Se purificó cada anticuerpo de TCEP mediante dos diálisis consecutivas a 4 °C en 2,0 l de PBS x1, EDTA 1 mM, pH 7,4 en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM, primera diálisis aproximadamente 4 h, segunda diálisis durante la noche.

5

Oxidación por reacción de anticuerpo con 20 eq. de ácido deshidroascórbico (dhAA):

- aproximadamente 6 ml de solución de anticuerpo ($2,05 \times 10^{-7}$ mol) + 82 µl de solución de dhAA 50 mM recién preparada ($4,1 \times 10^{-6}$ mol).

- 10 - Se incubó durante 3 horas a TA.

Conjugación con amanitina usando 6 eq. **HDP 30.2115** e interrupción con 25 eq. de N-acetil-L-cisteína:

Se solubilizaron 2,0 mg de **HDP 30.2115** en 200 µl de DMSO = 10 µg/µl

- 15 - aproximadamente 6 ml de solución de anticuerpo (= aproximadamente 29 mg; $1,98 \times 10^{-7}$ mol) + 156 µl de **HDP 30.2115** (= 1563 g, $1,19 \times 10^{-6}$ mol).

- Se incubó durante 1 hora a TA.

- Se interrumpió mediante la adición de 49,6 µl de N-acetil-L-cisteína 100 mM ($4,96 \times 10^{-6}$ mol).

- Se incubó 15 minutos a TA (o durante la noche a 4 °C).

- 20 - Se centrifugó a velocidad máxima durante aproximadamente 3 minutos, se tomó el sobrenadante y se midió el volumen exactamente para la FPLC preparativa.

- Se purificó cada mezcla de reacción mediante FPLC preparativa (ÅKTA) usando HiLoad 16/600-Superdex 200 pg y una columna XK-16, equilibrada con 1 x PBS, pH 7,4 (1,0 ml/min); se recogieron fracciones por absorción UV a 280 nm.

- 25 - Diálisis de la solución de anticuerpo a 4 °C durante la noche en 1 x 3,0 l de PBS, pH 7,4 y casetes de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 LPM.

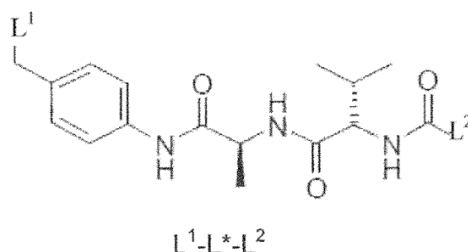
Determinación de la concentración de proteína usando anticuerpo desnudo frente a CAF ajustado a concentraciones idénticas de proteína.

30

Se ajustó la concentración de proteína a 5,0 mg/ml (= $3,42 \times 10^{-5}$ M) y se llevó a condiciones estériles mediante filtración. Se almacenó a 4 °C.

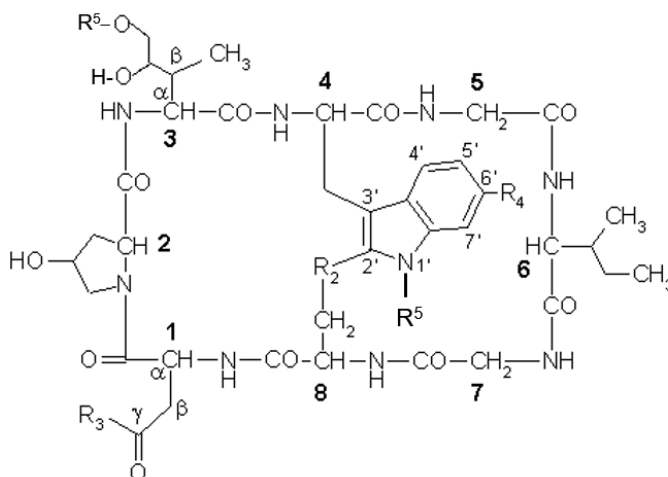
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi; y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; (b) un resto de unión a diana; y (c) un engarce que une dicha amatoxina y dicho resto de unión a diana, en donde dicho engarce es un engarce escindible enzimáticamente y/o un engarce que comprende la estructura



- 10 en donde L^1 es una parte del engarce que conecta L^* con la amatoxina, y L^2 es una parte del engarce que conecta L^* con el resto de unión a diana.

2. El conjugado de la reivindicación 1 que tiene la estructura I



I

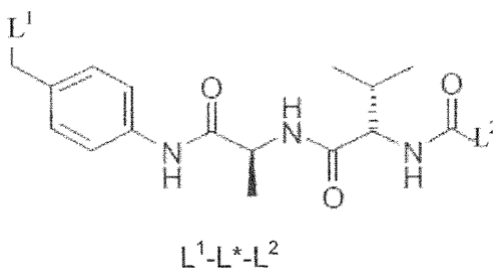
en donde:

R^2 es S;

R^3 se selecciona entre $-NHR^5$, $-NH-OR^5$ y $-OR^5$;

R^4 es H; y

en donde uno de R^5 es $-L_n-X$, en donde L es un engarce que es un engarce escindible enzimáticamente y/o un engarce que comprende la estructura



en donde L^1 es una parte del engarce que conecta L^* con la amatoxina, y L^2 es una parte del engarce que conecta L^* con el resto de unión a diana;

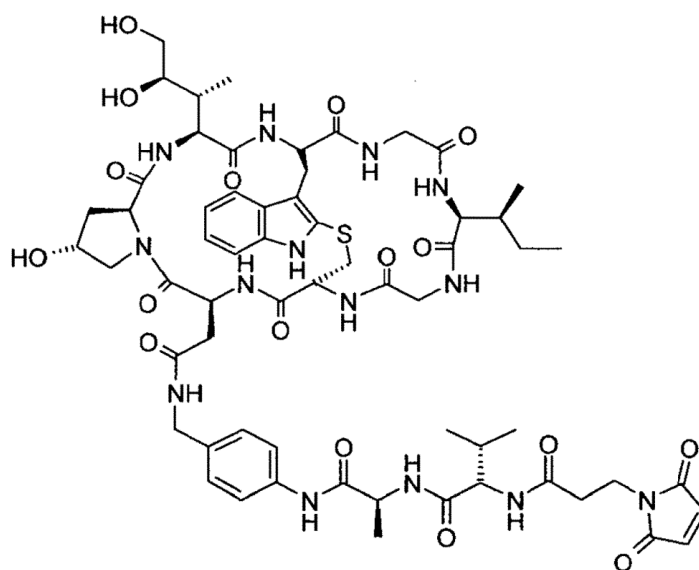
n se selecciona entre 0 y 1, y X es un resto de unión a diana, y en donde los R^5 restantes son H.

3. El conjugado de la reivindicación 2, en donde R^3 se selecciona entre $-NH-L_n-X$, $-NH-O-L_n-X$ y $-O-L_n-X$.

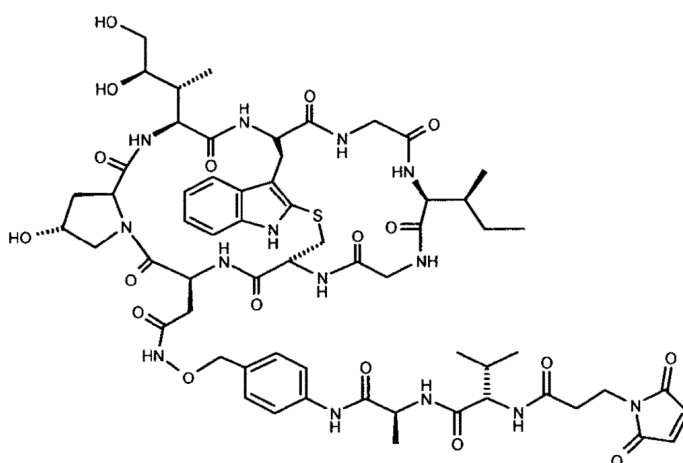
4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho engarce escindible enzimáticamente comprende un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Phe-Lys, Val-Lys, Phe-Ala, Val-Ala, Phe-Cit y Val-Cit.

5. El conjugado de la reivindicación 4, en donde dicho engarce escindible enzimáticamente comprende además un espaciador p-aminobencilo (PAB) entre dicho dipéptido y dicha amatoxina.

6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho resto de unión a diana está unido a una construcción seleccionada entre las construcciones HDP 30.2115 y HDP 30.2179



HDP 30.2115



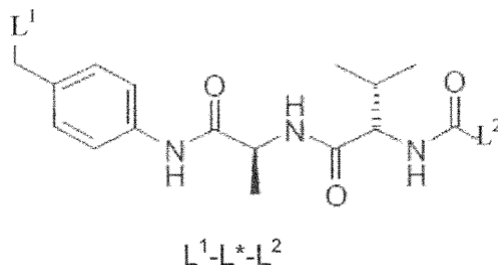
HDP 30.2179.

7. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

9. Una construcción que comprende (a) una amatoxina que comprende (i) un aminoácido 4 con una posición 6'-desoxi;

y (ii) un aminoácido 8 con una posición S-desoxi; y (b) un resto de engarce que porta un grupo reactivo para unir dicha amatoxina a un resto de unión a diana, en donde dicho resto de engarce es un resto de engarce escindible enzimáticamente y/o un resto de engarce que comprende la estructura.



5

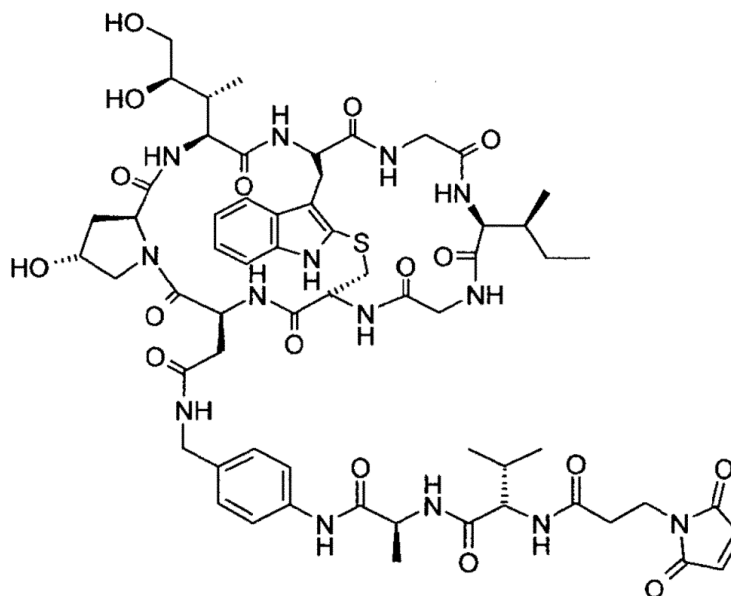
en donde L^1 es una parte del resto de engarce que conecta L^* con la amatoxina, y L^2 es una parte del resto de engarce que comprende el grupo reactivo.

10 10. La construcción de la reivindicación 9, en donde dicho grupo reactivo es un grupo reactivo al tiol.

11. La construcción de la reivindicación 10, en donde dicho grupo reactivo al tiol se selecciona entre bromoacetamida, yodoacetamida, maleimida, una maleimida que tiene un grupo saliente en la posición 3, una 1,2-dihidropiridazin-3,6-diona que tiene un grupo saliente en la posición 4, metilsulfonil-benzotiazol metilsulfonil-feniltetrazol, metilsulfonil-feniloxadiazol, un 3-arylpropionitrilo, 5-nitro-piridin-2-il-disulfuro, una maleimida que tiene dos grupos salientes en las posiciones 3 y 4, una 1,2-dihidropiridazin-3,6-diona que tiene dos grupos salientes en las posiciones 4 y 5.

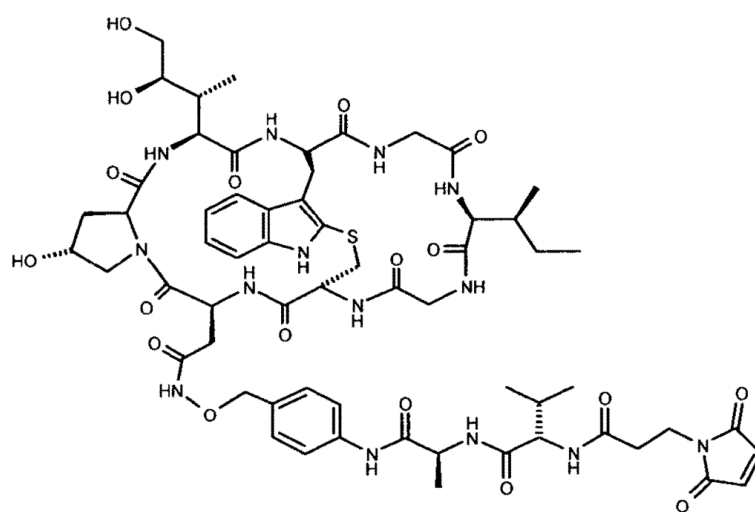
15

12. La construcción de la reivindicación 11, que se selecciona entre las construcciones HDP 30.2115 y HDP 30.2179



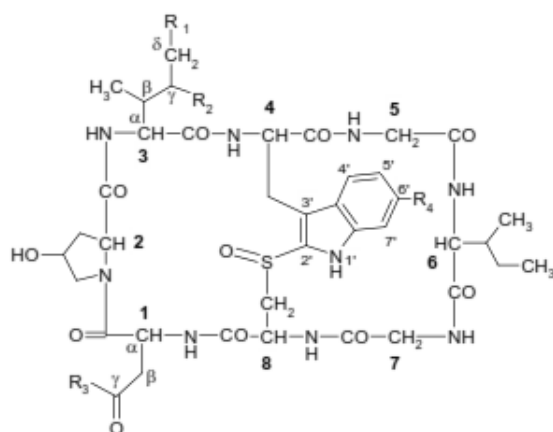
HDP 30.2115

20



HDP 30.2179.

FIGURA 1



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-amanitina	OH	OH	NH ₂	OH
β-amanitina	OH	OH	OH	OH
γ-amanitina	H	OH	NH ₂	OH
ε-amanitina	H	OH	OH	OH
amanina	OH	OH	OH	H
amaninamida	OH	OH	NH ₂	H
amanulina	H	H	NH ₂	OH
ácido amanulínico	H	H	OH	OH
γ-amanina	H	OH	OH	H
γ-amaninamida	H	OH	NH ₂	H

FIGURA 2

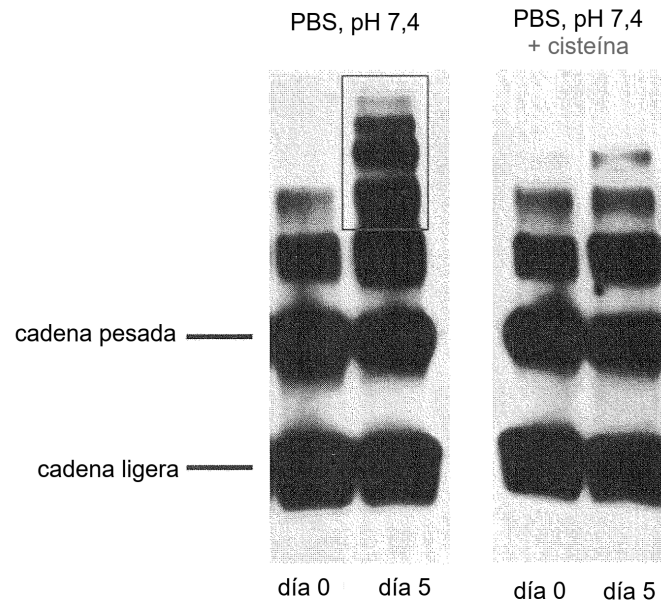


FIGURA 3

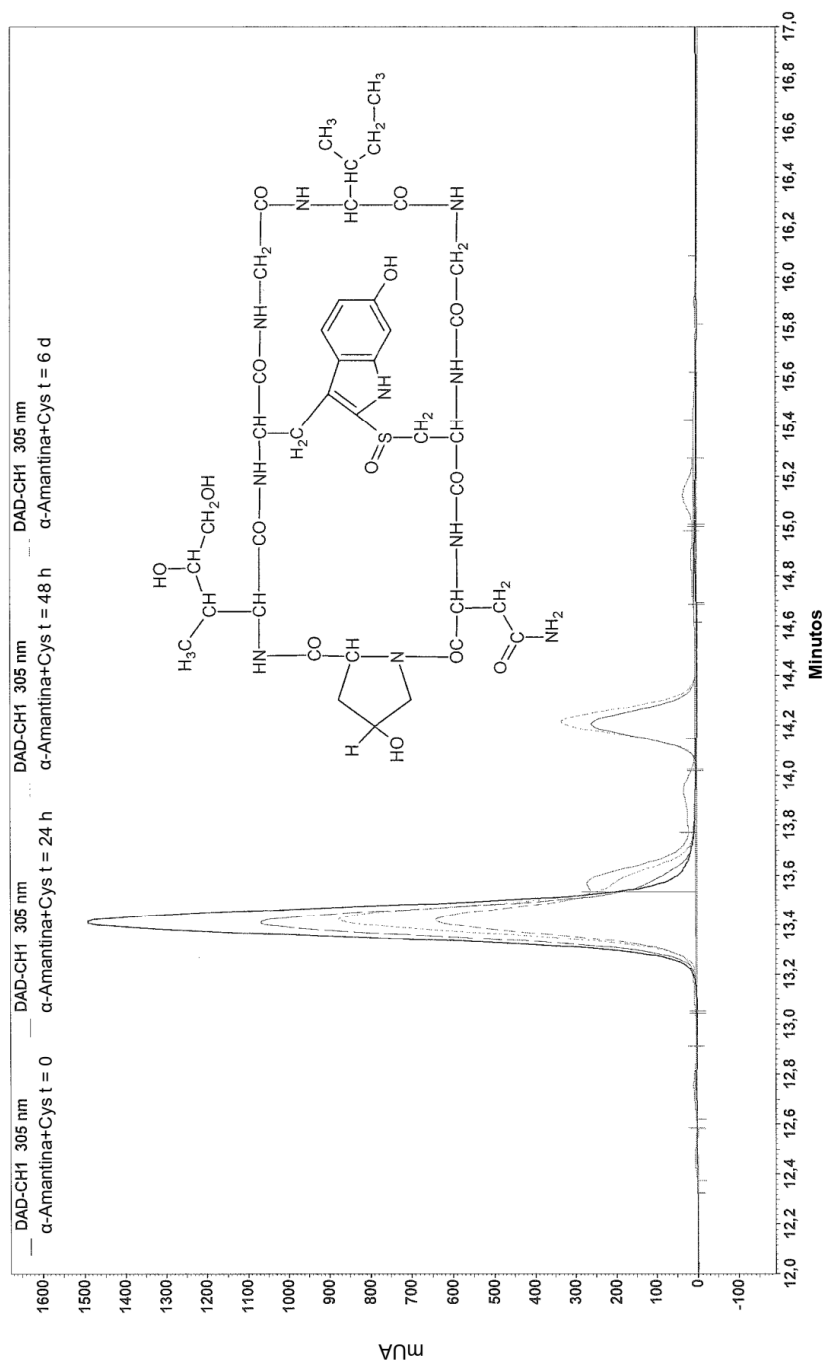


FIGURA 4

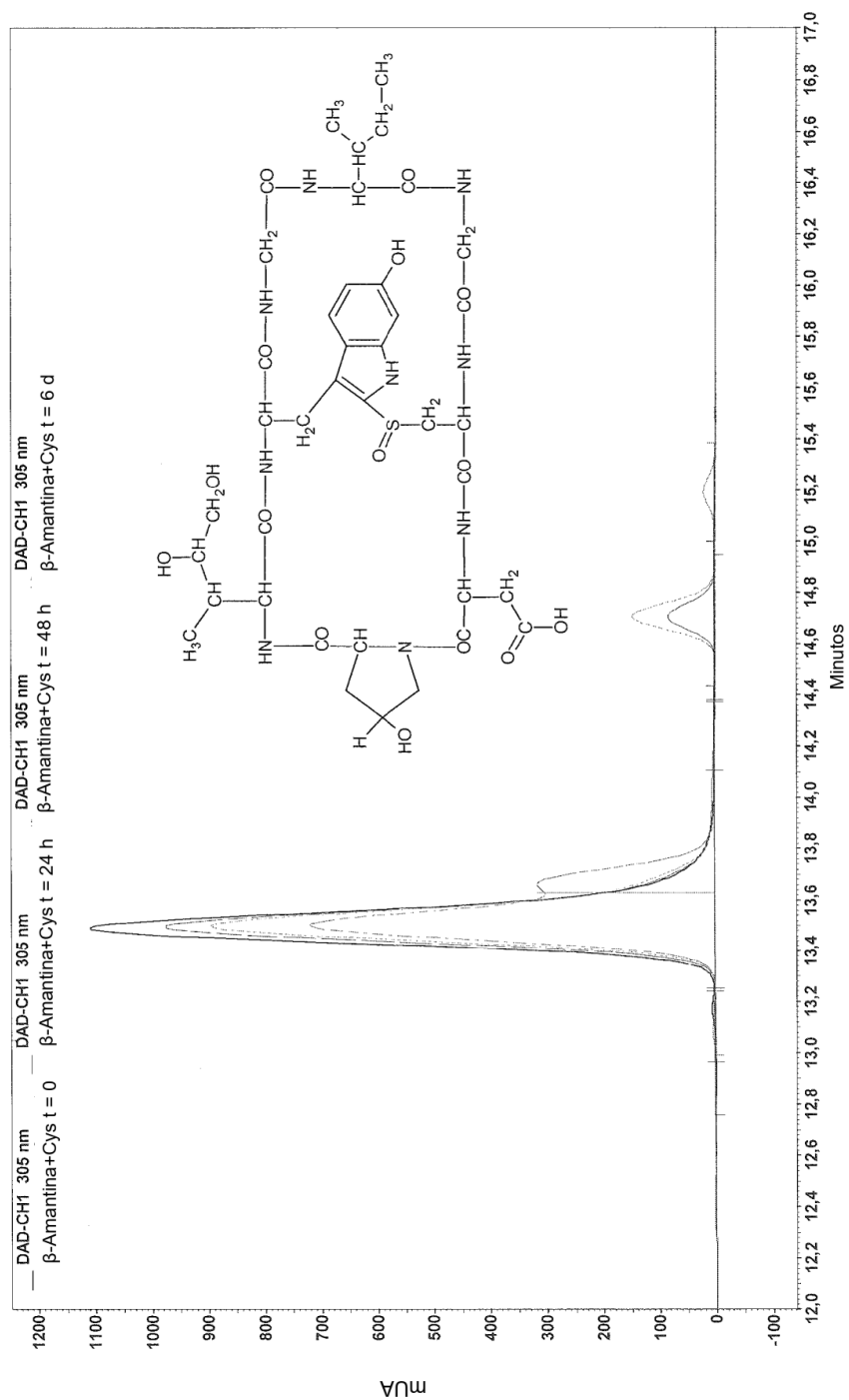
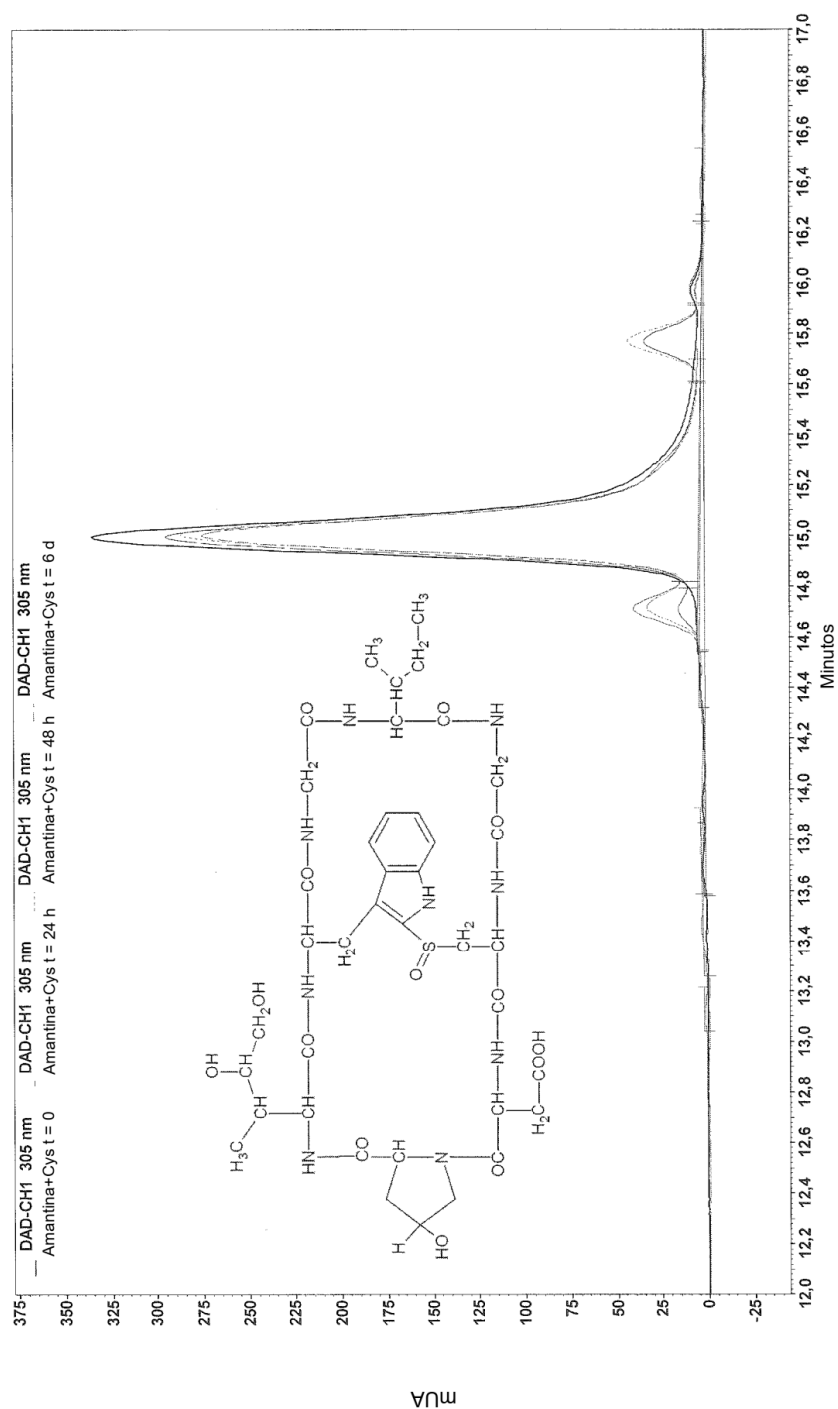


FIGURA 5



— DAD-CH1 305 nm — HDP 30.2105+Cys t=0 — DAD-CH1 305 nm —
 HDP 30.2105+Cys t=0 HDP 30.2105+Cys t=24 h HDP 30.2105+Cys t=48 h

Chemical structure of the peptide: CC(O)C(CO)C(=O)N[C@@H](C1CC[C@H](C1)O)C(=O)N[C@@H](Cc2c[nH]c3ccccc23)C(=O)N[C@@H](Cc4c[nH]c5ccccc45)C(=O)N[C@@H](C(C)C)C(=O)O

FIGURA 7

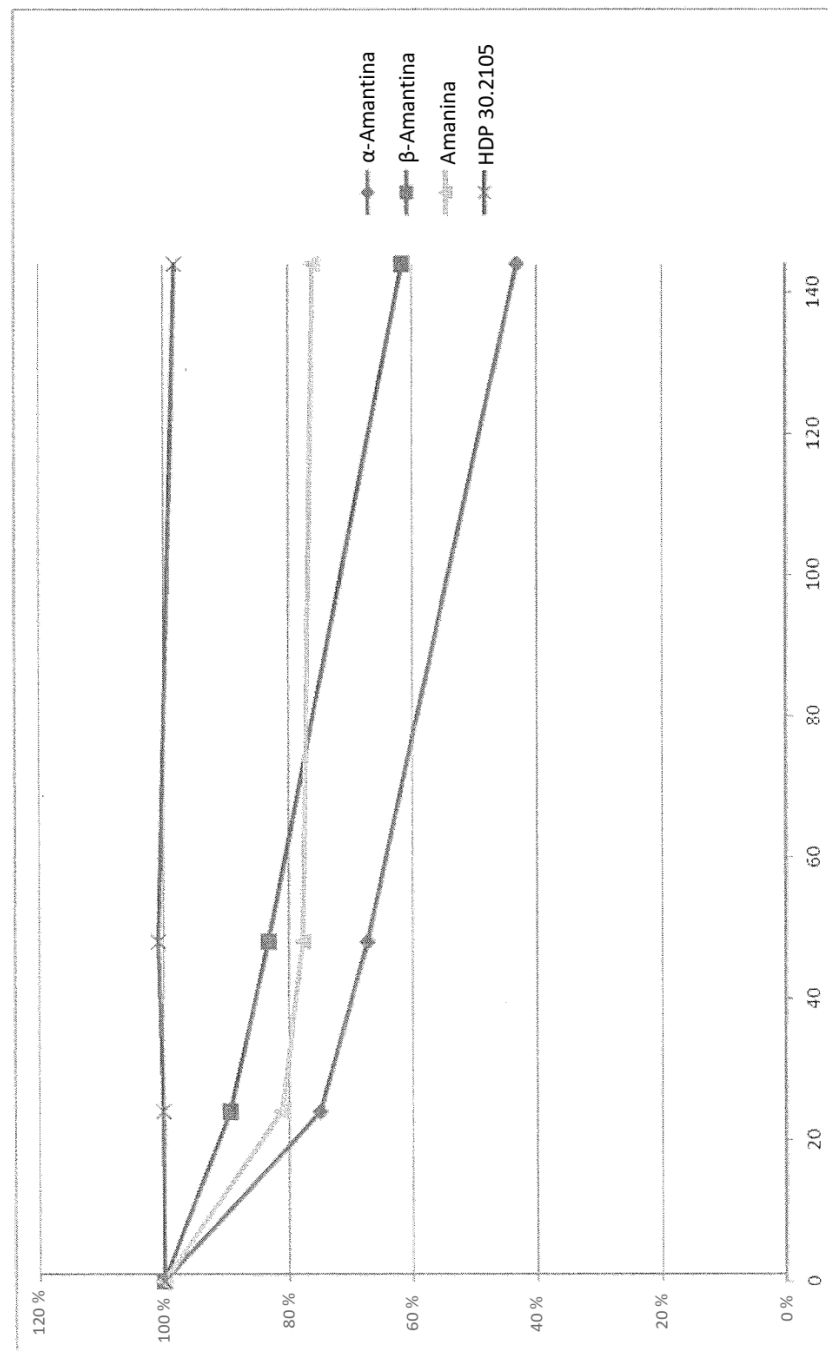


FIGURA 8

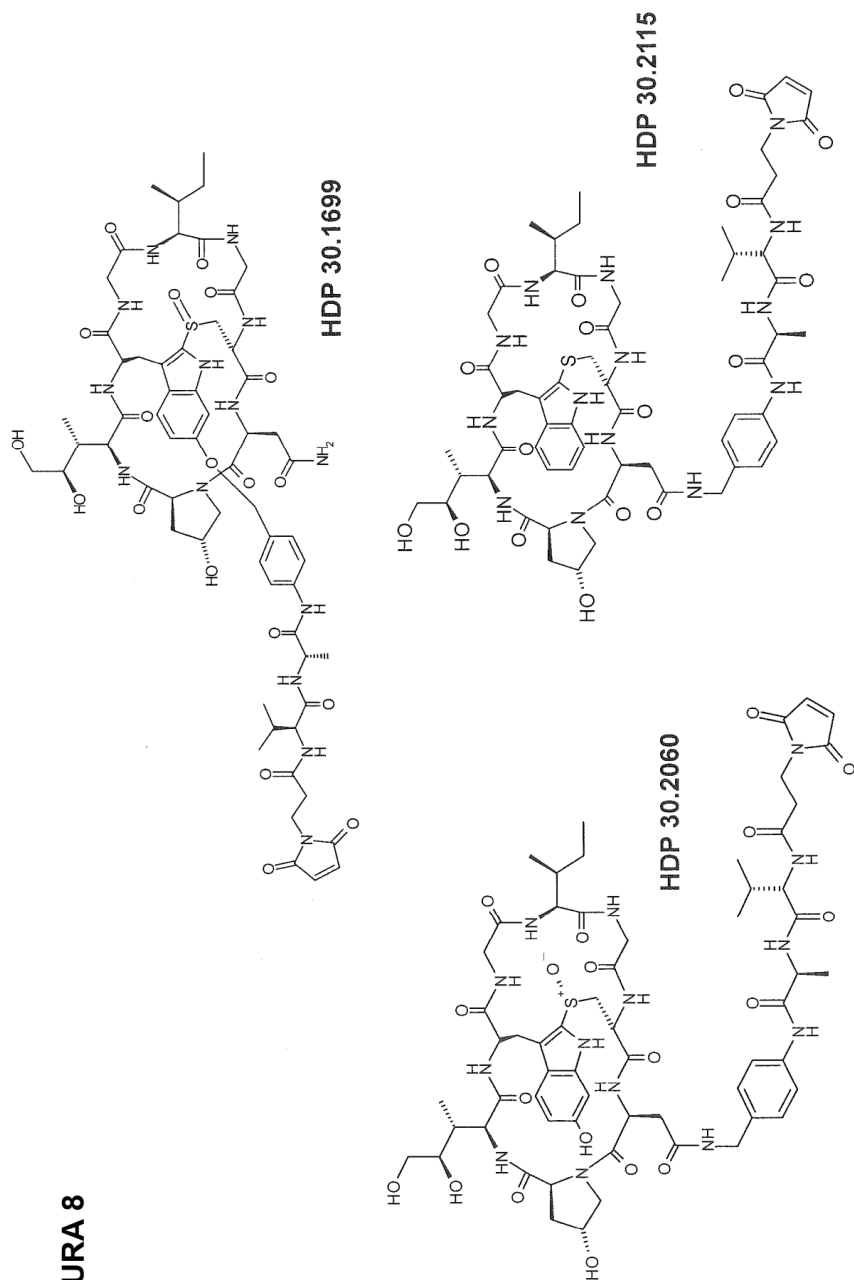


FIGURA 9

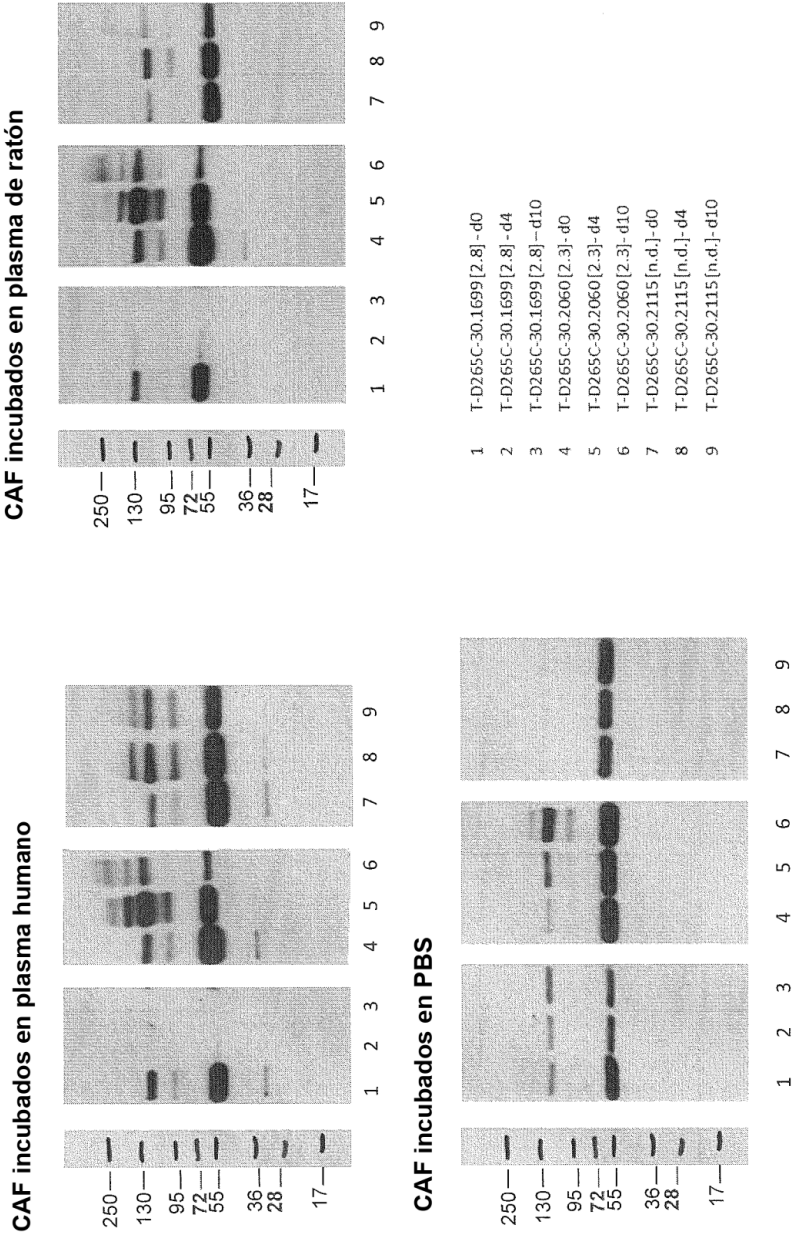


FIGURA 10

Citotoxicidad en células SKBR-3 después de incubación en plasma humano

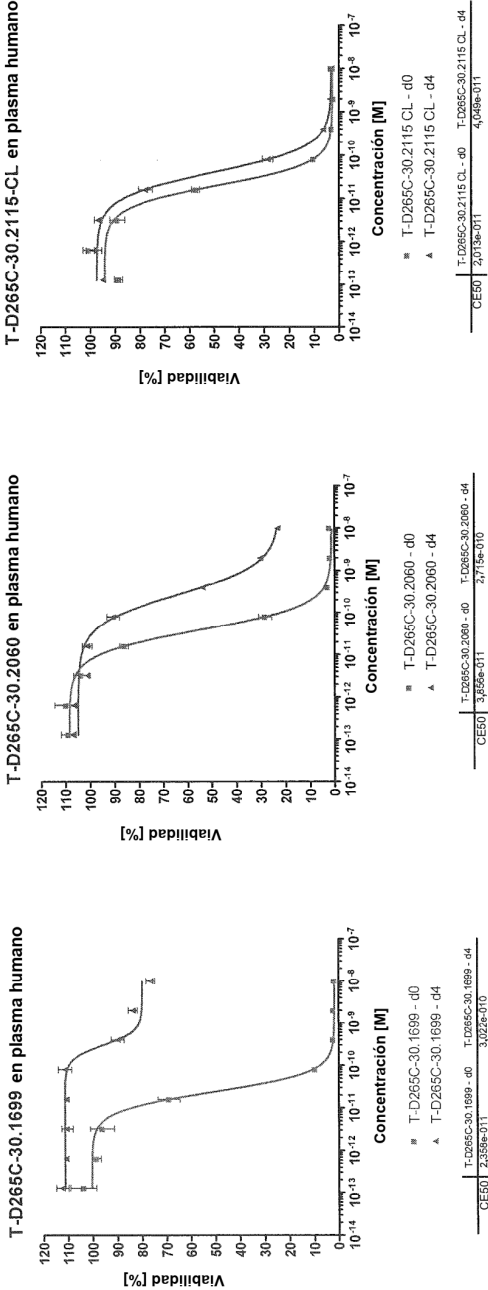


FIGURA 11

Citotoxicidad en células SKBR-3 después de incubación en plasma de ratón

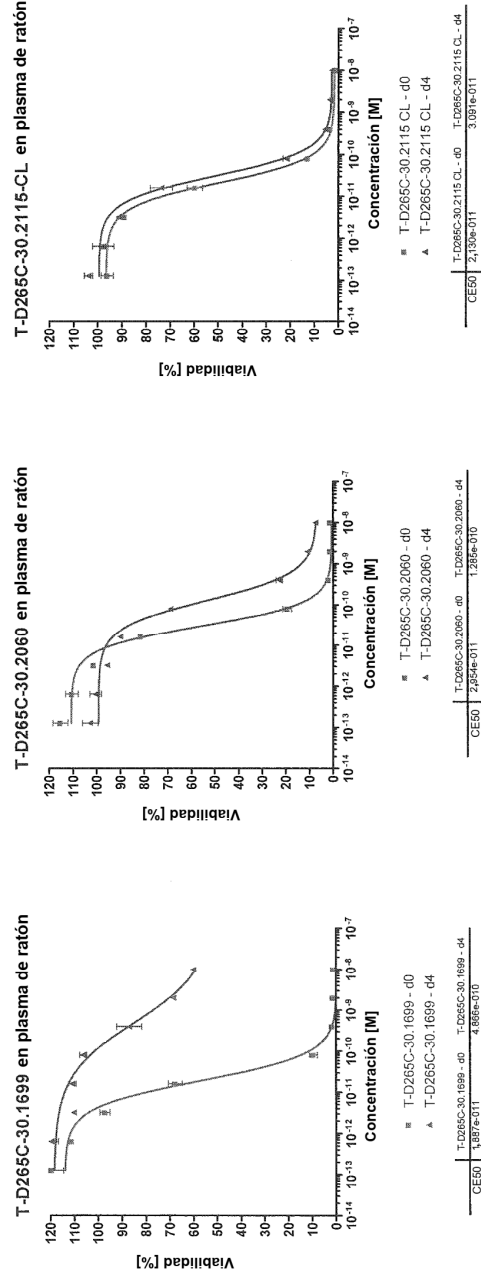


FIGURA 12

Citotoxicidad en células SKBR-3 después de incubación en PBS

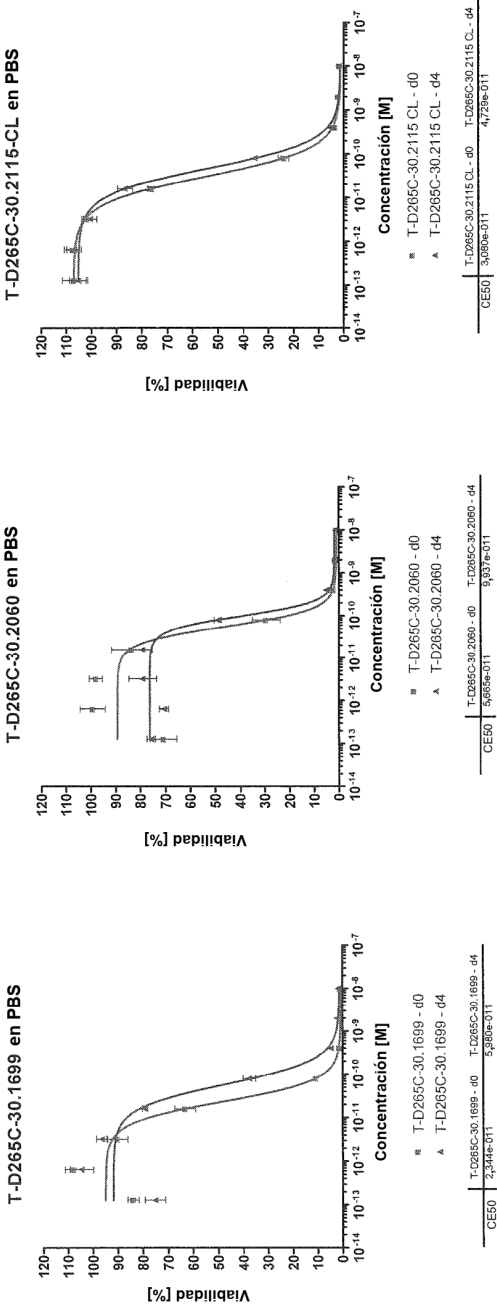


FIGURA 13

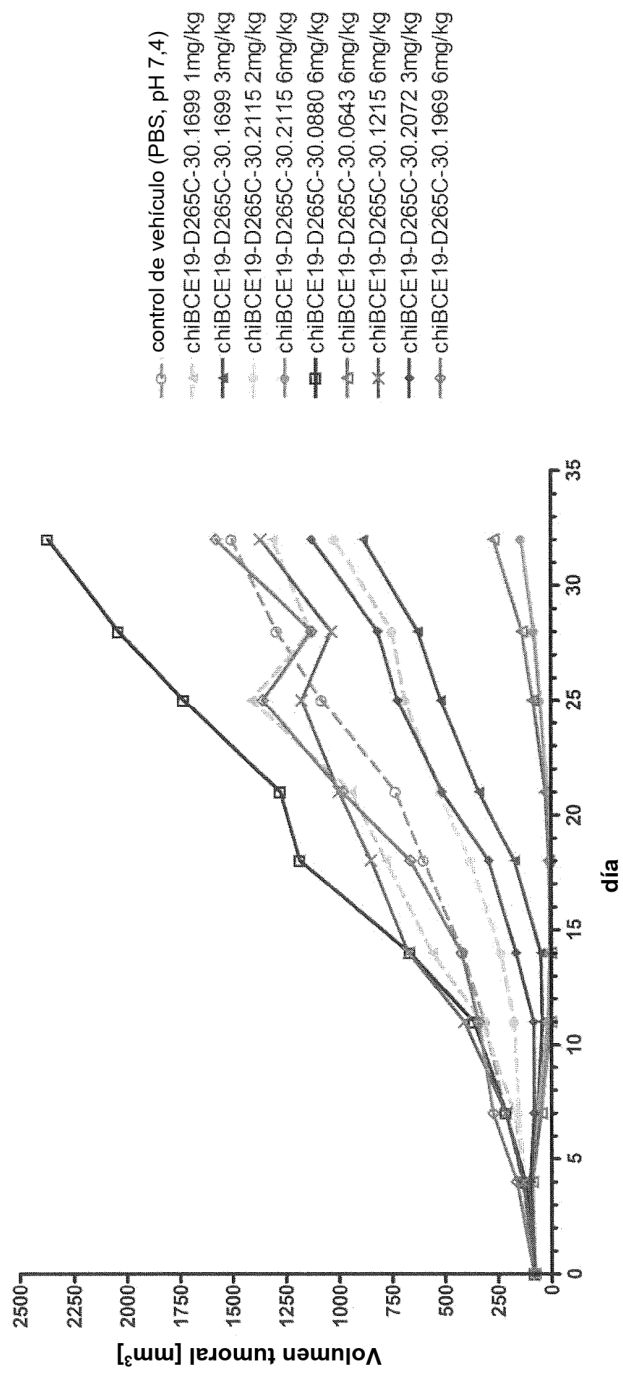


FIGURA 14

