

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 582**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2021 PCT/EP2021/076546**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2022 WO22064052**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2021 E 21783267 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 4217007**

54 Título: **Conjugados peptídicos de SN38 útiles en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

28.09.2020 EP 20382854

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

03.04.2025

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA (IRB BARCELONA) (33.33%)
Parc Científic de Barcelona, C. Baldiri Reixac, 10-12
08028 Barcelona, ES;
UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.33%) y
HOSPITAL SANT JOAN DE DEU (33.33%)**

72 Inventor/es:

**SANCHEZ NAVARRO, MACARENA;
TEIXIDÓ TURÁ, MERITXELL;
GENÉ OLACIREGUI, NAGORE;
GIRALT LLEDÓ, ERNEST y
MONTERO CARCABOSO, ANGEL**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

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

ES 3 010 582 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 peptídicos de SN38 útiles en el tratamiento del cáncer

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente europea EP20382854.6 presentada el 28 de septiembre de 2020.

Campo técnico

10 La presente invención se refiere al campo de los sistemas de administración de SN38, que es un fármaco contra el cáncer y sus indicaciones terapéuticas.

Antecedentes de la técnica

15 El cáncer es una enfermedad heterogénea caracterizada por la acumulación de células tumorales, que puede causar la muerte tanto de animales como de seres humanos. También es una de las principales causas de muerte por enfermedad entre niños y adolescentes. Aunque en las últimas cinco décadas se han logrado avances sustanciales en el tratamiento de varios tipos de cáncer, en particular, cánceres infantiles, los avances contra otros tipos han sido limitados. La incidencia anual de tumores en niños oscila entre 100-160 casos por millón. El riesgo anual es de 1 de cada 500 niños menores de 15 años. Esta incidencia es ligeramente inferior en los países industrializados. Los tumores cerebrales y medulares representan el 25 % de todas las neoplasias (40-50 % de todos los tumores sólidos pediátricos). A pesar de los progresos, los datos de supervivencia de estos pacientes siguen siendo escasos, en torno al 55 %. Esto contrasta con los sustanciales aumentos de supervivencia observados en los últimos años en otros tipos de pacientes, tales como los afectados por leucemia o tumores extracraneales.

25 Los métodos convencionales de tratamiento del cáncer incluyen tratamientos quirúrgicos, la administración de agentes quimioterapéuticos, y recientemente la terapia basada en la respuesta inmunitaria que implica la administración de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede conjugarse con una fracción terapéutica. No obstante, hasta la fecha, estos tratamientos han tenido un éxito limitado. La camptotecina, una de las cuatro grandes clasificaciones
30 estructurales de los compuestos anticancerígenos de origen vegetal, es un alcaloide citotóxico que consiste en una estructura de anillo pentacíclico que contiene un resto de pirrol (3, 4 β) quinoleína, una forma de lactona configurada en S, y una forma de carboxilato. El irinotecán se fabrica a partir de la camptotecina natural que se encuentra en el árbol ornamental chino *Camptotheca acuminata*. Varios tipos de cáncer han sido tratados en algún momento con irinotecán, entre ellos el glioblastoma multiforme (GBM) en el caso de los adultos, y el glioma pontino intrínseco difuso
35 (DIPG), glioblastoma pediátrico (*pGBM*), neuroblastoma, rhabdomioma, sarcoma de Ewing y retinoblastoma en el caso de los niños.

Los gliomas son un grupo de tumores que se originan en las células gliales del cerebro o la médula espinal, comprenden alrededor del 30 por ciento de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central, y el 80 por
40 ciento de todos los tumores cerebrales malignos. Frecuentemente, el tratamiento de los gliomas cerebrales es un enfoque combinado, usando cirugía, radioterapia o quimioterapia. El DIPG afecta principalmente a los niños, normalmente entre los 5 y los 7 años. Desafortunadamente, esta es la mayoría de los tumores de tronco cerebral, que comprende un 60-70 %, y es la de peor pronóstico de todas.

45 Ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz y la supervivencia media es de 9 meses. La radiación y la administración de esteroides es lo único que tiene un efecto paliativo y que aumenta muy discretamente la supervivencia. Hasta ahora, no existe una quimioterapia útil y se han probado múltiples ensayos clínicos, sin resultados favorables. Los glioblastomas pediátricos son otro grupo de tumores que comprende un tercio de los tumores hemisféricos. Tiene una incidencia máxima a los 8 y 12 años. Los glioblastomas también afectan a pacientes adultos, alrededor de 2-3 casos
50 por 100.000 habitantes.

El sarcoma de Ewing es la segunda causa de tumor óseo maligno en niños y adolescentes. La incidencia anual es de 0,6 por millón de habitantes. Es poco frecuente antes de los 5 años y el pico de incidencia se sitúa entre los 10 y los 15 años, afectando más a los niños que a las niñas, pero esta relación en el sexo varía según el rango de edad. Los
55 puntos de inicio más frecuentes son los huesos de la pelvis (cadera), la pared torácica (como las costillas o los omóplatos), o en medio de los huesos de las piernas. El sarcoma de Ewing también puede presentarse como una lesión extraesquelética en ausencia de lesión ósea. En esta variante, existe un alto riesgo de diseminación linfática y el tratamiento suele ser similar al del rhabdomioma.

60 Los sarcomas de tejidos blandos se dividen en rhabdomioma y no rhabdomioma. El rhabdomioma representa el 50 % de todos los sarcomas de tejidos blandos en niños. Es el tercer tumor sólido extracraneal en frecuencia, después del neuroblastoma y el tumor de Wilms. El pico de edad es bimodal, con un primer pico entre los 2 y los 5 años, y un segundo pico en la adolescencia, entre 15 y 19 años. Mientras que los sarcomas en adultos se producen sobre todo en las extremidades, en los niños pueden originarse en cualquier parte del cuerpo, tanto en el
65 músculo esquelético como en los tejidos blandos. La zona más afectada en los niños es la cabeza y el cuello y el tracto

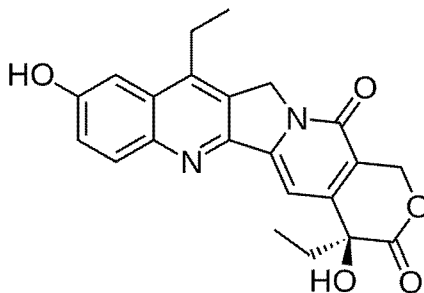
urogenital. Las extremidades se ven afectadas en el 20 % de los pacientes. La supervivencia global es escasa, excepto si el tumor se encuentra en lugares donde puede researse completamente, que a veces requiere la amputación de miembros o el vaciado. La supervivencia varía entre el 7 y el 70 %, dependiendo de la ubicación.

- 5 El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente de la infancia. Debido a su origen embrionario, los neuroblastomas pueden encontrarse prácticamente en cualquier parte del sistema nervioso simpático, pero la localización más frecuente de la enfermedad locorregional es en la glándula suprarrenal (44 %). Los niños de entre 1,5 y 6 años en el momento del diagnóstico aún pueden curarse con tratamientos convencionales, pero su probabilidad de supervivencia disminuye cuando se les diagnostica enfermedad metastásica (neuroblastoma en estadio 4).
- 10 Aproximadamente un 50 % de los pacientes recién diagnosticados ya presentan metástasis óseas (60 %), médula ósea (50 %), ganglios linfáticos (42 %) y/o hígado (15 %) y necesitan tratamiento quimioterápico intensivo, cirugía y radioterapia, pero su supervivencia sigue siendo escasa y se han logrado pocos avances en las últimas décadas.

- Finalmente, el retinoblastoma es la causa más frecuente de tumor ocular en niños, con una incidencia mundial de 1
- 15 por cada 20.000 nacidos vivos. Suele producirse en los 2 primeros años de vida. Del 30-40 % son bilaterales, en estos casos siempre hay antecedentes familiares positivos. De los unilaterales, el 10 % presenta una mutación germinal del gen Rb, localizado en el cromosoma 13. Si se detecta a tiempo, tienen una tasa de supervivencia del 95 %. En ciertas partes del mundo, cuando el diagnóstico es tardío, la supervivencia se reduce drásticamente, a menos del 20 %. El tratamiento depende del control tumoral alcanzado. Cuando la regresión tumoral no se controla con quimioterapia y
- 20 braquiterapia, se recomienda la enucleación. Incluso si se realiza la enucleación, en algunos casos hay invasión tumoral del nervio óptico, lo que obligará a un tratamiento extra de quimioterapia.

La eficacia del irinotecán ha demostrado estar limitada por su activación hepática, que da lugar a una baja tasa de conversión, alta variabilidad entre pacientes, y toxicidad gastrointestinal limitante de la dosis.

- 25 El SN38 es el metabolito activo del irinotecán y se forma a través de la hidrólisis del irinotecán por las carboxilesterasas hepáticas y se metaboliza a través de la glucuronidación por el UGT1A1. Su fórmula es la siguiente



- 30 Desde su descubrimiento ha atraído la atención de todos los científicos por su potente efecto antineoplásico. El SN38 tiene 1000 veces más actividad que el propio irinotecán y podría utilizarse para tratar el mismo tipo de cáncer que este. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* muestran que la potencia del SN38 en relación con el irinotecán varía de 2 a 2.000 veces. Aun así, el SN38 también tiene importantes limitaciones a nivel químico, farmacológico y tóxico. A nivel
- 35 químico, a diferencia del irinotecán que es soluble en agua, el SN38 es prácticamente insoluble en agua y en la mayoría de disolventes y aceites, por lo que es inviable administrar SN38 a los pacientes. Se han probado muchos disolventes y sólo es posible solubilizar el SN38 al 0,5 %, con dimetilsulfóxido, ácido fórmico y Transcutol® HP, así como con NaOH 0,1 M, pero el pH básico de esta solución acuosa de NaOH 0,1 M inactiva el SN38. El alto carácter lipofílico y su inestabilidad en soluciones acuosas del fármaco, hace necesaria su administración con un disolvente aprótico polar,
- 40 con todos los inconvenientes que ello conlleva. Adicionalmente, un segundo problema es la presencia de un anillo terminal de lactona, que lo hace inestable en soluciones acuosas, produciendo una hidrólisis no enzimática y dependiente del pH para formar un anillo hidrocarboxílico, que no es potente en la inhibición de la topoisomerasa. Por tanto, a pH neutro o básico, la balanza se inclina hacia las especies menos activas, mientras que a pH más ácido se favorece la formación de lactona, con mayor poder inhibitorio. El fármaco también contiene un carbono asimétrico en
- 45 la posición 20, siendo la forma S la configuración farmacológicamente activa.

Dadas las características desfavorables del fármaco, varias investigaciones han conducido a formulaciones de SN38 como profármaco, para resolver el problema de la insolubilidad y aprovechar así el potente mecanismo de acción. Se han aplicado varias estrategias de conjugación al SN38 para liberar el fármaco en lugar de utilizar el profármaco.

- 50 Algunos de ellos se basan en una liberación lenta de SN38 a partir de un conjugado soluble, por ejemplo, el documento US8299089B2 propone la conjugación con poli(etilenglicol) a PEG multi-armados para mejorar la solubilidad y que libera el SN38 debido a la hidrólisis del éster. No obstante, estos conjugados deben administrarse a niveles elevados para ser eficaces.

El documento WO2015/051307A1 divulga algunos conjugados que liberan SN38 de un polietilenglicol a través de un mecanismo de β -eliminación a tasas lentas para permitir regímenes de exposición a dosis bajas y a largo plazo.

- 5 F. Koizumi et al en "Novel SN38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors", *Cancer Res* 2006, vol. 66(20) pp. 10048-56 divulga un copolímero en bloque de poli(etilenglicol)-poli(ácido glutámico) conjugado químicamente con SN38 a partir de nanopartículas (NPs) autoensambladas que superó al irinotecán en estudios preclínicos,
- 10 Otras estrategias de conjugación se basan, por ejemplo, en el uso de conjugados peptídicos para evitar la activación hepática y reducir la toxicidad gastrointestinal y la variabilidad entre pacientes en comparación con el irinotecán.

Por tanto, F Meyer-Losic et al en "DTS-108, A novel Peptidic prodrug of SN38: *In vivo* Efficacy and Toxicokinetic Studies", *Clinical Cancer Research* 2008, vol.14, número 7, págs. 2145-2153, propone conjugar SN38 con un péptido catiónico (Vectocell) a través de un enlazador escindible por esterases para administrar niveles significativamente más altos de SN38 que el irinotecán, sin la toxicidad asociada del irinotecán, dando lugar a una mayor ventana terapéutica para el DTS-108 en modelos preclínicos.

- 15 El documento WO2007/113687A2 divulga la preparación de conjugados peptídicos penetrantes en células de camptotecina mediante un enlazador, mediante un enlace tioéter, tal como el conjugado DPV1047-MIC-SN38 (DPV-1047 es el péptido VKRGLKLRHVRPRVTRMDV; MIC es residuo de ácido 6-maleimidohexanoico; SN38 es 7-etil-10-hidroxicamptotecina) que ha demostrado tener una actividad antitumoral significativa contra la línea celular humana HCT-116.

- 25 Finalmente, el documento WO2018/064683A1 divulga la síntesis de un agente antitumoral de direccionamiento vascular tumoral, IF7-SN38, en donde el agente antitumoral comprende un péptido de unión a anexina-1 con la secuencia IFLLWQR (IF7) conjugado con un fármaco anticanceroso (SN38) a través del enlazador ácido 4-{4-[(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxamido]metil}ciclohexano-1-carbílico. Este compuesto se dirige a los tumores cerebrales y supera las barreras hematoencefálicas mediante un mecanismo de transcitosis pasiva.

- 30 Nonaka, M., Suzuki-Anekoji, M., Nakayama, J. *et al.* Overcoming the blood-brain barrier by Annexin A1-binding peptide to target brain tumours. *Br J Cancer* 123, 1633-1643 (2020) describe que IF7C(RR)-SN38 atraviesa la barrera hematoencefálica y suprime el crecimiento de tumores cerebrales en modelos de ratón.

- 35 El documento WO 2015/001015 describe péptidos transportados activamente y resistentes a proteasas como lanzaderas de la BHE y construcciones de lanzadera de carga.

- A pesar de los esfuerzos para proporcionar conjugados de SN38 que permitan la adecuada administración y biodisponibilidad de SN38 para el tratamiento del cáncer, sigue existiendo una necesidad médica insatisfecha
40 encontrar sistemas mejorados para administrar eficazmente el SN38.

Resumen de la invención

- Los inventores han desarrollado un conjugado de SN38 con un grupo específico de péptidos, que se unen al SN38
45 mediante un tipo específico de enlazador, y que mantiene una actividad antitumoral contra varias líneas celulares de cánceres cerebrales y extracraneales, similar al SN38. Los conjugados del SN38 presentan alta solubilidad en agua y a diferencia del SN38 que es prácticamente insoluble, podría administrarse a los pacientes debido a dicha solubilidad.

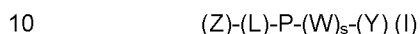
- La actividad de los nuevos conjugados de SN38 es muy superior a la del irinotecán *in vitro*. Ventajosamente, presentan
50 una buena estabilidad en el suero humano *in vitro*.

- Los péptidos que forman parte del conjugado son conocidos y se describieron previamente en el documento WO2015/001015A1. Este documento divulga que estos péptidos tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y que tienen la capacidad de transportar cargas que no pueden atravesar la BHE por sí
55 mismas, en particular grandes cargas como proteínas y anticuerpos. Utilizan un mecanismo de transporte activo para atravesar la BHE. B. Oiler *et al.*, en "MiniAp-4: A Venom-Inspired Peptidomimetic for Brain Delivery", *Angew Chem Int Ed* 2016, vol.55, págs.572-575 se centraron en el péptido DapKAPETALD y divulgaron que es resistente a las proteasas y capaz de transportar eficazmente diversas cargas a través de la barrera hematoencefálica en un modelo basado en células humanas y también *in vivo*.

- 60 Los inventores han encontrado que para el caso de SN38 se obtienen buenos resultados de actividad antitumoral mediante su conjugación con ciertos péptidos de los divulgados en el documento WO2015/001015A1 y enlazadores de cierto tamaño que son mayores que los enlazadores divulgados en el mencionado documento. Estos conjugados son ventajosos respecto a otros conjugados porque permiten mantener una actividad antitumoral similar al SN38 y
65 hasta 100 veces superior a la actividad *in vitro* del irinotecán.

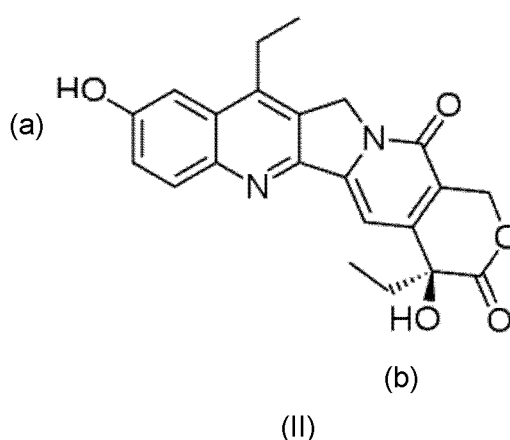
Los datos comparativos proporcionados en la sección experimental muestran que, cuando el SN38 se conjuga a través del mismo enlazador con otro péptido (THRre) se pierde parte/toda la actividad antitumoral (Ejemplo 7 de la invención y Ejemplo comparativo 1) y los resultados son aún peores si además se utiliza un enlazador diferente al de la invención 5 (Ejemplo comparativo 2).

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



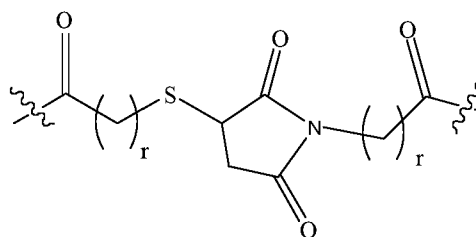
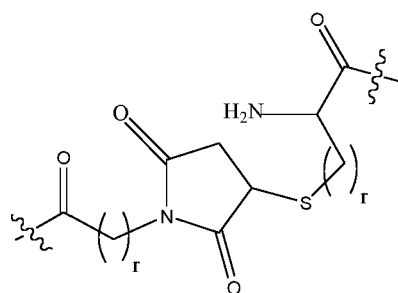
en donde:

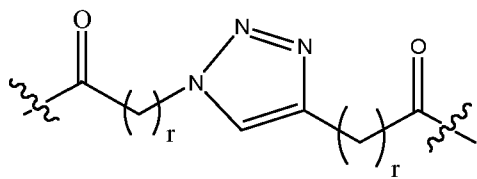
Z es un radical del principio activo farmacéutico SN38 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el principio activo farmacéutico SN38 tiene la fórmula (II), y en donde Z está unido a un enlazador L independientemente 15 por sólo uno de los dos grupos hidroxilo (a) o (b) del principio activo farmacéutico;



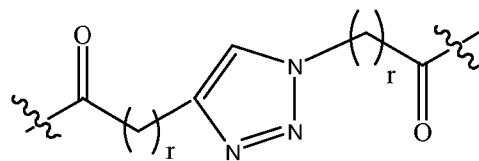
20 L es un enlazador que es un birradical compuesto de 2 a 8 birradicales L' y tiene la fórmula: -L'_a-(L'_b)_n-L'_c;

L'_a' es un birradical seleccionado entre el grupo que consiste en: -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-(CH₂)_r-S-; -C(=O)-(CH₂)_r-O-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-S-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-O-; -(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-NH-; -(CH₂)_r-S-; -(CH₂)_r-O-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_rNH-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_rC(=O)-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_rO-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_rS-; -SO₂-(CH₂)_rNH-; -SO₂-(CH₂)_rC(=O)-; -SO₂-(CH₂)_rO-; -SO₂-(CH₂)_rS-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_rNH-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_rC(=O)-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_rO-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_rS-; -CH(OH)-(CH₂)_rNH-; -CH(OH)-(CH₂)_rC(=O)-; -CH(OH)-(CH₂)_rO-; -CH(OH)-(CH₂)_rS-;

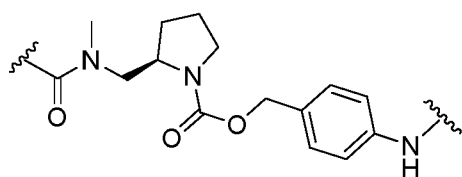




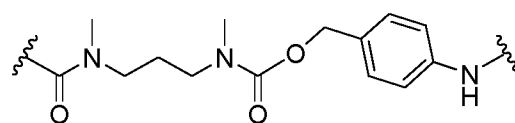
L₃ ;



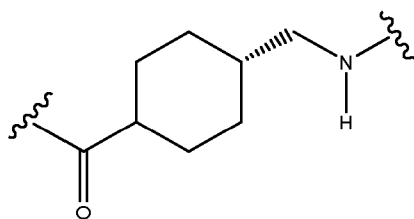
L₄;



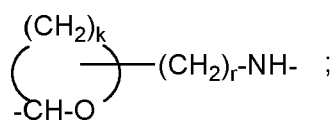
L₅;



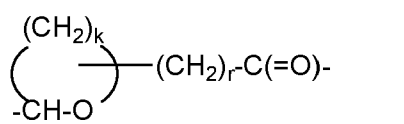
L₆;



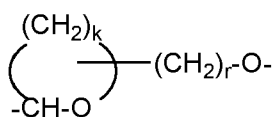
L₇;



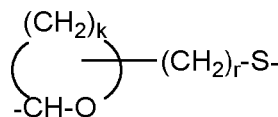
L₈;



L₉;



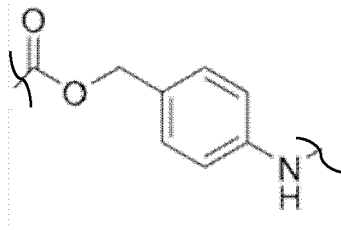
L₁₀;



L₁₁; y

5

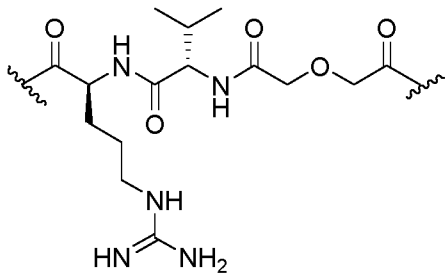
el sustituyente en cualquiera de L₈-L₁₁ está en cualquier posición de los ciclos;



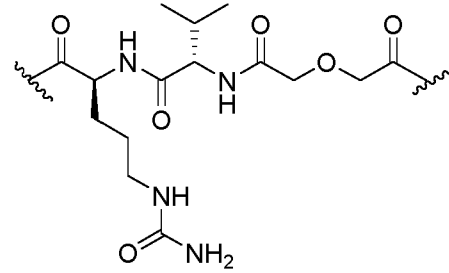
L12,

L_b' es un birradical seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en: -NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-(CH₂)_r-C(=O)-; -O-(CH₂)_r-C(=O)-; -NH-(CH₂)_r-; -C(=O)-(CH₂)_r-; -S-(CH₂)_r-; -O-(CH₂)_r-; -NH-CH-((CH₂)_rNH₂)-C(=O)-; -S-CH₂-CH(NH₂)-C(=O)-; -(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-O-; -(CH₂)_r-NH-; -(CH₂)_r-S-; -C(=O)-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-(CH₂)_r-O-; -C(=O)-(CH₂)_r-S-; -NH-(CH₂)_r-O-; -NH-(CH₂)_r-NH-; -NH-(CH₂)_r-S-; L₁; L₂; L₃; L₄; y combinaciones de los mismos;

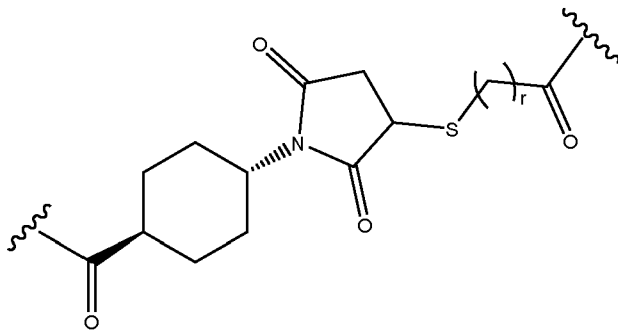
L_c' es un birradical seleccionado entre el grupo que consiste en: -NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -NH-CH-((CH₂)_rNH₂)-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-CH₂-CH(NH₂)-C(=O)-; -O-(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-C(=O)-; L₁; L₂; L₃; L₄;



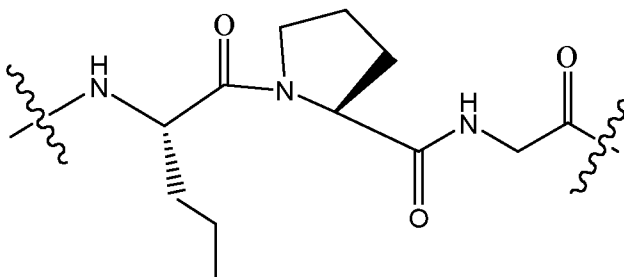
L12



L13



L14 y




L15;

P es un birradical de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KAPETALX₂ con un enlace intrapeptídico entre X₁ y X₂ que es un enlace amida; en donde X₁ se selecciona entre el grupo que consiste en Dap (ácido 2,3-diaminopropiónico) y Dab (ácido 2,4-diaminobutanoico); y X₂ se selecciona entre el grupo que consiste en D (ácido aspártico) y E (ácido glutámico); es decir,

5

SEQ ID NO:1: X_1 KAPETALX₂



Para el aminoácido Dap se han utilizado igualmente los códigos Dap y Dpr;

- 10 (b) un péptido que tiene una longitud de 12-20 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro, y comprende una secuencia de aminoácidos que es: X_3 KAPETALX₄AAA; que tiene al menos un enlace intrapeptídico disulfuro o diselenuro entre X₃ y X₄, en donde X₃ y X₄ son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas); es decir,

SEQ ID NO:2: X_3 KAPETALX₄AAA




15


- (c) un péptido que tiene una longitud de 9-11 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro o diselenuro que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en X_5 KAPETALX₆; X_5 KAPETALX₆A; y X_5 KAPETALX₆AA que tiene al menos un enlace disulfuro o diselenuro intrapeptídico entre X₅ y X₆; en donde X₅ y X₆ son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas), es decir,

20


SEQ ID NO:3: X_5 KAPETALX₆



SEQ ID NO:4: X_5 KAPETALX₆A



SEQ ID NO:5: X_5 KAPETALX₆AA



- 25 (d) un péptido que tiene 16 residuos de aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos X_7 NX₈KAPETALX₉AAAX₁₀H con un enlace disulfuro o diselenuro intrapeptídico entre X₇ y X₉, y entre X₈ y X₁₀; en donde X₇-X₁₀ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas); siempre que X₇ y X₉ sean iguales, y X₈-X₁₀ sean iguales; es decir,

SEQ ID NO:6: X_7 NX₈KAPETALX₉AAAX₁₀H



30

y (e) péptido que comprende la secuencia de aminoácidos X_1 KAPETALX₂ en donde X₁ se selecciona del grupo que consiste en Dap y Dab; y X₂ se selecciona del grupo que consiste en D (ácido aspártico) y E (ácido glutámico) (SEQ ID NO:7); es decir, péptido lineal;

35

W es un birradical seleccionado del grupo que consiste en -NH-(CH₂)_r-C(=O)- y -NH-CH((CH₂)_nNH₂)-C(=O)-; Y es un radical seleccionado del grupo que consiste en -NH₂, -OH, -OR₃ y -NHR₃;

s es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 1; n es un número entero de 0 a 6; r es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 5; k es un número entero de 5 a 8; R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre un alquilo (C₁-C₆); y R₃ es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo- (C₁-C₆);

L_a' está unido al radical Z mediante un enlace que se selecciona del grupo que consiste en un enlace éster, éter, uretano, éter de sililo, sulfonato, fosfato, cetil, hemicetil, carbonato y carbamato, formándose el enlace entre los grupos C=O, SO₂, Si, P, CH o CH₂ en el lado izquierdo de las fórmulas L_a' dibujadas y uno de los grupos hidroxilo del SN38;

45

cuando $n = 0$, L_a' está unido al radical L_c' a través de un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

5

cuando $n = 1$, L_a' está unido al radical L_b' a través de un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_b' ; y L_b' está unido al radical L_c' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en la amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_b' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

10

cuando n es mayor que 1, L_b' son iguales o diferentes y están unidos entre sí a través de un enlace químicamente factible seleccionado del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster; siendo un terminal L_b' unido a L_a' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_b' dibujadas; y siendo otro terminal L_b' unido a L_c' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre el grupo funcional del lado derecho de las fórmulas L_b' dibujadas y el grupo funcional del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

15

20

L_c' se une al birradical P a través de un enlace amida formado con el grupo carbonilo del lado derecho de las fórmulas L_c' dibujadas y un grupo amino del primer aminoácido de la secuencia peptídica P ;

25

cuando $s=0$, P se une directamente a Y a través de una amida, ácido carboxílico o enlace éster, formándose el enlace entre el $C=O$ del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P , y el radical Y que es $-NH_2$, $-OH$, $-OR_3$, $o-NHR_3$;

y

cuando $s=1$, P está unido a un radical W a través de un enlace amida formado con un $C=O$ del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P , el enlace que se forma entre los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas W dibujadas y los grupos funcionales ($C=O$) del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P del lado derecho de la secuencia dibujadas; y W está unido a Y de la siguiente manera: $-C(=O)-NH-(CH_2)_n-C(=O)-Y$, o $-C(=O)-NH-CH((CH_2)_n, NH_2)-C(=O)-Y$.

30

Las líneas entre dos aminoácidos de las secuencias anterior o siguiente representan el enlace intrapeptídico entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos. En una realización particular, las líneas entre dos aminoácidos de las secuencias anterior o siguiente representan el enlace intrapeptídico entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos.

35

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto definido anteriormente, junto con cantidades apropiadas de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

40

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto como el definido anteriormente, para su uso como un medicamento.

45

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto como el anterior, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, incluyendo un ser humano.

La presente divulgación se refiere además a un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el compuesto de fórmula (I) es para su uso en terapia de combinación con un agente quimioterapéutico, y/o en combinación con un inhibidor de la carboxilesterasa.

50

Breve descripción de los dibujos

El compuesto (Ia) también se denomina G2B-001 o SN38-enlazador A-MiniAp4. Estos nombres se han utilizado igualmente en el presente documento. El compuesto (Ib) también se denomina G2B-001 lineal. El compuesto (Ic) también se denomina G2B-003. El compuesto (Id) también se denomina G2B-004. El compuesto (Ie) también se denomina G2B-005.

55

La figura 1 muestra una actividad antiproliferativa comparativa del compuesto (Ia) también denominado en el presente documento G2B-001 o SN38-enlazador A-MiniAp4 (ejemplo 7) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular cancerosa de gliomas adultos U87. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan medias y DE de tres- seis réplicas a concentración de compuesto. MiniAp4 es DapKAPETALD con un enlace amida intrapeptídico entre Dap

60

65 y D.

La figura 2 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular cancerosa de gliomas adultos U373. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
5 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 3 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de DIPG HSJD-DIPG-007. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
10 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 4 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo de DIPG HSJD-DIPG-011. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
15 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 5 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo de glioma pediátrico de alto grado HSJD-GBM-001. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
20 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 6 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de retinoblastoma HSJD-RBT-5. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
25 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 7 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de retinoblastoma HSJD-RBT-7. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
30 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 8 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de retinoblastoma HSJD-RBT-14. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
35 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 9 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular de sarcoma de Ewing A673. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
40 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 10 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular de rhabdomyosarcoma Rd. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
45 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 11 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y los compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular de rhabdomyosarcoma RH4. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
50 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 12 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de enlazador de SN38 A-MiniAp4 (Ia) y compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular de neuroblastoma LAN-1. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
55 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 13 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de enlazador de SN38 A-MiniAp4 (Ia) y compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra la línea celular de neuroblastoma SK-N-JD. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan
60 medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 14 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de enlazador de SN38 A-MiniAp4 (Ia) y compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de neuroblastoma HSJD-NB-004. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos
65 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 15 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de enlazador de SN38 A-MiniAp4 (Ia) y compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de neuroblastoma HSJD-NB-005. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos 5 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 16 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de enlazador de SN38 A-MiniAp4 (Ia) y compuestos relacionados SN38 e irinotecán, contra el modelo celular de neuroblastoma HSJD-NB-016. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos 10 representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 17 muestra una comparación de la concentración del fármaco SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) que inhibe el 50 % de la proliferación de células tumorales (valores de IC50) entre cultivos. Se representan los datos individuales (puntos). Estadística: ANOVA de dos vías de medidas repetidas (emparejadas), con el ensayo de comparaciones 15 múltiples de Tukey.

La figura 18 muestra curvas de peso individuales de 3 ratones tratados con el compuesto SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) en la MTD de 200 mg/kg (tratados), una única inyección i.v. el día 0, con 2 ratones de control (Controles) inyectados i.v. con solución salina en el día 0. 20

La figura 19 muestra la variación media del peso, expresado como el % de pérdida de peso con respecto al peso individual máximo, de ratones tratados con irinotecán, SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), o solución salina (Control) como se detalla en el ejemplo 10. Se representan los datos medios (puntos) y la DE (barras).

25 La figura 20 muestra una actividad antiproliferativa comparativa del SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), y el ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre) contra la línea celular HSJD-DIPG-007. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan la media y DE de seis réplicas a la concentración del compuesto.

30 La figura 21 muestra una actividad antiproliferativa comparativa del enlazador-SN38 A-MiniAp4 (Ia), y el ejemplo comparativo 2 (enlazador-SN38 B-THRre) contra la línea celular HSJD-GBM-001. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan la media y DE de seis réplicas a la concentración del compuesto.

35 La figura 22 muestra una actividad antiproliferativa comparativa del SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), ejemplo comparativo 1 (SN38-enlazador A-THRre) y ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre) frente a la línea celular HSJD-DIPG-007. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan la media y DE de seis réplicas a la concentración del compuesto. 40

La figura 23 muestra una actividad antiproliferativa comparativa del enlazador-SN38 A-MiniAp4 (Ia), ejemplo comparativo 1 (SN38-enlazador A-THRre) y ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre) frente a la línea celular HSJD-GBM-001. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan la media y DE de seis réplicas a la concentración del 45 compuesto.

La figura 24 muestra la estabilidad de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) en suero humano a 37 °C *in vitro* frente al tiempo.

La figura 25 muestra la estabilidad de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) en plasma de rata, de ratón, canino y humano 50 a 37 °C *in vitro* frente al tiempo.

La figura 26 muestra la estabilidad de G2B-001 lineal (Ib) en suero humano a 37 °C *in vitro* frente al tiempo.

La figura 27 muestra una actividad antiproliferativa comparativa de G2B-001 lineal (Ib), G2B-001 (Ia) y el compuesto 55 relacionado SN38, contra el modelo celular de DIPG HSJD-DIPG-007. Los valores se expresan como % de la señal MTS de las células de control no tratadas que se consideraron al 100 %. Los valores en puntos representan medias y DE de tres-seis réplicas a concentración de compuesto.

La figura 28 muestra los volúmenes tumorales subcutáneos de neuroblastoma (media y DE de dos tumores) en tres 60 ratones tratados con irinotecán (puntos negros), G2B-003 (Ic) (línea continua) o control salino (línea discontinua). El modelo tumoral fue un xenoinjerto derivado del paciente denominado HSJD-NB-013.

Descripción detallada de la invención

65 A menos que se indique lo contrario, los aminoácidos citados en el presente documento son L-aminoácidos. Los

códigos de 1 y 3 letras se han utilizado indistintamente. Para los siguientes aminoácidos se han utilizado las siguientes abreviaturas: ácido diaminopropiónico (Dap), Diaminobutírico (Dab), Selenocisteína (Sec) y Penicilamina (Pen). En el contexto de la presente invención, la penicilamina solo incluye D-penicilamina.

5 Los compuestos de la presente invención mencionados anteriormente pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" utilizada en el presente documento abarca cualquier sal formada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. No hay limitación con respecto a las sales, a excepción del uso con fines terapéuticos, deben ser farmacéuticamente aceptables.

10

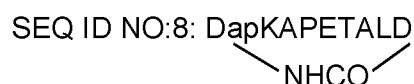
Como algunos de los compuestos de fórmula (I) son compuestos básicos, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluidos ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, acético, benzenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, fosfórico, 15 succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que Z está unido a un enlazador L por el grupo hidroxilo (b) del principio activo farmacéutico.

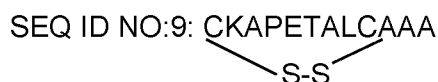
20 En otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que Z está unido a un enlazador L por el grupo hidroxilo (a) del principio activo farmacéutico.

En otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical de un péptido seleccionado del grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD

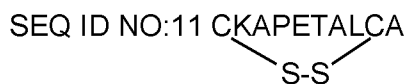
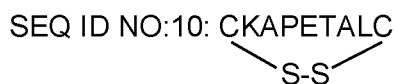
25 con un enlace intrapeptídico entre Dap y D que es un enlace amida, es decir,



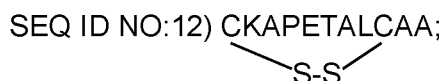
(b) un péptido que tiene una longitud de 9-20 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro, y comprende una secuencia de aminoácidos que es: CKAPETALCAA; que tiene al menos un 30 enlace disulfuro intrapeptídico entre las cisteínas 1 y 9, es decir,



35 (c) un péptido que tiene una longitud de 9-11 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro y que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en CKAPETALC; CKAPETALCA; y CKAPETALCAA que tiene al menos un enlace disulfuro intrapeptídico entre las cisteínas 1 y 9, es decir,



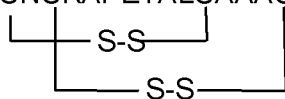
40



y

(d) un péptido que tiene 16 residuos de aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos CNCKAPETALCAAACH con un enlace disulfuro intrapeptídico entre la primera y la tercera cisteína que son las 45 cisteínas 1 y 11, y entre la segunda y la cuarta cisteína que son las cisteínas 3 y 15, es decir,

SEQ ID NO:13: CNCKAPETALCAAACH



En las secuencias SEQ ID NO:8 a SEQ ID NO:13 en las que se han seleccionado aminoácidos específicos para X₁-X₁₀ se ha dibujado el enlace intrapeptídico específico en la secuencia.

5

En otra realización particular, el al menos un enlace intrapeptídico en los péptidos de la presente invención es un enlace intrapeptídico. En otra realización particular, el al menos un enlace intrapeptídico en los péptidos de la presente invención se refiere a dos enlaces intrapeptídicos.

10 En otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical de un péptido DapKAPETALD (SEQ ID NO:14), es decir, un péptido lineal.

En una realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical de un péptido seleccionado del grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D que es un enlace amida (también denominado MiniAp4) (SEQ ID NO:8); y (b) CKAPETALC que tiene al menos un enlace disulfuro intrapeptídico entre las cisteínas en posición 1 y 9 (SEQ ID NO: 10).

20 En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical del péptido DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D que es un enlace amida (SEQ ID NO:8).

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es un birradical seleccionado del grupo que consiste en: -C(=O)-(CH₂)_rC(=O)-, -C(=O)-(CH₂)_rNH-, -C(=O)-(CH₂)_rS-, -C(=O)-(CH₂)_rO-; -C(=O)-NH-(CH₂)_rC(=O)-; L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆, L₇ y L₁₂.

30 En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es un birradical seleccionado del grupo que consiste en: -C(=O)-(CH₂)_rC(=O)-, -C(=O)-(CH₂)_rNH-, -C(=O)-(CH₂)_rS-, -C(=O)-(CH₂)_rO-; ; L₁, L₂, L₃, L₄, L₅, L₆ y L₇.

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 3 a 8 birradicales, y n es un número entero de 1 a 6. En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 5 a 8 birradicales. En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 6 a 8 birradicales. En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 6 a 7 birradicales.

45 En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 6 birradicales.

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es L₃ y L_c' es -C(=O)-(CH₂)_rC(=O)-. En otra realización más particular, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es L₃; L_b' se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-(CH₂)_rO-, -(CH₂)_rO-; y -(CH₂)_rNH- y combinaciones de los mismos; L_c' es -C(=O)-(CH₂)_rC(=O)-.

50

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L es un enlazador que es un birradical compuesto de 2 birradicales, y n=0.

55 En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es L₁₂ y L_c' es L₁₃.

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' es -C(=O)-NH-(CH₂)_rC(=O)- y L_c' es L₁₅.

60

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' está unido al radical Z mediante un enlace que es un enlace éster formado con el grupo C=O del lado izquierdo de las fórmulas L_a' dibujadas, y al radical L_b' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y 5 tioéster, formado con los grupos funcionales a la derecha de las fórmulas dibujadas.

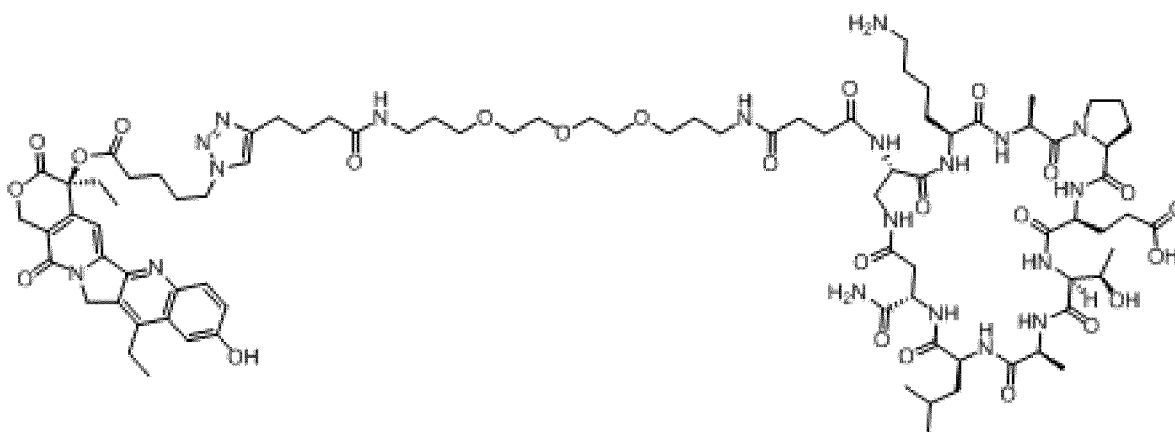
En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' está unido al radical Z mediante un enlace que es un enlace éster formado con el grupo C=O del lado izquierdo de las fórmulas L_a' dibujadas, y al radical L_b' mediante un enlace 10 químicamente factible que es un enlace amida, formado con los grupos funcionales a la derecha de las fórmulas dibujadas.

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_a' está unido al radical Z mediante un enlace que es un enlace 15 carbonato o un enlace carbamato formado con el grupo C=O del lado izquierdo de las fórmulas L_a' dibujadas, y al radical L_b' mediante un enlace químicamente factible que es un enlace amida (NH-CO o CO-NH), formado con los grupos funcionales a la derecha de las fórmulas dibujadas.

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, 20 los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_b' forma el enlace químicamente factible con el radical L_a' con los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_b' dibujadas; y L_b' está unido al radical L_c' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en la amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y 25 tioéster, formado con los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_b' dibujadas; en donde cuando n es mayor que 1, L_b' son iguales o diferentes y están unidos entre sí a través de un enlace químicamente factible seleccionado del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, éster disulfuro y tioéster; estando un terminal L_b' unido a L_a' y el otro terminal L_b' unido a L_c' .

En otra realización particular, en combinación de cualquiera de las realizaciones particulares anteriores o siguientes, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que L_c' está unido al birradical P mediante un enlace amida formado 30 con el grupo carbonilo del lado derecho de las fórmulas L_c' dibujadas y un grupo amino del primer aminoácido de la secuencia peptídica P, y al radical L_b' a través de un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formado con los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas dibujadas.

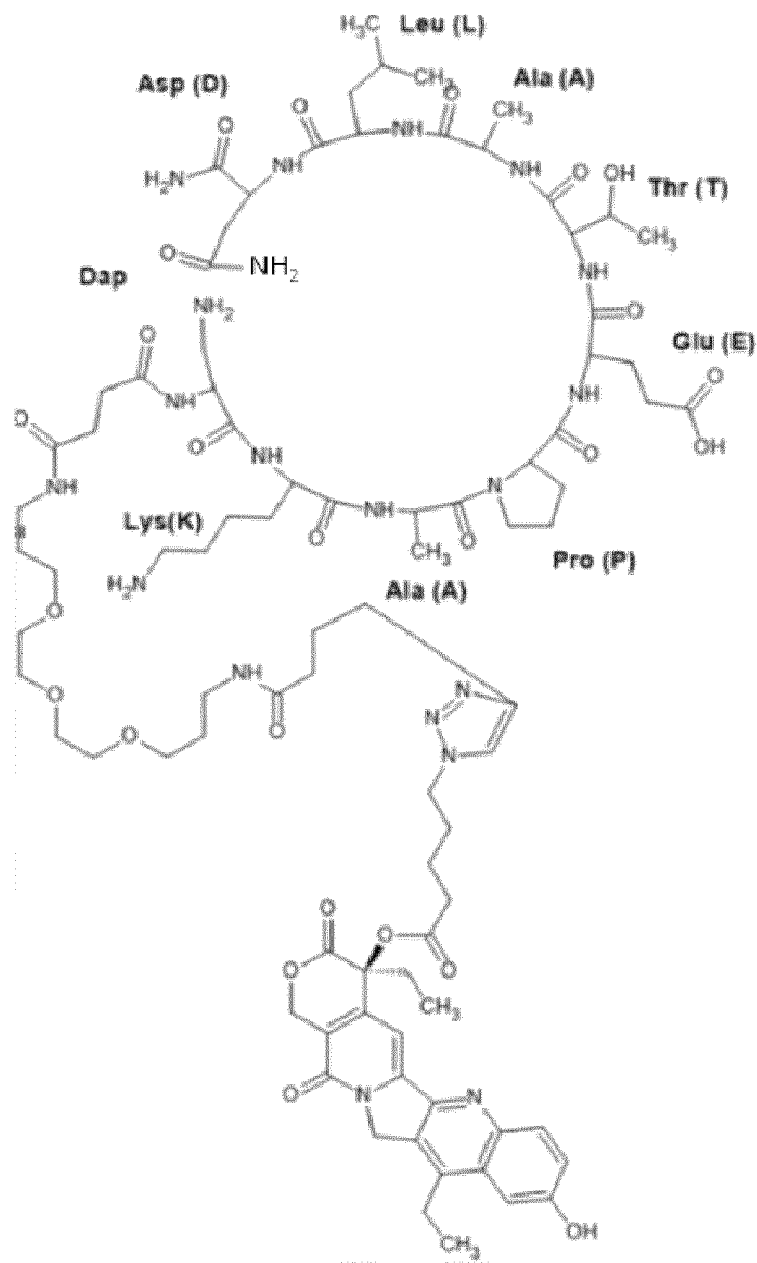
35 En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ia) siguiente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde en la fórmula (I) P es MiniAp4=DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D, Y= CONH₂, W=0, el enlazador es el enlazador A siguiente, y el SN38 está unido al enlazador por el hidroxilo (b).



40 (Ia)

Este compuesto también recibe el nombre de SN38-enlazador A-MiniAp4;

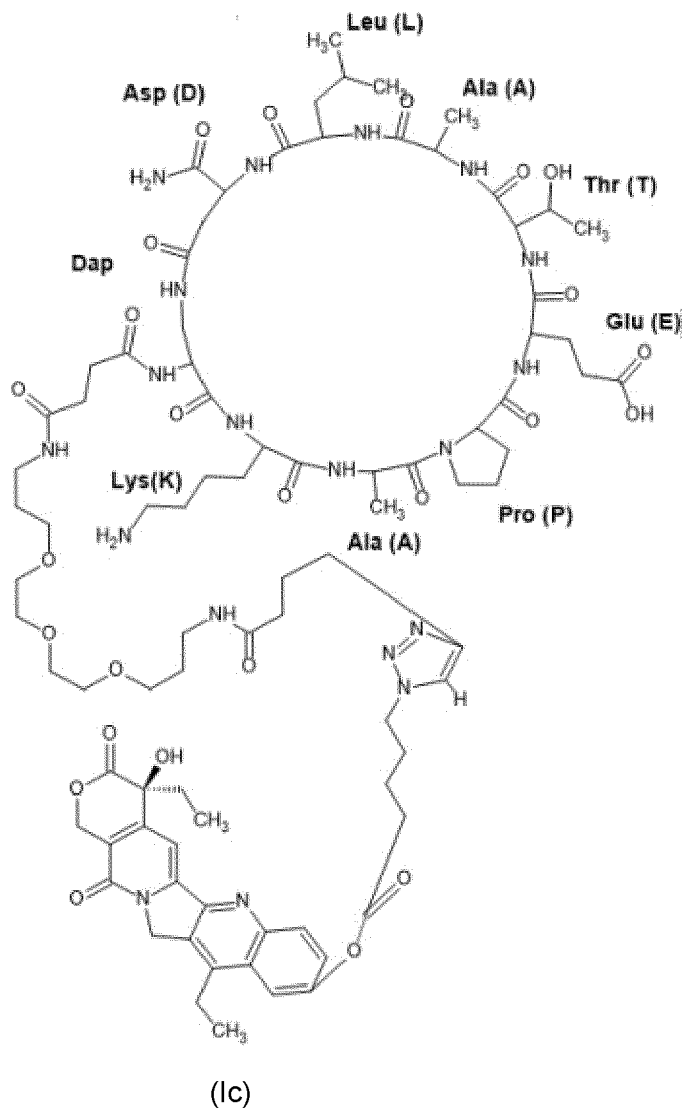
En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ib) siguiente o una sal 45 farmacéuticamente aceptable del mismo, donde en la fórmula (I) P es MiniAp4=DapKAPETALD lineal sin el enlace intrapeptídico entre Dap y D, Y= CONH₂, W=0, el enlazador es el enlazador A siguiente, y el SN38 está unido al enlazador por el hidroxilo (b).



(lb)

Este compuesto también se denomina en el presente documento G2B-001 lineal.

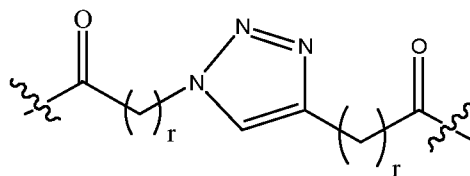
- 5 En otra realización particular, el compuesto de fórmula (l) es el compuesto de fórmula (lc) siguiente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde en la fórmula (l) P es MiniAp4=DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D, Y= CONH₂, W=0, el enlazador es el enlazador A siguiente, y el SN38 está unido al enlazador por el hidroxilo (a).



Este compuesto también se denomina en el presente documento G2B-003.

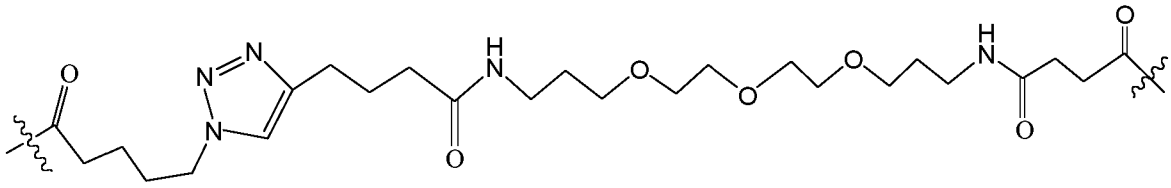
5 El enlazador A está formado por:

La': L_3 con $r = 4$ a la derecha y 3 a la izquierda:

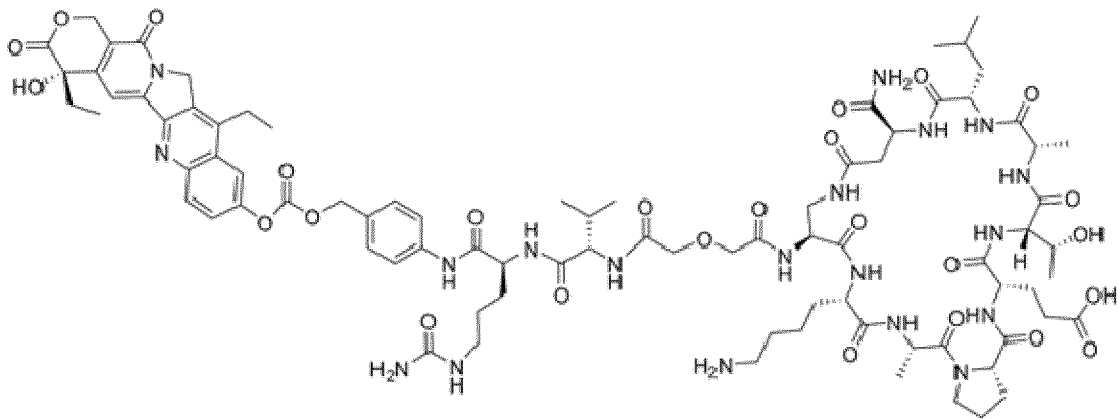


10

Lb': 1 unidad de birradical $-NH-(CH_2)_3-O-$, 2 unidades de birradical $-(CH_2)_2-O-$ y 1 unidad de birradical $-(CH_2)_3-NH-$; y Lc': $-C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)-$; y los birradicales se conectan como en el dibujo siguiente correspondiente al enlazador A:



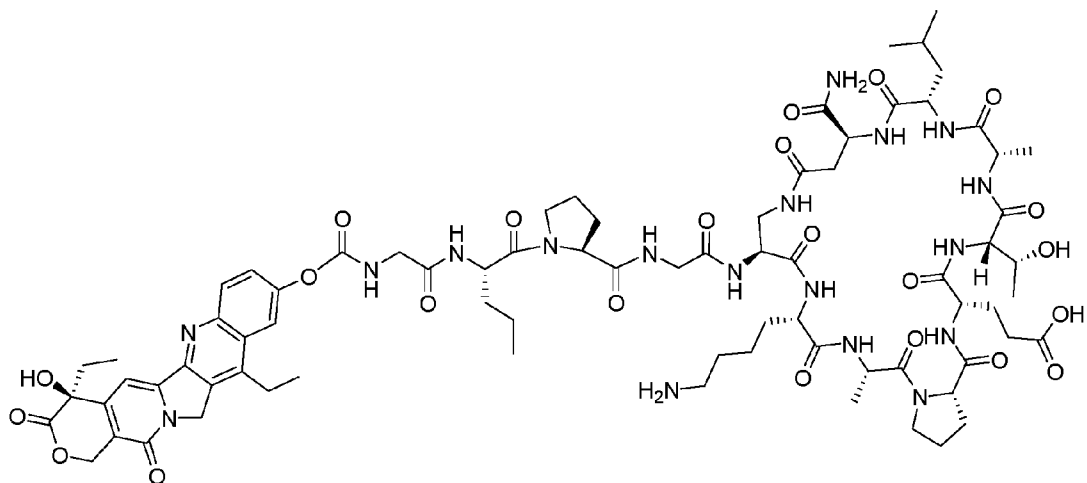
En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Id) siguiente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde en la fórmula (I) P es MiniAp4=DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D, Y= CONH₂, W=0, el enlazador es el enlazador C siguiente, y el SN38 está unido al enlazador por el hidroxilo (a).



(Id)

10 Este compuesto también se denomina en el presente documento G2B-004. El enlazador C está formado por La': L₁₂ y Lc': L₁₃ y n=0.

En otra realización particular, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (Ie) siguiente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde en la fórmula (I) P es MiniAp4=DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D, Y= CONH₂, W=0, el enlazador es el enlazador D siguiente, y el SN38 está unido al enlazador por el hidroxilo (a).



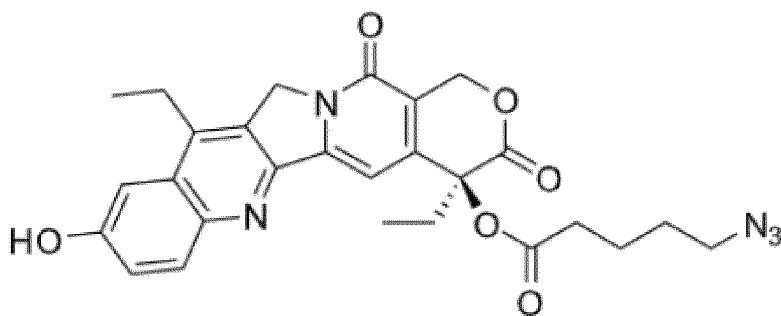
(Ie)

Este compuesto también se denomina en el presente documento G2B-005. El enlazador D está formado por La': -C(=O)-NH-(CH₂)_r-C(=O)- con r= 1, Lb': L₁₅ y n=0.

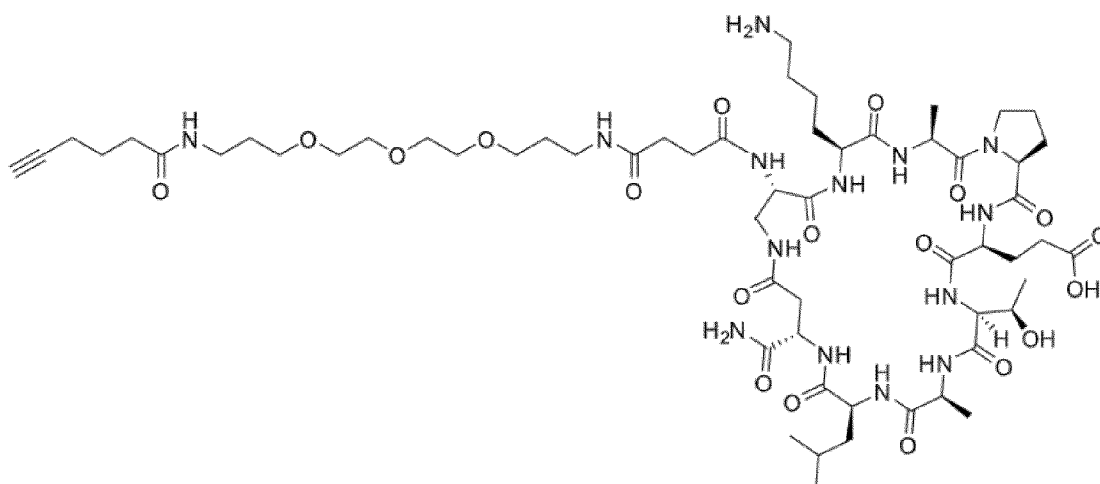
Los compuestos de fórmula (I) pueden generarse total o parcialmente por síntesis química. En el comercio se dispone de aminoácidos necesarios para la preparación de compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, mediante síntesis en fase líquida o, preferentemente, mediante síntesis peptídica en fase sólida, para la que existen varios procedimientos publicados (véase M. Amblard, *et al.*, "Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis. Molecular Biotechnology 2006, Vol. 33, págs. 239-254). Los compuestos de fórmula (I) también pueden prepararse mediante cualquier combinación de síntesis en fase líquida y/o síntesis en fase sólida. Por ejemplo, sintetizando el cuerpo del péptido P mediante síntesis en fase sólida y, posteriormente eliminando los grupos protectores en solución. La unión de SN-38 al enlazador L y al péptido P puede realizarse en fase sólida o en solución. La construcción del enlazador L también puede prepararse mediante cualquier combinación de síntesis en fase líquida y/o síntesis en fase sólida.

15 Los péptidos de la invención también pueden obtenerse mediante la generación de un molde de ADN y la subclonación en un vector de expresión (véase J.H. Lee *et al.* Eur. J. 30 Biochem. 2001. Vol. 268. págs. 2004-2012).

El compuesto SN38-enlazador A-MiniAp4 de fórmula (Ia) puede prepararse mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV) como se ha descrito anteriormente para obtener un compuesto de fórmula (Ia)



(III)



(IV)

25 La preparación de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse a partir del compuesto precursor, que contiene un resto básico o ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se

preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado farmacéuticamente aceptable en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos.

- 5 También forma parte de la invención la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) definido anteriormente, junto con cantidades apropiadas de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para impedir que se desarrollen, o aliviar en cierta medida, uno o más síntomas de la enfermedad que se esté tratando. La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención se determinará, por supuesto, según las circunstancias particulares del caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular a tratar y cuestiones similares.

- 15 La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como diluyentes o vehículos. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. La expresión "excipientes o transportadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con los tejidos u órganos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones en consonancia con una relación de beneficio/riesgo.

25 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en forma parenteral adecuada para inyección, infusión o implantación en el cuerpo.

Una característica importante de los compuestos de la presente invención es su bioactividad inhibidora del crecimiento celular de las líneas celulares tumorales probadas. Como se ilustra en los ejemplos, los compuestos de la presente invención muestran propiedades antitumorales en varias líneas celulares cancerosas.

- 30 Como ya se ha explicado, los datos comparativos proporcionados en la sección experimental muestran que, cuando el SN38 se conjuga a través del mismo enlazador (enlazador A) con otro péptido (THRre) de la fórmula siguiente se pierde parte/toda la actividad antitumoral y los resultados son aún peores si además se utiliza un enlazador diferente al de la invención (enlazador B). El enlazador B es $-C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)-$. El THRre tiene la siguiente fórmula: H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-CONH₂. No obstante, el compuesto ejemplificado de la presente invención mantiene inesperadamente actividad antitumoral contra varias líneas celulares de cánceres cerebrales y extracraneales, de forma similar a SN38, siendo muy superior al irinotecán con buena estabilidad en suero humano *in vitro*.

40 Por tanto, forman parte de la invención los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente, para su uso como un medicamento.

También son parte de la invención, los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, incluyendo los seres humanos, ya que son activos en todos los tipos de cáncer en los que se han probado. Este aspecto también puede formularse como el uso de compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se han definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un cáncer en un mamífero, incluyendo un ser humano. La invención también se refiere a un método de tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece cáncer o es susceptible de padecerlo, dicho método comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o de sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se ha definido anteriormente, junto con excipientes y/o transportadores farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) son para el uso definido anteriormente, donde el tratamiento del cáncer comprende el tratamiento de un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumores sólidos extracraneales, tumores oculares y tumores del SNC. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioma adulto, gliomas pediátricos, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, DIPG, neuroblastoma y rhabdomyosarcoma. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde los gliomas pediátricos se seleccionan del grupo que consiste en glioma pontino intrínseco difuso (DIPG), y glioma pediátrico de alto grado. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es un glioma pontino intrínseco difuso. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es retinoblastoma. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es sarcoma de Ewing. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es neuroblastoma. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es rhabdomyosarcoma. En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde el cáncer es un

glioma adulto.

En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, donde los compuestos son activos contra una línea celular cancerosa seleccionada del grupo que consiste en: A673, HSJD-DIPG-007, HSJD-DIPG-011, HSJD-GBM-001, Rd, RH4, HSJD-RBT-5, HSJD-RBT-7, HSJD-RBT-14, U373, U87, LAN-1, SK-N-JD, HSJD-NB-004, HSJD-NB-005, HSJD-NB-013 y HSJD-NB-016.

En otra realización particular, los compuestos son para su uso como se ha definido anteriormente, en donde el compuesto de fórmula (I) se administra mediante bolo intravenoso y/o infusión intravenosa.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse del mismo modo que otros agentes quimioterapéuticos conocidos, es decir, en combinación con otros tratamientos, ya sea de manera simultánea o secuencial, dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Pueden utilizarse solos o en combinación con otros compuestos bioactivos adecuados. Por tanto, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención son para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, incluyendo un ser humano en terapia combinada con un agente quimioterapéutico. Además, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención son para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, incluyendo un ser humano en combinación con un estabilizador de éster. Los estabilizadores de éster adecuados son los inhibidores de la carboxilesterasa. Los ejemplos de inhibidores de carboxilesterasas se encuentran en M. J. Hatfield y P. M. Potter, Exp. Opin. Ther. Pat. 2011, vol. 21(8), pág. 1159-1171.

En una divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) debe administrarse en combinación con un inhibidor de la carboxilesterasa. En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra simultáneamente con el inhibidor de la carboxilesterasa. En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra por separado, en cualquier orden, en un intervalo terapéuticamente eficaz.

En una divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) debe administrarse en combinación con otro agente quimioterapéutico. En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra simultáneamente con otro agente quimioterapéutico. En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra por separado, en cualquier orden, en un intervalo terapéuticamente eficaz.

En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) debe administrarse en combinación con otro agente quimioterapéutico y con un inhibidor de la carboxilesterasa.

En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra simultáneamente con otro agente quimioterapéutico y con un inhibidor de la carboxilesterasa.

En otra divulgación particular, el compuesto de fórmula (I) se administra por separado, en cualquier orden, en un intervalo terapéuticamente eficaz con otro agente quimioterapéutico y con un inhibidor de la carboxilesterasa.

A lo largo de toda la descripción y en las reivindicaciones la palabra "comprender" y variaciones de la misma, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. De manera adicional, la palabra "comprender" abarca el caso de "consistir en". Los objetos adicionales, ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. Los signos de referencia relacionados con los dibujos y puestos entre paréntesis en una reivindicación, son únicamente para intentar aumentar la inteligibilidad de la reivindicación y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la reivindicación. De manera adicional, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

50 Ejemplos

Los aminoácidos protegidos, las asas y las resinas fueron suministrados por: Luxembourg Industries (Tel-Aviv, Israel), Neosystem (Estrasburgo, Francia), CalbiochemNovabiochem AG (Laufelfingen, Suiza), Bachem AG (Bubendorf, Suiza) o Iris Biotech (Marktredwitz, Alemania). En la **Tabla 1** se resumen otros reactivos y disolventes utilizados. **Tabla 1** Proveedores comerciales y reactivos utilizados. El DCM se hizo pasar a través de una columna de Al₂O₃. La DMF se almacenó en tamices moleculares de 4Å y se burbujeó nitrógeno para eliminar los agentes volátiles.

Proveedor comercial	Reactivos y disolventes
Albatros Chem. Inc.	N-Hidroxibenzotriazol (HOBt)

(continuación)

Proveedor comercial	Reactivos y disolventes
Aldrich	Piperidina, piperazina, piridina, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5 -difetil-2H-tetrazolio (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0), fenil silano, dietilditiocarbamato de sodio, triisopropilsilano (TIS), 1,2-etanoditiol (EDT) diisopropilcarbodiimida (DIC), diisopropiletilamina (DIEA), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, tris(3-hidroxipropiltiazolilmetil)amina (THPTA), NaHCO ₃ , salmuera, clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, succinato de mono- <i>terc</i> -butilo, DBU, ascorbato de sodio, ácido 5-hexinoico, Fmoc-Asp(OAI)-OH, Fmoc-Dap(Alloc)-OH, HCl, MgSO ₄
Applied GL Biochem Shanghai	1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)
CEM	Resina ProTide de amida Rink, Resina ProTide Cl-TCP(Cl)
Envigo	Ratones atímicos desnudos
Carbosynth	SN38
IRIS Biotech	Todos los aminoácidos, salvo que se especifique lo contrario, ácido 5-azido-pentanoico (N ₃ -pen-OH), Fmoc-TTDS-OH, dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo,
Kalichem	Ácido trifluoroacético (TFA)
Merck	Sulfato de cobre (II) (CuSO ₄)
Novabiochem	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), Oxyma pure
Scharlau	Diclorometano (DCM), dimetilformamida, (DMF), metanol (MeOH), acetonitrilo (AcCN), DMSO, tbutilmetiléter (tBuMeO), NMP
SDS	Acetona, tolueno, dioxano
PCAS BioMatrix Inc.	Resina ChemMatrix®

Consideraciones generales sobre la síntesis manual: El alargamiento peptídico en fase sólida y otras manipulaciones en fase sólida, se llevaron a cabo manualmente en jeringas de polipropileno provistas de un disco poroso de polietileno.

- 5 Los disolventes y reactivos solubles se eliminaron por succión. Se llevaron a cabo lavados entre diferentes etapas sintéticas con dimetilformamida (DMF) (5 x 30 s) y diclorometano (DCM) (5 x 30 s) utilizando 10 ml de disolvente/g de resina cada vez.

- 10 Consideraciones generales sobre la síntesis asistida por microondas: La síntesis de péptidos en fase sólida asistida por microondas se llevó a cabo en un sintetizador de péptidos por microondas automatizado Liberty Blue utilizando resina Protide de amida H-Rink (carga: 0,56 mmoles/g). El péptido lineal se sintetizó a escala de 0,5 mmol utilizando un exceso de 5 de Fmoc-aminoácido (0,2 M) en relación con la resina.

- 15 Pruebas de identificación: La prueba utilizada para la identificación y el control de la síntesis fue la siguiente: A) Ensayo colorimétrico de Kaiser para la detección de aminas primarias unidas en fase sólida (E. Kaiser *et al.*, Anal. Biochem. 1970, vol. 34, págs. 595-598); B) ensayo del éster p-nitrofenílico para aminas secundarias unidas a la fase sólida (A. Madder *et al.*, Eur. J. Org. Chem. 1999, págs. 2787-2791).

- 20 Protocolos utilizados durante la síntesis manual de los compuestos: Los compuestos se sintetizaron a una escala de 100 µmol utilizando los siguientes métodos y protocolos: La resina para la síntesis manual se seleccionó en función del grupo Y: Si Y es un OH, el extremo será COOH, se elegirá la resina de cloruro de 2-clorotritilo entre otras disponibles. Si Y es un NH₂, el extremo será CONH₂, Se elegirá la resina MBHA de amida Rink entre otras disponibles.

- 25 Acondicionamiento inicial de la resina: La resina se acondicionó lavando con MeOH (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), TFA al 1 % en DCM (1 x 30 s y 2 x 10 min), DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), DIEA al 5 % en DCM (1 x 30 s, 2 x 10 min), DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s).

- 30 Eliminación del grupo Fmoc: La eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), se realizó con piperidina al 20 % (v/v) en DMF utilizando un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina).

Métodos de acoplamiento descritos para escala de 100 µmol:

- 35 Método de acoplamiento 1: El aminoácido protegido (4 eq., 400 µmoles), TBTU (4 eq., 400 µmoles, 128 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina) se añadieron secuencialmente a la resina, posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 800 µmoles, 136 µl). Durante 1 h se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó

ES 3 010 582 T3

por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. Si el aminoácido para desproteger fue una prolina, se aplicó un tratamiento adicional con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

Método de acoplamiento 2: Se añadieron secuencialmente a la resina el aminoácido protegido (4 eq. 400 µmoles), PyBOP (4 eq., 400 µmoles, 208 mg), HOAt (12 eq., 1,2 mmoles, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq., 1,2 mmols, 204 µl). Durante 1 h se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. Si el aminoácido para desproteger fue una prolina, se aplicó un tratamiento adicional con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

Método de acoplamiento 3: Se añadieron secuencialmente a la resina el aminoácido protegido (4 eq. 400 µmoles), PyBOP (4 eq., 400 µmoles, 208 mg), HOBt (12 eq., 1,2 mmoles, 162 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq., 1,2 mmols, 204 µl). Durante 1 h se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. Si el aminoácido para desproteger fue una prolina, se aplicó un tratamiento adicional con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

Método de acoplamiento 4, escala 100 µmoles: El aminoácido protegido (3 eq., 300 µmoles), DIC (3 eq., 300 µmoles, 46 µl) y Oxyma (3 eq., 300 µmoles, 43 mg) en DCM/DMF (1:1). Durante 45 min se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. Si el aminoácido para desproteger fue una prolina, se aplicó un tratamiento adicional con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

Método de acoplamiento 5, escala 100 µmoles: El aminoácido protegido (3 eq., 300 µmoles), DIC (3 eq., 300 µmoles, 46 µl) y HOBt (3 eq., 300 µmoles, 41 mg) en DCM/DMF (1:1). Durante 45 min se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. Si el aminoácido para desproteger fue una prolina, se aplicó un tratamiento adicional con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

Protocolos utilizados durante la síntesis automatizada asistida por microondas: Los compuestos se sintetizaron a escala de 500 µmol utilizando los siguientes métodos y protocolos: La resina para la síntesis automatizada asistida por microondas se seleccionó en función del grupo Y: Si Y es un OH, el extremo será COOH, se elegirá la resina ProTide Cl-TCP(Cl) entre otras disponibles. Si Y es un NH₂, el extremo será CONH₂, se elegirá la resina ProTide de amida Rink entre otras disponibles.

Acondicionamiento inicial de la resina: La resina se acondicionó lavando con MeOH (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), TFA al 1 % en DCM (1 x 30 s y 2 x 10 min), DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s), DCM (5 x 30 s), DIEA al 5 % en DCM (1 x 30 s, 2 x 10 min), DCM (5 x 30 s), DMF (5 x 30 s).

Condiciones de acoplamiento y desprotección para la síntesis automatizada de péptidos asistida por microondas:

55 Condiciones de acoplamiento:

Preferencia de CEM	Reactivos	Ciclo	Método de microondas	Excepciones
1	AA/DIC/Oxyma en DMF	Acoplamiento simple	Estándar	His: Utilizar acoplamiento simple 50 °C 10 min Arg: doble acoplamiento

ES 3 010 582 T3

Método	Tiempo de rampa	Tiempo total	Temp. máx.
Acoplamiento estándar	20-30 s	1:05	90 °C
50 °C MW	1. N/D 2. 30-75 s	1. 2:00 2. 4:00	1. Temp. amb. 2. 50 °C
Acoplamiento de Arg	1. N/D 2. 30-75 s	1. 25:00 2. 2:00	1. Temp. amb. 2. 75 °C

Condiciones de desprotección:

Preferencia de CEM	Cóctel de desprotección	Método de microondas
1	Piperazina al 10 % (p/v) en 10:90 (EtOH/NMP)	Estándar
2	Piperidina al 20 % (v/v) en DMF o NMP	Estándar

5

Método	Tiempo de rampa	Tiempo total	Temp. máx.
Desprotección estándar	20-30 s	1:05	90 °C

Métodos para la ciclación de la secuencia peptídica P:

Método de ciclación 1: enlace disulfuro o diselenuro: La ciclación se realizó en solución tras la separación de la resina o en resina tras la desprotección selectiva de los restos Cys, Sec o Pen. El péptido se disolvió a una concentración de 100 µM en tampón de bicarbonato de amonio acuoso 10 mM y a un pH de 8,0. La solución se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Después de esto, el producto se acidificó con TFA a un pH de 2-3, se congeló y se liofilizó.

15 Método de ciclación 2: enlace amida: La ciclación se realizó sobre resina. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. La amina N-terminal se protegió con un grupo protector Boc utilizando Boc₂O (3 eq, 1000 µmol, 56 mg) y DIEA (30 eq, 3000 µmol, 240 µl). Los grupos OAl y Alloc se desprotegeron primero mediante la adición de tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq, 10 µM, 12 mg), fenilsilano (10 eq, 1000 µmol, 123 mg) en DCM (3 x 15 min). La resina se lavó con dietilcarbamatato de sodio 0,02 M en DCM (3 x 5 min). El acoplamiento del grupo amino de Dap y el grupo carboxilato del ácido aspártico se logró después mediante la adición de PyBOP (4 eq, 400 µmoles, 208 mg), HOAt (12 eq, 1,2 mmol, 163 mg), DMF (1-3 ml/g de resina) y DIEA (12 eq, 1,2 mmol, 204 µl). El acoplamiento se permitió durante 1,5 h y se repitió durante la noche.

25 Método de ciclación 3: enlace amida: La ciclación se realizó sobre resina. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. La amina N-terminal se protegió con un grupo protector Boc utilizando Boc₂O (3 eq, 1000 µmol, 56 mg) y DIEA (30 eq, 3000 µmol, 240 µl). Los grupos OAl y Alloc se desprotegeron primero mediante la adición de tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq, 10 µM, 12 mg), fenilsilano (10 eq, 1000 µmol, 123 mg) en DCM (3 x 15 min). La resina se lavó con dietilditiocarbamatato de sodio 0,02 M en DCM (3 x 5 min). El acoplamiento del grupo amino de Dap y el grupo carboxilato del ácido aspártico se consiguió entonces mediante 2 ciclos de 30 min de 4 equivalentes de Oxyma (400 µmoles, 57 mg) y 4 de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (400 µmoles, 61 µl).

35 Método de ciclación 4: enlace amida: La ciclación se realizó sobre resina. El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. La amina N-terminal se protegió con un grupo protector Boc usando Boc₂O (3 eq., 1000 µmoles, 56 mg) y DIEA (30 eq., 3000 µmoles, 240 µl). Los grupos OAl y Alloc se desprotegeron primero por adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq., 10 µM, 12 mg), fenil silano (10 eq., 1000 µmoles, 123 mg) en DCM (3 x 15 min). La resina se lavó con dietilditiocarbamatato de sodio 0,02 M en DCM (3 x 5 min). El acoplamiento del grupo amino de Dap y el grupo carboxilato del ácido aspártico se consiguió entonces mediante 2 ciclos de 1 hora de 4 equivalentes de DIC (400 µmoles, 61 µl) y 4 de HOBt (400 µmoles, 54 mg).

Métodos generales para la construcción del enlazador L:

45 Método general para la formación de disulfuros: el enlace disulfuro puede lograrse por reacción de dos tioles. Los tioles se disuelven a una concentración de 100 µM en tampón acuoso de bicarbonato amónico 10 mM y pH 8,0 y la solución se agita intensamente durante 24 h a temperatura ambiente. Después de esto, la solución se acidificó con TFA a un pH de 2-3, se congeló y se liofilizó.

Métodos generales para la formación de tioéteres: El enlace tioéter se consigue por reacción de un grupo bromoacetílico *N*-terminal con un tiol de cisteína como se describe en P.L. Barker *et al.* J. Med. Chem. 1992. vol 35. págs. 2040-2048.

5 Métodos generales para la formación de éteres: La formación de éteres puede lograrse mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un compuesto haloalquilo, preferentemente en condiciones básicas como se describe en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, Inc. páginas 26-29.

10 Métodos generales para la formación de ésteres: La formación de ésteres puede lograrse mediante la reacción de un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico utilizando las condiciones típicas de esterificación, tal como la esterificación de Fischer en presencia de catálisis ácida, o alternativamente con la reacción del grupo hidroxilo con el cloruro ácido correspondiente, como se describe en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, Inc. páginas 271-279

15 Métodos generales para la formación de tioésteres: El enlace tioéster se consigue mediante la reacción de un tiol con un ácido carboxílico como se describe en M. Kazemi *et al.*, Journal of Sulfur Chemistry, 2015, vol. 36:6, págs. 613-623.

20 Métodos generales para la formación de uretanos: La reacción del grupo hidroxilo con un isocianato puede producir el uretano correspondiente, como se describe en este caso M. T. Nguyen *et al.*, J. Org. Chem. 1998, 63, vol. 20, págs. 6878-6885.

25 Métodos generales para la formación de éteres de sililo: La reacción de un grupo hidroxilo con un haloalquilo sililo produce el correspondiente éter de sililo. Suele ser necesario un agente secuestrante de ácidos, como se describe en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, Inc. páginas 456-463.

30 Métodos generales para la formación de sulfonatos: La reacción de un grupo hidroxilo con un haluro de alquilo o aril sulfonilo produce el éster de sulfonato correspondiente como se describe en F. David *et al.*, Org. Process Res. Dev. 2010, 14, 4, 999-1007.

35 Métodos generales para la formación de fosfatos: La reacción de un grupo hidroxilo con un éster fosfato dialquilo o diarilo que tiene un grupo hidroxilo en condiciones de deshidratación o utilizando las condiciones de reacción de Mitsunobu puede formar el éster de fosfato correspondiente en el que uno de los sustituyentes es la cadena unida al grupo hidroxilo.

40 Métodos generales para la formación de cetales: Los cetales pueden formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un compuesto alquilo halometileno, o mediante la adición de un grupo hidroxilo a un dihidropirano o dihidrofurano sustituido en condiciones ácidas, como se describe en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, Inc. páginas 69-77.

45 Métodos generales para la formación de hemicetales: El contacto de un grupo hidroxilo con un aldehído puede producir la formación del hemicetal correspondiente, como se describe en este caso <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/chemistry/organic-chemistry-ii/aldehydes-and-ketones/reactions-of-aldehydes-and-ketones>.

50 Métodos generales para la formación de carbamatos: Los carbamatos pueden formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un haloformato o un isocianato, como se describe en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, Inc., páginas 371-374.

Métodos generales para la formación de carbonatos: Los carbamatos pueden formarse mediante la reacción de SN3 con PNPC, como se describe en Eur J Pharm Biopharm, 2017, vol. 115, págs. 149-158 o trifosgeno como se describe en J. Med. Chem. 2008, vol. 51, págs. 6916-6926.

55 Acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH: El acoplamiento del Fmoc-TTDS-OH (2 equivalentes), se consiguió mediante o bien 2 ciclos de 30 min de 4 equivalentes de Oxyma y 4 de N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC) en DMF o bien 4 equivalentes de DIC y 4 de HOBT en DCM durante 2 h. A continuación se eliminó el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno.

60 Acoplamiento del ácido 5-hexinoico: El acoplamiento del ácido 5-hexinoico (2 eq, 200 μ moles, 23 mg), se consiguió mediante o bien 2 ciclos de 30 min de 4 equivalentes de Oxyma (400 μ moles, 57 mg) y 4 de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (400 μ moles, 61 μ l) en DMF:DCM (1:1) o 4 equivalentes de DIC (400 μ moles, 61 μ l) y 4 de HOBT (400 μ moles, 54 mg) en DMF:DCM 1:1 en DCM durante 4 h o 2 equivalentes de PyBOP (400 μ moles, 208 mg) en DMF:DCM 1:1, 6 equivalentes de HOAt (600 μ moles, 81.5 mg) y 6 equivalentes de DIEA (600 μ moles, 102 μ l)

65

durante 1,5 h en DMF. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.

- 5 Acoplamiento de anhídrido diglicólico: El acoplamiento del anhídrido diglicólico (10 eq., 1000 μ moles, 116 mg), se consiguió mediante 2 ciclos de 60 min de 10 equivalentes de DIEA (1000 μ moles, 174 μ l) en DMF. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.
- 10 Métodos generales para la separación de la resina: Escisión final de la resina y desprotección de la cadena lateral: Se llevó a cabo tratando la resina con TFA (95 %), H₂O (2,5 %) y TIS (2,5 %) (2 h). Al producto obtenido se le añadió *tert*-butilmetiléter y la mezcla se centrifugó (3 x 8 min). Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O, MeCN y TFA (1000: 1000: 1). El producto se filtró y se congeló.
- 15 Métodos generales para la caracterización de los compuestos: Los compuestos se caracterizaron mediante columna UPLC (sistema Acquity de clase alta (detector PDA, administrador de muestras FNT y administrador de disolventes cuaternarios, Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μ m), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (0,036 % TFA) y H₂O (TFA al 0,045 %). En todos los casos, se utilizaron gradientes lineales de 2 minutos) y espectrometría UPLC-MS (Waters high class (detector PDA, administrador de muestras FNT y administrador de disolventes cuaternarios) acoplada a una fuente de iones de electropulverización ESI-MS Micromass ZQ y utilizando el software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA). Utilizando una columna BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 μ m, Waters). El caudal fue de 0,6 ml/min, y se utilizaron como disolventes MeCN (0,07 % de ácido fórmico) y H₂O (ácido fórmico al 0,1 %). Las muestras se analizaron con ionización positiva: el voltaje de la pulverizadora de iones fue de 30 V y la temperatura del capilar fue de 1 kV). La masa exacta se obtuvo mediante espectrómetro de masas: LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific)
- 20 con introducción de la muestra en infusión directa (Automated NanoElectrospray). El NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY, EE.UU.) aspiró las muestras de una placa de 384 pocillos (protein Lobind) con puntas de pipeta conductoras desechables e infundieron las muestras a través del Chip nanoESI (que consiste en 400 boquillas en una matriz de 20 x 20) hacia el espectrómetro de masas. La tensión de pulverización fue de 1,70 kV y la presión de suministro fue de 344,74 kPa (0,50 psi); la ionización fue NanoESI, ionización positiva.

30 Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance III de 600 MHz equipado con una criosonda TCI. Las muestras se prepararon disolviendo los compuestos en un 90 % de H₂O/10 % de D₂O a 3-4 mM y el pH se ajustó a 2-3. Los desplazamientos químicos se referenciaron al 3-(trimetilsilil)propanesulfonato de sodio (DSS) interno. La supresión de la señal de agua se consiguió mediante el esculpido de la excitación. Las asignaciones específicas de residuos se obtuvieron a partir de experimentos de espectroscopia 2D total correlacionada (TOCSY) y espectroscopia de correlación (COSY), mientras que la espectroscopia de efecto Overhauser nuclear 2D (NOESY) permitió asignaciones específicas de secuencia. Las resonancias ¹³C se asignaron a partir de espectros 2D ¹H¹³C HSQC. Todos los experimentos se realizaron a 298 K excepto los espectros NOESY que se adquirieron a 278 K. Los coeficientes de temperatura de protones de las amidas se determinaron a partir de una serie de espectros unidimensionales adquiridos entre 278 y 308 K. Los tiempos de mezcla de TOCSY y NOESY fueron de 70 y 250 ms, respectivamente.

Ejemplo 1: Preparación de (4,11-dietil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-9-il) carbonato de (S)-*tert*-butilo

- 45 En un matraz de 250 ml, se añadieron 1,5 g de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN38), 1,3 equivalentes de dicarbonato de di-*tert*-butilo (1,15 ml) y exceso de piridina seca (9 ml) en 150 ml de DCM seco. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con HCl (0,5 N)x3, NaHCO₃x1 saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con MgSO₄ y los disolventes se eliminaron al vacío. No se realizó ninguna otra
- 50 purificación. UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μ m), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,89 min. Rendimiento: 96 %, [M+H]_{exp}⁺: 493,5 Da. RMN ¹H (400MHz, cloroformo-*d*) δ 7,81 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,25-7,20 (m, 1H), 6,91-6,85 (m, 1H), 5,32 (d, *J* = 16,3, 1H), 4,86 (d, *J* = 1Hz, 6H), 3,85 (s, 1H), 2,73 (c, *J* = 7,7 Hz, 2H), 1,60 (s, 1H), 1,57-1,41 (m, 3H), 1,21 (s, 10H),
- 55 0,99 (t, *J* = 7,7 Hz, 3H), 0,61 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo 2: Preparación de 5-azidopentanoato de (S)-9-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)-4,11-dietil-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo

- 60 En un matraz de fondo redondo, se purgaron 400 mg de (4,11-dietil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-9-il) carbonato de (S)-*tert*-butilo (Ejemplo 1), 1,6 equivalentes de ácido 5-azido-pentanoico (193 mg) con N₂ antes de disolverse en DCM seco. La mezcla se enfrió a 0 °C. A continuación se añadieron 1,4 equivalentes de clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (218 mg) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora y a t.a. Durante la noche. La mezcla se lavó con NaHCO₃ saturado x3, HCl(O,1N)x2 y salmuera.
- 65 A continuación, la capa orgánica se secó con MgSO₄ y se eliminó al vacío. El compuesto se utilizó sin purificación

adicional. $[M+H]_{\text{exp}}^+$: 618,36 Da.

Ejemplo 3: Preparación de 5-azidopentanoato de (S)-4,11-dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo (modificación de SN38 con una azida como resultado de los Ejemplos 1-

5 3)

En un matraz de fondo redondo, se agitó 1,5 g de 5-azidopentanoato de (S)-9-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-4,11-dietil-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo (Ejemplo 2) en 50 ml de HCl (4N en dioxano) durante 2 horas a t.a. Posteriormente, el disolvente se eliminó al vacío y la mezcla en bruto se purificó con sílice utilizando (DCM/MeOH (10 %)) con una pureza superior al 95 %. Rendimiento total del ejemplo 1: 8 %, $[M+H]^+$: 518,58 Da. UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 min utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,819 min. $[M+H]_{\text{exp}}^+$: 518,58 Da. RMN ¹H (400MHz, cloroformo-*d*) δ 1,00 (t, 3H), 1,38 (t, 3H), 1,65 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 3,13 (c, 3H), 3,27 (td, 2H), 5,20 (s, 2H), 5,39-5,72 (dd, 2H), 7,42 (d, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,62 (dd, 1H), 8,45 (d, 1H).

Ejemplo 4: Preparación de *terc*-butilsuccinato de (S)-9-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-4,11-dietil-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo

20 Se añadieron 1 mmol de (4,11-dietil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-9-ilo) de (S)-*terc*-butilo del Ejemplo 1 y 1,5 equivalentes de succinato de mono-*terc*-butilo a un matraz de fondo redondo y se purgó con N₂. Los reactivos se disolvieron en 20 ml de DCM seco y se enfriaron a 0 °C. A continuación se añadió clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora y durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ saturado x3, HCl(O,IN)x2 y salmuera. Después se secó con MgSO₄, se evaporaron los volátiles y se secó. El compuesto se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento 72 %. RMN ¹H (400MHz, cloroformo-*d*) δ 0,92 (t, 3H), 1,30 (s, 9H), 1,33 (m, 3H), 1,38 (c, 2H), 1,42 (s, 2H), 1,55 (s, 9H), 2,14 (ddc, 2H), 2,49 (td, 2H), 2,69 (m, 2H), 2,86 (dd, 2H), 3,09 (m, 2H), 5,20 (s, 2H), 5,32 (d, 2H), 5,61 (d, 2H).

30 Ejemplo 5: Preparación del ácido (S)-4-((4,11-dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo)oxi)-4-oxobutanoico (modificación de SN38 con ácido succínico como resultado de los ejemplos 4 y 5)

En un matraz de fondo redondo, se agitó *terc*-butilsuccinato de (S)-9-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-4,11-dietil-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo (Ejemplo 4) en 20 ml de HCl (4 N en dioxano) durante 2 horas a t.a. Posteriormente, el disolvente se evaporó y la mezcla se purificó con el Teledyne-ISCO, gradiente 0-50. Se obtuvo el compuesto deseado con un rendimiento del 32 % y una pureza superior al 95 %. Rendimiento 32 %. UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,498 min. $[M+H]_{\text{exp}}^+$: 491,27Da. RMN ¹H (400MHz, cloroformo-*d*) δ 1,02 (t, 3H), 1,39 (t, 3H), 2,22 (m, 2H), 2,61 (t, 2H), 2,84 (m, 2H), 3,16 (c, 2H), 5,27 (s, 2H), 5,45 (d, 2H), 5,60 (d, 2H), 7,33 (s, 1H), 7,42 (dc, 1H), 8,03 (d, 1H).

45 Métodos para la cicloadición alquino-azida: El acoplamiento de la cicloadición alquino-azida (reacción Click) se realizó en solución siguiendo el protocolo descrito en S.F.M. van Dongen *et al.*; Bioconjugate Chem. 2009, vol. 20, págs. 20-23.

Esta reacción se realizó sin microondas siguiendo el procedimiento descrito en lumiprobe (<https://www.lumiprobe.com/protocols/click-chemistry-dna-labeling>) Sin embargo, esta reacción tardó unos 2 días en completarse. El Cu se utilizó con el ligando THPTA. Como SN38-N₃ no era soluble en H₂O, se realizó la reacción sólo utilizando DMF en lugar de tampón y DMSO porque no es soluble en agua o incluso en la mezcla (agua/DMSO).

Alternativamente, la cicloadición alquino-azida (reacción Click) de alquino-TTDS-DapKAPETALD con SN38-N₃ se realizó usando microondas: A un vial de microondas de 10 ml se añadieron SN38-N₃(1,5 eq.), alquino-TTDS-DapKAPETALD (1 eq.), CuTHPTA (0,15 eq.) y ascorbato sódico (0,3 eq.) y se disolvieron en 3 ml de DMF. La mezcla se agitó de 2 a 4 horas con microondas (discover SP MW) asistida a 30 °C durante toda la reacción. La mezcla en bruto se purificó con HPLC semipreparativa (C18).

60 Preparación de reactivos para la cicloadición alquino-azida (química Click): 100 mM de solución madre de cobre (II)-THPTA en DMSO al 55 %: se disolvieron 50 mg de sulfato de cobre (II) pentahidratado en 1 ml de agua destilada y 116 mg de ligando tris(3-hidroxiopropil)triazolilmetil)amina (THPTA) en 1,1 ml de DMSO. Después, se mezclaron las dos soluciones. Solución madre de ácido ascórbico 5 mM: se disolvieron 18 mg de ácido ascórbico en 20 ml de agua destilada.

65 Método general de purificación y caracterización de productos: Los productos brutos se purificaron por RP-HPLC a

escala semipreparativa y se caracterizaron por UPLC (sistema Acquity high-class (detector PDA, administrador de muestras FNT y administrador de disolventes cuaternarios, Columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 µm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (0,036 % TFA) y H₂O (TFA al 0,045 %). En todos los casos, se utilizaron gradientes lineales de 2 minutos) y espectrometría UPLC-MS (Waters high class (detector PDA, administrador de muestras FNT y administrador de disolventes cuaternarios) acoplada a una fuente de iones de electropulverización ESI-MS Micromass ZQ y utilizando el software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA). Utilizando una columna BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 µm, Waters). El caudal fue de 0,6 ml/min, y se utilizaron como disolventes MeCN (0,07 % de ácido fórmico) y H₂O (ácido fórmico al 0,1 %). Las muestras se analizaron con ionización positiva: el voltaje de la pulverizadora de iones fue de 30 V y la temperatura del capilar fue de 1 kV). La masa exacta se obtuvo mediante espectrómetro de masas: LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific) con introducción de la muestra en infusión directa (Automated Nanoelectrospray). El NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY, EE.UU.) aspiró las muestras de una placa de 384 pocillos (protein Lobind) con puntas de pipeta conductoras desechables e infundieron las muestras a través del Chip nanoESI (que consiste en 400 boquillas en una matriz de 20 x 20) hacia el espectrómetro de masas. La tensión de pulverización fue de 1,70 kV y la presión de suministro fue de 344,74 kPa (0,50 psi); la ionización fue NanoESI, ionización positiva. Todos los péptidos se obtuvieron con una pureza superior al 95 %.

Ejemplo 6: Preparación de Hexinoico-TTDS-Dap-Lvs-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Asp-NH₂ (hexinoico-TTDS-SEQ ID NO: 7) con un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de Dap y el ácido carboxílico de la cadena lateral de Asp.

Para el acoplamiento manual con la resina del primer aminoácido protegido, se aplicó el método de acoplamiento 4 utilizando Fmoc-Asp(OAI)-OH (118,5 mg). Los siguientes aminoácidos se acoplaron secuencialmente de la siguiente manera utilizando el método de acoplamiento 4:

Orden de adición	Código	Aminoácido	MW	m (mg)	eq
1	D	Fmoc-L-Asp(OAI) -OH	395,4	118,5	3
2	L	Fmoc-L-Leu-OH	353,4	105,9	3
3	A	Fmoc-Ala-OH H ₂ O	329,3	98,7	3
4	T	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	397,5	119,1	3
5	E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH H ₂ O	443,5	132,9	3
6	P	Fmoc-L-Pro-OH H ₂ O	355,4	106,5	3
7	A	Fmoc-Ala-OH H ₂ O	329,3	98,7	3
8	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	140,4	3
9	Dap	Fmoc-L-Dap(Alloc)-OH	410,4	123	3

Utilizando 46 µl de DIC y 43 mg de Oxyma en DMF/DCM (1:1). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 45 min. Después de cada acoplamiento se eliminó el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno. Dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina). La ciclación se realizó en resina siguiendo el método de ciclación 2: El grupo Fmoc se eliminó con una solución al 20 % de piperidina en DMF (v/v) mediante un tratamiento de 30 s y dos tratamientos de 10 minutos. La amina N-terminal se protegió con un grupo protector Boc usando Boc₂O (3 eq., 1000 µmoles, 56 mg) y DIEA (30 eq., 3000 µmoles, 240 µl). Los grupos OAI y Alloc se desprotegeron primero por adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq., 10 µM, 12 mg), fenil silano (10 eq., 1000 µmoles, 123 mg) en DCM (3 x 15 min). La resina se lavó con dietilcarbamato de sodio 0,02 M en DCM (3 x 5 min). El acoplamiento del grupo amino de Dap y el grupo carboxilato del ácido aspártico se logró después mediante la adición de PyBOP (4 eq., 400 µmoles, 208 mg), HOAt (12 eq., 1,2 mmoles, 163 mg), DMF (1-3 ml/g de resina) y DIEA (12 eq., 1,2 mmoles, 204 µl). El acoplamiento se permitió durante 1,5 h y se repitió durante la noche.

Acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH: El acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH (2 equivalentes, 200 µmoles, 108,53 mg), se consiguió mediante 4 equivalentes de DIC (400 µmoles, 61 µl) y 4 de HOBT (400 µmoles, 54 mg) en DCM durante 2 h. Seguido de la eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno.

Acoplamiento del ácido 5-hexinoico: Para el acoplamiento del ácido 5-hexinoico al péptido anclado sobre la resina, se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron secuencialmente ácido hexinoico (4 eq., 400 µmoles, 45 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq., 400 µmoles, 208 mg) y HOAt (12 eq., 1,2 mmoles, 163 mg) a la resina, seguidos de la adición de 12 eq. de DIEA (1,2 mmoles, 204 µl). Durante 1,5 h, se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual

intermitente. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.

5 A continuación, el péptido se escindió y se liofilizó. Caracterización del producto. UPLC de fase inversa: gradiente lineal del 20 al 60 % de MeCN en H₂O en 2 min utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 µm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 0,939 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1308,15 Da; Rendimiento (síntesis y purificación): 7,5 %.

10 Ejemplo 7: Preparación del compuesto de fórmula (Ia), SN38-enlazador A-MiniAp4

A partir de Hexinoico-TTDS-MiniAp4 preparado como en el ejemplo 6, y utilizando SN38-N₃ preparado como en el ejemplo 3, se siguió el siguiente protocolo para obtener el compuesto de fórmula (Ia) también denominado SN38-enlazador A -MiniAp4:

15

A un vial de microondas de 10 ml 1,5 eq. de 5-azidopentanoato de (S)-4,11-dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1 H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo, se añadieron 1 eq. de alquino-TTDS-DapKAPETALD, 0,15 eq. de CuTHPTA y 0,3 eq. de ascorbato sódico y se disolvieron en 3 ml de DMF. La mezcla se agitó de 2 a 4 horas con MW (CEM discover SP MW) asistida a 30 °C durante toda la reacción. El producto en bruto se purificó por RP-

20

HPLC a escala semipreparativa. Se obtuvo el compuesto con una pureza superior al 95 %. Caracterización del producto: UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 µm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,462 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1824,76 Da; Rendimiento (síntesis y purificación): 30 %.

25

Ejemplo comparativo 1: SN38-enlazador A-THRre

En este ejemplo comparativo, todos los aminoácidos utilizados son D-aminoácidos. Para el acoplamiento manual con la resina del primer aminoácido protegido, se aplicó el método de acoplamiento 4 utilizando Fmoc-D-Thr(tBu)-OH (159 mg). Los siguientes aminoácidos se acoplaron secuencialmente de la siguiente manera utilizando el método de acoplamiento 4:

30

Orden de adición	Código	Aminoácido	MW	m (mg)	eq
1	t	Fmoc-D-Thr(tBu)-OH	397,5	159	3
2	h	Fmoc-D-His(Trt)-OH	619,7	248	3
3	r	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	648,8	260	3
4	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
5	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
6	m	Fmoc-D-Met-OH	371,5	149	3
7	w	Fmoc-D-Trp-OH	426,5	171	3
8	s	Fmoc-D-Ser(tBu)-OH	383,4	153	3
9	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
10	v	Fmoc-D-Val-OH	339,4	136	3
11	w	Fmoc-D-Trp-OH	426,5	171	3
12	p	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3

Utilizando 46 µl de DIC y 43 mg de Oxyma en DMF/DCM (1:1). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 45 min. Después de cada acoplamiento se eliminó el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno. Dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina).

40 Acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH: El acoplamiento del Fmoc-TTDS-OH (2 eq., 200 µmoles, 108,53 mg), se consiguió mediante 4 eq. de DIC (400 µmoles, 61 µl) y 4 de HOBT (400 µmoles, 54 mg) en DCM durante 2 h. Seguido de la eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno.

- Acoplamiento del ácido 5-hexinoico: Para el acoplamiento del ácido 5-hexinoico al péptido anclado sobre la resina, se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron secuencialmente ácido hexinoico (4 eq., 400 μ moles, 45 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 eq., 1,2 mmoles, 163 mg) a la resina, seguidos de la adición de 12 eq. de DIEA (1,2 mmoles, 204 μ l). Durante 1,5 h, se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. A continuación, el péptido se escindió y se liofilizó.
- 10 Con este Hexinoico-TTDS-THRre y utilizando SN38-N3 preparado como en el ejemplo 3, se siguió el siguiente protocolo para conseguir SN38-enlazador A-THRre: A un vial de microondas de 10 ml se añadieron 1,5 equivalentes de 5-azidopentanoato de (S)-4,11 -dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo, se añadieron 1 equivalente de alquino-TTDS-THRre, 0,15 equivalentes de CuTHPTA y 0,3 equivalentes de ascorbato sódico y se disolvieron en 3 ml de DMF. La mezcla se agitó de 2 a 4 horas con MW (CEM discover SP MW) asistida a 30 °C durante toda la reacción. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC a escala semipreparativa. Se obtuvo el compuesto con una pureza superior al 95 %. Caracterización del producto: UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μ m), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,597 min. UPLC-MS [M + H]⁺: 2403,86 Da.

20 Ejemplo comparativo 2: SN38-enlazador B-THRre

En este ejemplo comparativo, todos los aminoácidos utilizados son D-aminoácidos. Para el acoplamiento manual con la resina del primer aminoácido protegido, se aplicó el método de acoplamiento 4 utilizando Fmoc-D-Thr(tBu)-OH (159 mg). Los siguientes aminoácidos se acoplaron secuencialmente de la siguiente manera utilizando el método de acoplamiento 4:

Orden de adición	Código		MW	m (mg)	eq
1	t	Fmoc-D-Thr(tBu)-OH	397,5	159	3
2	h	Fmoc-D-His(Trt)-OH	619,7	248	3
3	r	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	648,8	260	3
4	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
5	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
6	m	Fmoc-D-Met-OH	371,5	149	3
7	w	Fmoc-D-Trp-OH	426,5	171	3
8	s	Fmoc-D-Ser(tBu)-OH	383,4	153	3
9	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3
10	v	Fmoc-D-Val-OH	339,4	136	3
11	w	Fmoc-D-Trp-OH	426,5	171	3
12	P	Fmoc-D-Pro-OH H ₂ O	355,4	142	3

Utilizando 46 μ l de DIC y 43 mg de Oxyma en DMF/DCM (1:1). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 45 min. Después de cada acoplamiento se eliminó el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno. Dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina).

A continuación, el péptido se escindió y se liofilizó. Con este THRre y utilizando SN38-succínico preparado como en el ejemplo 5, se siguió el siguiente protocolo para obtener SN38-enlazador B-THRre: En un matraz de fondo redondo, se añadió 1,5 eq. de ácido (S)-4-((4,11-dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-il)oxi)-4-oxobutanoico, 1,2 eq. de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl) y 1,2 eq. de N-hidroxibenzotriazol (HOBT) en atmósfera de N₂ y 0 °C, después se añadió DMF seco, y se agitó durante 10 min. A continuación, se añadió THRre y se hizo reaccionar ON a temperatura ambiente. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC a escala semipreparativa. Se obtuvo el compuesto con una pureza superior al 95 %. Caracterización del producto: UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μ m), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,543 min. UPLC-MS

$[M + 2H]_{\text{exp}}^{+2}$: 982,32Da.

Ejemplo 8a: Evaluación de la solubilidad en agua.

- 5 Se disolvieron 25 mg de SN38-enlazador A-MiniAp4 en H₂O, mostrando una solución completamente transparente. Esto significa que SN38-enlazador A-MiniAp4 tiene una solubilidad en agua superior a 5 mg/ml, más de 400 veces la solubilidad en agua descrita para SN38 (Mol.Pharmaceutics, 2016, 13, 379-390).
G2B-001 lineal (lb), G2B-003 (lc), G2B-004 (ld) y G2B-005 (le) muestran una buena solubilidad en agua a 1 mg/ml.

10 Ejemplo 8b: Evaluación de la solubilidad turbidimétrica de SN38-enlazador A-MiniAp4.

- El compuesto SN38-enlazador A-MiniAp4 (10 mM en DMSO) se diluyó en serie para obtener soluciones de 0,1, 0,3, 1 y 3 mM en DMSO. A continuación, cada concentración de compuesto de prueba se diluyó adicionalmente 1 en 100 en tampón (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M, pH 7,4) de modo que la concentración final de DMSO fuera del 1 % y las concentraciones finales del compuesto de prueba fueran 1, 3, 10, 30 y 100 μ M. El experimento se realizó a 37 °C y cada concentración se incubó en 7 pocillos replicados. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C antes de medir la absorbancia a 620 nm. La nicardipina y el pireno se incluyeron como compuestos de control. La solubilidad de la nicardipina depende del pH, mientras que la solubilidad del pireno es independiente del pH. La solubilidad se estimó a partir de la concentración del compuesto de prueba que produce un aumento en la absorbancia por encima del control de vehículo (DMSO al 1 % en tampón). Véase la **Tabla 2**.

Tabla 2. Datos de solubilidad acuosa por turbidimetría.

Compuesto	Solubilidad acuosa de turbidez		
	Intervalo de precipitación estimado (μ m)		
	Enlace inferior	Enlace superior	Intervalo medio calculado
SN38-enlazador A-MiniAp4	30	100	65
Nicardipina	3	20	11,5
Pireno	3	10	6,5

- 25 No se encontraron problemas de solubilidad hasta 100 micromolar de G2B-001, como era de esperar.

Ejemplo 9: Actividad antitumoral del compuesto (la): SN38 - enlazador A-MiniAp4 (también denominado G2B-001) contra líneas celulares cancerosas: gliomas pontinos intrínsecos difusos, gliomas adultos y tumores sólidos pediátricos, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma y neuroblastoma.

30

Los presentes inventores compararon la actividad del nuevo compuesto (la) SN38-enlazador A-MiniAp4 (también denominado G2B-001) con la de los fármacos estrechamente relacionados, SN38 e irinotecán.

- Las líneas celulares cancerosas se obtuvieron del repositorio mantenido en el Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona, España). Las líneas celulares cancerosas utilizadas en estos experimentos incluían tipos de glioma adulto (líneas celulares U373 y U87), gliomas pediátricos, incluido el glioma pontino intrínseco difuso (HSJD-DIPG-007, HSJD-DIPG-011), y glioma pediátrico de alto grado (HSJD-GBM-001), retinoblastoma (HSJD-RBT-5, HSJD-RBT-7 y HSJD-RBT-14), sarcoma de Ewing (A673), rhabdomyosarcoma (Rd y RH4) y neuroblastoma (líneas celulares LAN-1 y SK-N-JD y modelos celulares derivados del paciente HSJD-NB-004), HSJD-NB-005 y HSJD-NB-016). En resumen, se cultivaron entre 3.000 y 30.000 células cancerosas en placas de 96 pocillos y 24 h después se expusieron las células al compuesto SN38-enlazador A-MiniAp4 (la) (intervalo de concentración 1-0,00000001 μ M), SN38 (intervalo de concentración 1-0,00000001 μ M), o irinotecán (intervalo de concentración 100-0,000001 μ M). Para añadir los fármacos a las células en cultivo, SN38-enlazador A-MiniAp4 (la) e irinotecán se prepararon en medio de cultivo a partir de soluciones madre a una concentración de 1 mg/ml en agua. SN38 se preparó en medio de cultivo a partir de una solución madre a una concentración de 1 mg/ml en DMSO. El compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (ensayo MTS; Promega, Fitchburg, WI) para determinar la viabilidad celular tras 72 h de incubación con los fármacos. Las concentraciones de fármaco necesarias para provocar una reducción del 50 % en la proliferación celular (IC50 e intervalos de confianza del 95 %) se calcularon con el software Graphpad Prism 8 (La Jolla, CA). Se construyeron curvas de actividad para las líneas celulares de glioma adulto U87 (figura 1) y U373 (figura 2), gliomas pediátricos incluyendo los modelos DIPG HSJD-DIPG-007 (figura 3) y HSJD-DIPG-011 (figura 4), y el modelo de glioma pediátrico de alto grado HSJD-GBM-001 (figura 5), los modelos de retinoblastoma HSJD-RBT-5 (figura 6), HSJD-RBT-7 (figura 7) y HSJD-RBT-14 (figura 8), la línea celular de sarcoma de Ewing A673 (figura 9), las líneas celulares de rhabdomyosarcoma Rd (figura 10) y RH4 (figura 11), las líneas celulares de neuroblastoma LAN-1 (figura 12) y SK-N-JD (figura 13) y los modelos celulares de neuroblastoma derivados del paciente HSJD-NB-004 (figura 14), HSJD-NB-005 (figura 15) y BM25/HSJD-NB-016 (figura 16). Los valores de IC50 establecidos figuran en la **Tabla 3**.

Tabla 3 Valores de IC50 de los compuestos SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), SN38 e irinotecán contra líneas celulares cancerosas.

Línea celular	SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia)	SN38	Irinotecán
A673	0,003802	0,0004617	1,442
HSJD-DIPG-007	0,03416	0,001125	4,748
HSJD-DIPG-011	0,07288	0,001122	1,204
U373	0,006647	0,0008685	3,719
HSJD-GBM-001	0,07026	0,002611	9,573
Rd	0,006945	0,001574	5,957
RH4	0,08149	0,01475	10,83
HSJD-RBT-5	0,09208	0,01031	0,9106
HSJD-RBT-7	0,0151	0,0003349	1,12
HSJD-RBT-14	0,03353	0,001079	2,604
U87	0,744	0,004042	9,747
LAN-1	0,02161	0,001962	6,996
SK-N-JD	0,0139	0,00755	7,76
HSJD-NB-004	0,07685	0,2307	9,84
HSJD-NB-005	0,05145	0,01251	8,196
HSJD-NB-016	0,0256	0,01232	0,6594

5

Los valores de IC50 obtenidos para SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) fueron significativamente inferiores a los del fármaco irinotecán ($P < 0,0001$; prueba ANOVA pareada) como se muestra en la figura 17.

Ejemplo 10: Tolerabilidad *in vivo* de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) en inyecciones intravenosas únicas y repetidas.

10

Para evaluar la toxicidad del irinotecán y de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) (también llamado G2B-001) en ratones desnudos atímicos (de 10 semanas de edad; 8 ratones por grupo) se estudió primero la dosis máxima tolerada (DMT) de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), mediante inyección intravenosa. Se inyectaron tres ratones a dosis de 200, 500 y 1000 mg/kg, y se observaron los síntomas, incluida la muerte o la pérdida de peso, durante los 14 días siguientes. La MTD se estableció en 200 mg/kg. En este nivel de dosis, los ratones sobrevivieron y no mostraron síntomas inmediatos de angustia ni una pérdida significativa de peso durante los 14 días siguientes, en comparación con los animales de control no tratados (figura 18).

15

Tras el establecimiento de la MTD de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) en una sola dosis i.v, comparamos el peso medio de ratones tratados con irinotecán a un régimen de dosis múltiples clínicamente relevante, y con SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) a una dosis equimolar. En resumen, los ratones fueron tratados con irinotecán 10 mg/kg (15 dosis, en los días 1-5, 8-12 y 29-33), por vía intraperitoneal (i.p.), o con un SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) 30 mg/kg (9 dosis, los días 1, 3, 5, 8, 10, 12, 29, 31, 33), por vía intravenosa (i.v.). Este régimen se consideró el número máximo factible de inyecciones i.v. en ratones. Los ratones de control fueron tratados con solución salina i.p. los días 1-5, 8-12 y 29-33.

20

El peso de los ratones se midió hasta el día 40 y los valores medios y de DE se representan para cada grupo en la figura 19. Los ratones no perdieron peso de forma significativa, en comparación con los controles, como resultado de los tratamientos con SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia). El peso de los ratones tratados con SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) fue similar al de los ratones tratados con dosis clínicamente relevantes de irinotecán.

25

Ejemplo 11: Actividad comparativa de conjugados de SN38, SN38 con MiniAp4 (SN38-enlazador A-MiniAp4, ejemplo 7) y SN38-enlazador B-THRre (ejemplo comparativo 2).

30

Los presentes inventores compararon la actividad del nuevo compuesto SN38 conjugado con MiniAp4 (SN38-enlazador A-MiniAp4, ejemplo 7 también denominado G2B-001) y con SN38-enlazador B-THRre (ejemplo comparativo 2). El compuesto original SN38 se utilizó como referencia. Las líneas celulares cancerosas utilizadas en estos

35

experimentos fueron gliomas pediátricos, incluido el glioma pontino intrínseco difuso HSJD-DIPG-007, y el glioma pediátrico de alto grado HSJD-GBM-001. En resumen, se cultivaron 3000 células cancerosas en placas de 96 pocillos y 24 h después se expusieron las células al compuesto (Ia) (intervalo de concentración 1-0,00000001 μM), SN38-enlazador B-THRre (intervalo de concentración 1-0,00000001 μM), y SN38 (intervalo de concentración 1-0,00000001 μM). Para añadir los fármacos a las células en cultivo, SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) y SN38-enlazador B-THRre se prepararon en medio de cultivo a partir de soluciones madre con una concentración de 1 mg/ml en agua. SN38 se preparó en medio de cultivo a partir de una solución madre a una concentración de 1 mg/ml en DMSO. Se utilizó el ensayo MTS para determinar la viabilidad celular tras 72 h de incubación con los fármacos. Las concentraciones de fármaco necesarias para provocar una reducción del 50 % en la proliferación celular (IC50 e intervalos de confianza del 95 %) se calcularon con el software Graphpad Prism 8 (La Jolla, CA). Se construyeron curvas de actividad para las células HSJD-DIPG-007 (figura 20) y HSJD-GBM-001 (figura 21). Los valores IC50 establecidos se encuentran en la **Tabla 4**. Como se puede observar, la conjugación de SN38 con THRre dio lugar a una menor actividad que la conjugación con MiniAp4.

15 **Tabla 4.** Valores IC50 de los compuestos

Línea celular	SN38	SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia)	Ejemplo comparativo 2
HSJD-DIPG-007	0,001505	0,01071	0,1039
HSJD-GBM-001	0,006306	0,006387	0,06063

20 Ejemplo 12. Actividad comparativa del compuesto SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia), ejemplo comparativo 1 (SN38-enlazador A-THRre) y ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre) (Efecto del péptido y tanto del péptido como del enlazador).

Debido a que en el anterior compuesto (Ia) del Ejemplo 11 y el ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre) estaban compuestos por enlazadores de diferente tamaño, los presentes inventores compararon la actividad de ambos compuestos con la del ejemplo comparativo 1 (SN38-enlazador A-THRre), teniendo los compuestos (Ia) y el ejemplo comparativo 1 el mismo enlazador.

Las líneas celulares cancerosas utilizadas en estos experimentos fueron gliomas pediátricos, entre ellos el glioma pontino intrínseco difuso HSJD-DIPG-007, y el glioma pediátrico de alto grado HSJD-GBM-001. En resumen, se cultivaron 3000 células cancerosas en placas de 96 pocillos y 24 h después se expusieron las células a los compuestos (Ia), ejemplo comparativo 1 y ejemplo comparativo 2 (intervalo de concentración 1-0,001 μM para cada uno de ellos). Todos los compuestos se prepararon en medio de cultivo a partir de soluciones madre con una concentración de 1 mg/ml en agua. Se utilizó el ensayo MTS para determinar la viabilidad celular tras 72 h de incubación con los fármacos. Las concentraciones de fármaco necesarias para causar una reducción del 50 % en la proliferación celular (IC50 e intervalos de confianza del 95 %) se calcularon con el software Graphpad Prism 8 (La Jolla, CA). Se construyeron curvas de actividad para las células HSJD-DIPG-007 (figura 22) y HSJD-GBM-001 (figura 23). El ejemplo comparativo 1 (SN38-enlazador A-THRre) y ejemplo comparativo 2 (SN38-enlazador B-THRre), presentaron menos actividad que el compuesto (Ia). Por tanto, la sorprendente actividad del compuesto (Ia) se debió al péptido MiniAp4, pero también se debió al enlazador espacial, en comparación con el ejemplo comparativo 1 y ejemplo comparativo 2. Los valores de IC50 establecidos se encuentran en la **Tabla 5**.

40 **Tabla 5.** Valores IC50 (μM) de los compuestos (Ia), Ej. Comp. 3 y Ej. Comp. 4 contra líneas celulares cancerosas.

Línea celular	SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia)	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2
HSJD-DIPG-007	0,02032	0,07509	0,1485
HSJD-GBM-001	0,02165	0,06734	0,1008

45 Ejemplo 13: Estabilidad de SN38-enlazador A-MiniAp4 en suero humano a 37 °C *in vitro* frente al tiempo.

En cuanto a la estabilidad en suero humano del SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) (ejemplo 7), se incubó a una concentración de 200 μM en tampón HBSS a 37 °C en presencia de suero humano al 90 %. En un intervalo de tiempos, se recogieron alícuotas de 100 μl a las que se añadió metanol frío de 400 μl para precipitar las proteínas del suero. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C durante 30 min, se filtraron y se analizaron por UPLC-PDA y UPLC-MS para determinar el grado de degradación de SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia). No se observó ninguna degradación significativa en 24 h, lo que implica que la semivida es superior a este periodo (figura 24).

55 Ejemplo 14: Estabilidad de SN38-enlazador A-MiniAp4 (G2B-001) (Ia) en plasma de rata, de ratón, canino y humano a 37 °C *in vitro* frente al tiempo.

Para evaluar la estabilidad del SN38-enlazador A-MiniAp4 (Ia) (ejemplo 7) en plasma humano, de ratón, de perro y de rata a 37 °C, el compuesto se preparó a 200 µM en muestras de plasma por triplicado en cada punto temporal (0h, 1 h, 4 h, 8 h y 24 h) para cada especie. Una vez finalizada la incubación, las proteínas plasmáticas se precipitaron inmediatamente añadiendo metanol frío (proporción 4:1, metanol:plasma) y los tubos se agitaron durante unos segundos (vórtex). Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes, se transfirieron a la placa de inyección y se inyectaron al sistema LC-MS.

La recuperación del compuesto se determinó comparando la respuesta del analito en una muestra biológica enriquecida con el analito y procesada, con la respuesta en una muestra de metanol enriquecida con el analito y procesada.

El ensayo de estabilidad plasmática se realizó utilizando plasma blanco de voluntarios/animales sin tratar. Como anticoagulante se utilizó K2-EDTA. El plasma blanco humano utilizado se obtuvo del Hospital Sant Pau, el plasma blanco de ratón utilizado se obtuvo de Janvier, el plasma blanco de perro utilizado se obtuvo de Isoquimen y el plasma blanco de rata utilizado se obtuvo de Draconis Pharma.

La semivida del G2B-001 a 200µM en plasma humano, de ratón, de perro y de rata fue superior a 24 horas, excepto para el compuesto G2B-001 en plasma de ratón y perro cuya semivida fue de 8 - 24h. (figura 25).

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de G2B-001 tras 24 h en plasma humano, de ratón, de perro y de rata.

G2B-001 (Ia)	% Recuperación
Ser humano	65,1
Perro	68,3

Ejemplo 15: Preparación de Hexinoico-TTDS-Dap-Lvs-Ala-Pro-Glu-Thr-Ala-Leu-Asp-NH₂ (hexinoico-TTDS-SEQ ID NO: 14) lineal sin un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de Dap y el ácido carboxílico de la cadena lateral de Asp. DapKAPETALD (SEQ ID NO:14), es decir, péptido lineal.

Para el acoplamiento manual con la resina del primer aminoácido protegido, se aplicó el método de acoplamiento 4 utilizando Fmoc-Asp(OAI)-OH (118,5 mg). Los siguientes aminoácidos se acoplaron secuencialmente de la siguiente manera utilizando el método de acoplamiento 4:

Orden de adición	Código	Aminoácido	MW	m (mg)	eq
1	D	Fmoc-L-Asp(OAI) -OH	395,4	118,5	3
2	L	Fmoc-L-Leu-OH	353,4	105,9	3
3	A	Fmoc-Ala-OH H ₂ O	329,3	98,7	3
4	T	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	397,5	119,1	3
5	E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH H ₂ O	443,5	132,9	3
6	P	Fmoc-L-Pro-OH H ₂ O	355,4	106,5	3
7	A	Fmoc-Ala-OH H ₂ O	329,3	98,7	3
8	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	140,4	3
9	Dap	Fmoc-L-Dap(Alloc)-OH	410,4	123	3

Utilizando 46 µl de DIC y 43 mg de Oxyma en DMF/DCM (1:1). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 45 min. Después de cada acoplamiento se eliminó el grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno. Dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina).

Acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH: El acoplamiento de Fmoc-TTDS-OH (2 equivalentes, 200 µmoles, 108,53 mg), se

conseguió mediante 4 equivalentes de DIC (400 μ moles, 61 μ l) y 4 de HOBT (400 μ moles, 54 mg) en DCM durante 2 h. Seguido de la eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) con piperidina al 20 % (v/v) en DMF mediante un tratamiento de 30 s seguido de dos tratamientos de 10 minutos cada uno.

- 5 Acoplamiento del ácido 5-hexinoico: Para el acoplamiento del ácido 5-hexinoico al péptido anclado sobre la resina, se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron secuencialmente ácido hexinoico (4 eq., 400 μ moles, 45 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 eq., 1,2 mmoles, 163 mg) a la resina, seguidos de la adición de 12 eq. de DIEA (1,2 mmoles, 204 μ l). Durante 1,5 h, se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El
- 10 acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.

- Los grupos OAl y Alloc se desprotegeron mediante adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq., 10 μ M, 12 mg), fenil silano (10 eq., 1000 μ moles, 123 mg) en DCM (3 x 15 min). La resina se lavó con dietilcarbamato de sodio
- 15 0,02 M en DCM (3 x 5 min).

- A continuación, el péptido se escindió y se liofilizó. Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal del 10 al 60 % de MeCN en H₂O en 30 min utilizando una columna Xbridge de 25 cm y 3,5 μ m, 1 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,1 %) y H₂O (TFA al 0,1 %); Tiempo de retención: 11,526 min. Rendimiento
- 20 (síntesis y purificación): 9 %.

Ejemplo 16: Preparación del compuesto de fórmula (Ib), G2B-001 lineal sin enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de Dap y el ácido carboxílico de la cadena lateral de Asp.

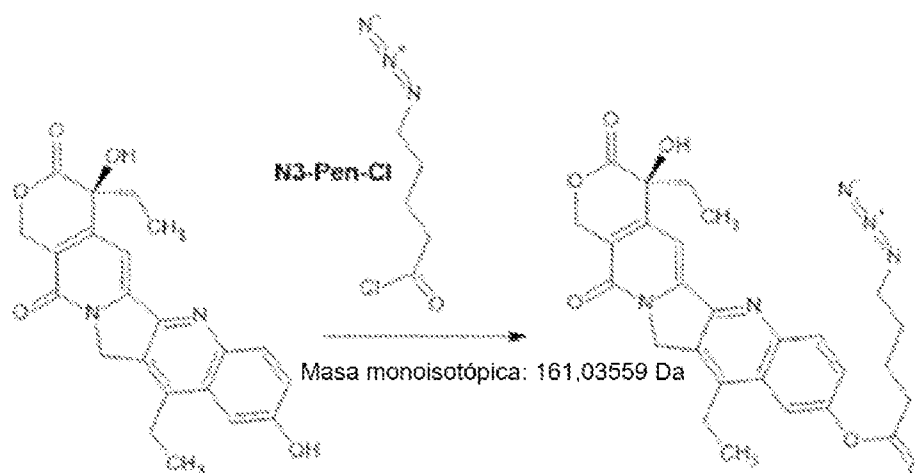
- 25 A partir de Hexinoico-TTDS-MiniAp4 lineal preparado como en el ejemplo 15, y utilizando SN38-N₃ preparado como en el ejemplo 3, se siguió el siguiente protocolo para obtener el compuesto de fórmula (Ib) también denominado G2B-001 lineal:

- A un vial de microondas de 10 ml 1,5 eq. de 5-azidopentanoato de (S)-4,11-dietil-9-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-
- 30 tetrahidro-1 H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-ilo, se añadieron 1 eq. de alquino-TTDS-DapKAPETALD lineal, 0,15 eq. de CuTHPTA y 0,3 eq. de ascorbato sódico y se disolvieron en 3 ml de DMF. La mezcla se agitó de 2 a 4 horas con MW (CEM discover SP MW) asistida a 30 °C durante toda la reacción. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC a escala semipreparativa. Se obtuvo el compuesto con una pureza superior al 95 %. Caracterización del producto: HPLC-MS de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 80 % de MeCN en H₂O en 7 minutos utilizando una
- 35 columna Luna 3 μ m C18 (2) 100A 50 x 2,1 mm, 0,85 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (ácido fórmico al 0,1 %) y H₂O (ácido fórmico al 0,1 %); Tiempo de retención: 5,08 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1845,10 Da; Rendimiento (síntesis y purificación): 22 %.

Ejemplo 17: Preparación de N₃-Pen-SN38

- 40 En un matraz de fondo redondo de dos bocas, se añadió 1 eq. de SN-38 (600 mg) y se disolvió en 100 ml por gramo de DCM seco (60ml). Se observó una solución turbia. Esta mezcla de reacción se enfrió a 0-2 °C y se añadieron 6 eq. de DIEA (2 ml) y se agitó durante 15 minutos. Después de 15 min, se añadieron 3 eq. de N₃-Pen-Cl (700 mg) [disueltos en 500 μ l de DCM seco]. Se enfrió durante 15 minutos y se continuó agitando a temperatura ambiente. El progreso de
- 45 la reacción se comprobó mediante HPLC. Cuando el material de partida fue inferior al 3 %, la reacción se llevó a la fase de elaboración.

- El volumen inicial de la mezcla de reacción fue ~45 ml que se completó hasta 300 ml con DCM seco. Se extrajo tres veces con agua destilada (20 % del volumen final de la mezcla de reacción) 3 X 3 min X 60 ml. La capa de DCM se
- 50 secó con sulfato sódico (Na₂SO₄) durante 30 minutos y se evaporó con rotavapor. El sólido obtenido se trató con 80:20 Hex: Éter dos veces y se mantuvo para el secado en desecador. Rendimiento después del trabajo, 730 mg. Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal del 10 al 90 % de MeCN en H₂O en 30 min utilizando una columna SS 2504,6 mm empaquetada con gel de sílice C-18 para cromatografía R (5 μ m), 1 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,1 %) y H₂O (TFA al 0,1 %); Tiempo de retención: 19,730 min. Masa
- 55 observada = 518,20 Da, Masa calculada= 517,19 Da.



Ejemplo 18: Preparación del compuesto de fórmula (Ic). G2B-003

5 A partir de Hexinoico-TTDS-MiniAp4 preparado como en el ejemplo 6, y utilizando N₃-Pen-SN38 preparado como en el ejemplo 17, se siguió el siguiente protocolo para obtener el compuesto de fórmula (Ic) también denominado G2B-003.

A un vial de 10 ml se añadieron 1,5 eq. de N₃-Pen-SN38, 1 eq. de Hexinoico-TTDS-MiniAp4, 0,15 eq. de CuTHPTA y
10 0,3 eq. de ascorbato sódico y se disolvieron en 3 ml de DMF.

La mezcla se agitó de 2 a 4 horas con microondas (CEM discover SP MW) asistida a 30 °C durante toda la reacción. El producto en bruto se purificó por RP-HPLC a escala semipreparativa. Se obtuvo el compuesto con una pureza superior al 95 %. Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal del 20 al 70 % de MeCN en
15 H₂O en 30 minutos utilizando una columna Xbridge de 25 cm y 3,5 μm, 1 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,1 %) y H₂O (TFA al 0,1 %); Tiempo de retención: 12,00 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1826,15 Da; Rendimiento (síntesis y purificación): 17 %.

Ejemplo 19: Preparación de SN38-O-CO-NH-Gly-COOH

20 Una solución de glicina-COOBu^t (1 eq) y DMAP (2 eq) en DCM seco (15 ml) se añadió gota a gota a una solución de carbonato de bis(4-nitrofenil) (1,3 eq.) en DCM seco (15 ml) y la solución resultante se agitó a 50 °C durante la noche. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó en DCM (150 ml) y se lavó con HCl 0,5 N (100 ml). La capa acuosa se lavó con DCM (5 x 100 ml) y todas las fracciones orgánicas se recogieron, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron.
25 El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Hexano:DCM:Et₂O; 5:4:1).

El PNP-Gly-COOBu^t resultante (1 eq) se hizo reaccionar con SN38 (1,2 eq) en presencia de DMAP (2 eq) en DCM seco. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo
30 se purificó por cromatografía ultrarrápida.

El grupo éster t-butilico se eliminó tratando SN38-O-CO-NH-Gly-COOBu^t con TFA:DCM:TIS (40:40:20) durante 6 h. Después se evaporó el disolvente. Se añadió tolueno dos veces para eliminar las trazas de TFA. No se realizó ninguna
35 otra purificación.

Ejemplo 20: Preparación de Boc-Val-Cit-PAB-SN38

En un matraz de fondo redondo, se agitaron 1 eq de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN38), 1 eq de Boc-Val-Cit-PAB-PNP (de iris biotech), 2 eq de DIEA y DMAP catalítico en DMF seca durante 16 h a t.a. Posteriormente, la mezcla de
40 reacción se diluyó con AcOEt y se lavó con HCl (0,5 M) (x3), y salmuera (x4). A continuación, se secó con MgSO₄, se evaporaron los volátiles y la mezcla en bruto se purificó por cromatografía de sílice (AcOEt: MeOH; 20:1; 15:1: 9:1). El compuesto deseado se obtuvo con un rendimiento del 52 % y una pureza superior al 90 %. Rendimiento 52 %. UPLC-PDA de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 minutos utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 μm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al
45 0,045 %); Tiempo de retención: 1,42 min. [M+H]_{exp}⁺: 898,4 Da.

Ejemplo 21: Preparación de H₂N-Val-Cit.PAB-SN38

En un matraz de fondo redondo, se agitó 1 eq de Boc-Val-Cit-PAB-SN38 preparado como en el ejemplo 20 en una mezcla de DCM:TFA:H₂O (44,75:49,75:0,5) durante 5 minutos. Después se evaporó el disolvente. Se añadió tolueno dos veces para eliminar las trazas de TFA. No se realizó ninguna otra purificación.

5

Ejemplo 22: Preparación de G2B-004 (Id)

Se preparó G2B-004 a partir de diglicólico-MiniAp4 (preparado utilizando los métodos estándar descritos anteriormente, método de acoplamiento 4) y 2 eq. de H₂N-Val-Cit-PAB-SN38 (preparado como en el ejemplo 21) utilizando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina) seguido de la adición de DIEA (12 eq). Durante 1 h se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces (1h y durante la noche).

10

15 A continuación, G2B-004 se escindió y liofilizó. Caracterización del producto. UPLC de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 min utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 µm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,17 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1807,84 Da. Rendimiento (síntesis y purificación): 21 %.

20 Ejemplo 23: Preparación de G2B-005 (Ie)

Se preparó Nval-Pro-Gly-MiniAp4 siguiendo los métodos estándar descritos anteriormente (método de acoplamiento 4).

25 Se preparó G2B-005 a partir de Nval-Pro-Gly-MiniAp4 y 2 eq. de SN38-O-CO-NH-Gly-OH preparados como en el ejemplo 19 utilizando PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina) seguido de la adición de DIEA (12 eq). Durante 1 h se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces (1h y durante la noche).

30

A continuación, G2B-005 se escindió y liofilizó. Caracterización del producto. UPLC de fase inversa: gradiente lineal del 0 al 100 % de MeCN en H₂O en 2 min utilizando una columna Acquity BEH C18 (50 x 2 mm x 1,7 µm), 0,61 ml/min y como disolventes se utilizaron MeCN (TFA al 0,036 %) y H₂O (TFA al 0,045 %); Tiempo de retención: 1,51 min. UPLC-MS [M + H]_{exp}⁺: 1640,77 Da. Rendimiento (síntesis y purificación): 18 %.

35

Ejemplo 24: Estabilidad de G2B-001 lineal (Ib) en plasma humano a 37 °C *in vitro* frente al tiempo

Para evaluar la estabilidad del G2B-001 lineal (Ib) (ejemplo 16) en plasma humano a 37 °C, el compuesto se preparó a 200 µM en muestras de plasma por triplicado en cada punto temporal (0h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h). Una vez finalizada la incubación, las proteínas plasmáticas se precipitaron inmediatamente añadiendo metanol frío (proporción 4:1, metanol:plasma) y los tubos se agitaron durante unos segundos (vórtex). Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes, se transfirieron a la placa de inyección y se inyectaron al sistema LC-MS. La recuperación del compuesto se determinó comparando la respuesta del analito en una muestra biológica enriquecida con el analito y procesada, con la respuesta en una muestra de metanol enriquecida con el analito y procesada.

45

El ensayo de estabilidad plasmática se realizó con plasma blanco de voluntarios no tratados. Como anticoagulante se utilizó K2-EDTA. El plasma blanco humano utilizado se obtuvo del Hospital Sant Pau.

50 La semivida de G2B-001 lineal (Ib) a 200µM en ser humano fue superior a 24 horas. (**figura 26**).

Tabla 7. Porcentaje de recuperación de G2B-001 lineal (Ib) tras 24 h en plasma humano.

G2B001 lineal	% Recuperación
Ser humano	69,9

55 Ejemplo 25: Actividad antitumoral del nuevo compuesto (Ib) denominado G2B-001 lineal frente a líneas celulares cancerosas: glioma pontino intrínseco difuso

Los presentes inventores compararon la actividad del nuevo compuesto (Ib) G2B-001 lineal (ejemplo 16) con la de los fármacos estrechamente relacionados, G2B-001 (Ia) y SN38.

60

La línea celular cancerosa utilizada en este experimento fue HSJD-DIPG-007. En resumen, se cultivaron 3000 células

cancerosas en placas de 96 pocillos y 24 h después se expusieron las células a los compuestos G2B-001 (Ia), compuesto G2B-001 lineal (Ib), y SN-38 (intervalo de concentración 1-0,001 μM para cada uno de ellos). Se utilizó el ensayo MTS para determinar la viabilidad celular tras 72 h de incubación con los fármacos. G2B-001 (Ia) y G2B-001 lineal (Ib) mostraron una actividad similar (Figura 27). Por tanto, la actividad *in vitro* del compuesto G2B-001 (Ia) se mantuvo tras la modificación química al compuesto G2B-001 (Ib). Como referencia interna del experimento, SN-38 mostró una actividad similar a la descrita en el Ejemplo 9. Los valores de IC50 establecidos figuran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Valores de IC50 (μM) de los compuestos G2B-001 (Ia), G2B-001 lineal (Ib), y SN38.

Línea celular	G2B-001 (Ia)	G2B-001 (Ib)	SN-38
HSJD-DIPG-007	0,0278	0,0368	0,000739

10

Ejemplo 26: Actividad antitumoral comparativa de G2B-003 (Ic) e irinotecán en un xenoinjerto derivado de pacientes de neuroblastoma. El modelo tumoral fue HSJD-NB-013.

Se introdujeron por vía subcutánea tumores recién extirpados (obtenidos de un ratón) en ambos flancos de tres ratones desnudos atímicos. Tras el injerto (volúmenes tumorales de 100-500 mm^3), se trató a los ratones con irinotecán, G2B-003 (Ib) o solución salina (control), todo intravenoso. Un ratón recibió 10 dosis de 10 mg/kg de irinotecán en los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12. Un ratón recibió 6 dosis de 100 mg/kg de G2B-003 (Ib) en los días 1, 2, 3, 4, 5 y 8. Un ratón recibió solución salina con el mismo régimen que el irinotecán. El volumen tumoral se midió hasta el día 44 o hasta un volumen superior a 1500 mm^3 . Los tratamientos con irinotecán y G2B-003 consiguieron una respuesta antitumoral medible y duradera (**Figura 28**), mientras que los tumores de control crecieron más rápidamente. Por tanto, la actividad *in vivo* de irinotecán y G2B-003 (Ic) fue similar en este modelo tumoral.

Listado de citas

25 Bibliografía de patentes

US8299089B2
 WO2015/051307A1
 WO2017/113687A2
 WO2018/064683A1
 WO2015/001015A1

30

Bibliografía no perteneciente a patentes

35 F. Koizumi et al en "Novel SN38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors", *Cancer Res* 2006, vol. 66(20), pág. 10048-56

F Meyer-Losic et al en "DTS-108, A novel Peptidic profurg of DN38: *In vivo* Efficacy and Toxicokinetic Studies", *Clinical Cancer Research* 2008, vol. 14, número 7, págs. 2145-2153,

40

B. Oiler *et al.*, "MiniAp-4: A Venom-Inspired Peptidomimetic for Brain Delivery"; *Angew Chem Int Ed* 2016, vol.55, págs. 572-575

45 M. Amblard, *et al.*, "Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis"; *Molecular Biotechnology* 2006, Vol. 33, págs. 239-254

J.H. Lee *et al.* *Eur. J. Biochem.* 2001. vol. 268. págs. 2004-2012

M. J. Hatfield y P. M. Potter, *Exp. Opin. Ther. Pat.* 2011, 21(8): 1159-1171.

50

P.L. Barker *et al.* *J. Med. Chem.* 1992. vol 35. págs. 2040-2048

E. Kaiser *et al.*, *Anal. Biochem.* 1970, vol. 34, págs. 595-598

55 A. Maddar *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* 1999, págs. 2787-2791

Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Quinta edición. Peter G. M. Wuts. 2014 John Wiley & Sons, publicada en 2014 por John Wiley & Sons, Inc. págs. 26-29, 271-279, 456-463, 69-77, 371-374

60 M. Kazemi & L. Shiri, *Journal of Sulfur Chemistry*, 2015, 36:6, 613-623.

aquí J. Org. Chem. 1998, 63, vol. 20, págs. 6878-6885.

M. T. Nguyen *et al.*, J. Org. Chem. 1998, 63, vol. 20, págs. 6878-6885.

5 F. David *et al.*, Org. Process Res. Dev. 2010, 14, 4, 999-1007.

<https://www.cliffsnotes.com/study-guides/chemistry/organic-chemistry-ii/aldehydes-and-ketones/reactions-of-aldehydes-and-ketones>

10 S.F.M. van Dongen *et al.*; Bioconjugate Chem. 2009, vol. 20, págs. 20-23.

<https://www.lumiprobe.com/protocols/click-chemistry-dna-labeling>

Mol.Pharmaceutics, 2016, 13, 379-390

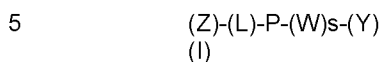
15

M. Azzolini *et al.*, Eur J Pharm Biopharm, 2017, vol. 115, págs. 149-158

S. - J. *et al.* J. Med. Chem. 2008, vol. 51, págs. 6916-6926.

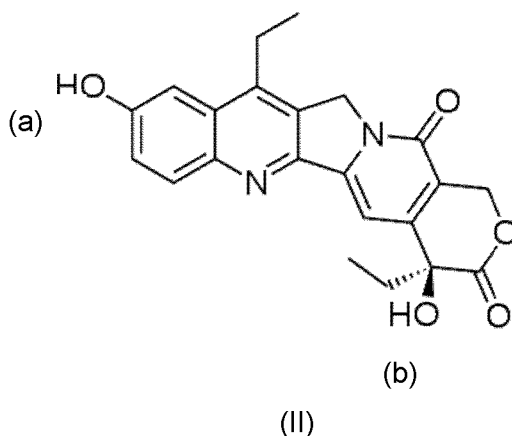
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde:

10 Z es un radical del principio activo farmacéutico SN38 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el principio activo farmacéutico SN38 tiene la fórmula (II), y en donde Z está unido a un enlazador L independientemente por sólo uno de los dos grupos hidroxilo (a) o (b) del principio activo farmacéutico;

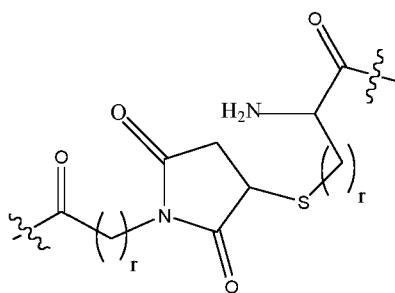


15

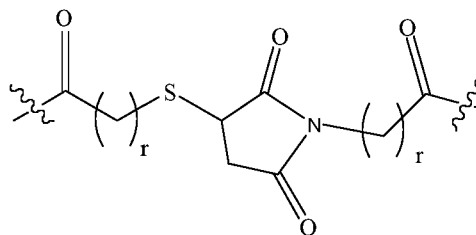
L es un enlazador que es un birradical compuesto de 2 a 8 birradicales L' y tiene la fórmula: -L'a-(L'b)n-L'c;

L'a' es un birradical seleccionado entre el grupo que consiste en: -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-(CH₂)_r-S-; -C(=O)-(CH₂)_r-O-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-S-; -C(=O)-NH-(CH₂)_r-O-; -(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-NH-; -(CH₂)_r-S-; -(CH₂)_r-O-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_r-NH-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_r-C(=O)-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_r-O-; -Si(R₁)(R₂)-(CH₂)_r-S-; -SO₂-(CH₂)_r-NH-; -SO₂-(CH₂)_r-C(=O)-; -SO₂-(CH₂)_r-O-; -SO₂-(CH₂)_r-S-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_r-NH-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_r-C(=O)-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_r-O-; -P(=O)(OR₁)-O-(CH₂)_r-S-; -CH(OH)-(CH₂)_r-NH-; -CH(OH)-(CH₂)_r-C(=O)-; -CH(OH)-(CH₂)_r-O-; -CH(OH)-(CH₂)_r-S-;

20

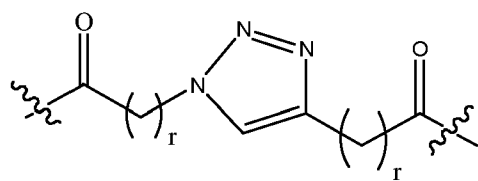


L₁;

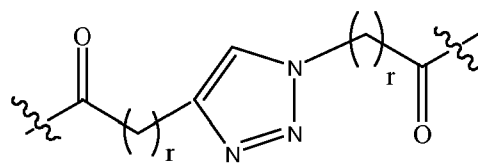


L₂;

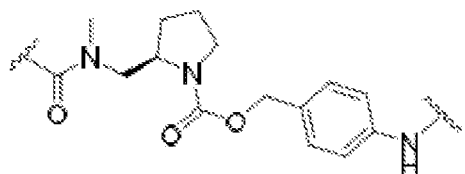
25



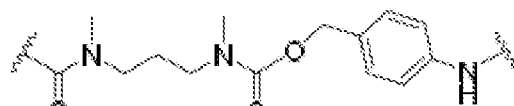
L₃;



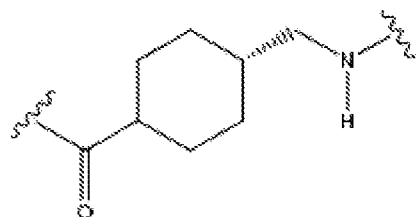
L₄;



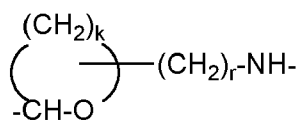
L₅



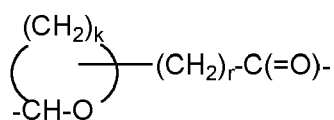
L₆; y



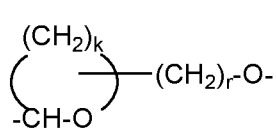
L₇;



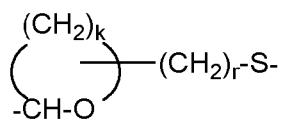
L₈;



L₉;



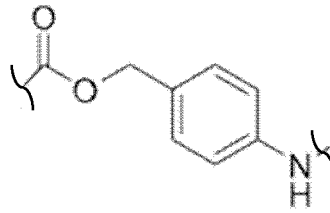
L₁₀;



L₁₁;

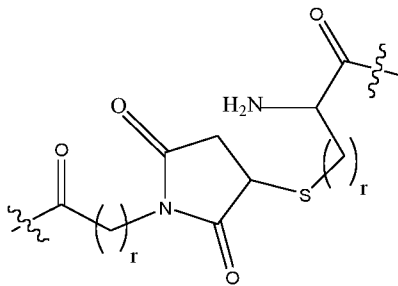
5

el sustituyente en cualquiera de L₈.L₁₁ puede estar en cualquier posición de los ciclos;

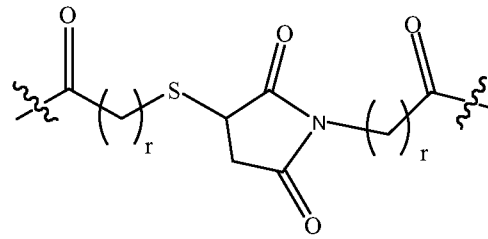


L₁₂;

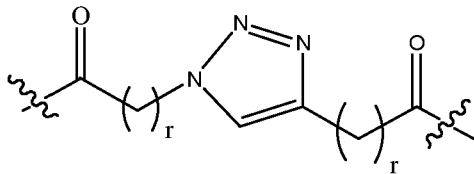
L_b' es un birradical seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en: -NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-(CH₂)_r-C(=O)-; -O-(CH₂)_r-C(=O)-; -NH-(CH₂)_r-; -C(=O)-(CH₂)_r-; -S-(CH₂)_r-; -O-(CH₂)_r-; -NH-CH-((CH₂)_rNH₂)-C(=O)-; -S-CH₂-CH(NH₂)-C(=O)-; -(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-O-; -(CH₂)_r-NH-; -(CH₂)_r-S-; -C(=O)-(CH₂)_r-NH-; -C(=O)-(CH₂)_r-O-; -C(=O)-(CH₂)_r-S-; -NH-(CH₂)_r-O-; -NH-(CH₂)_r-NH-; -NH-(CH₂)_r-S-; y combinaciones de los mismos;



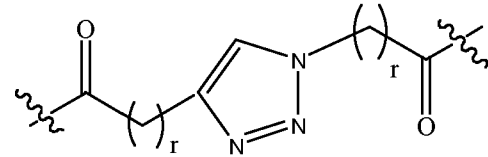
L₁;



L₂;



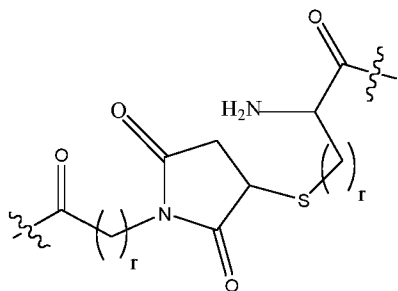
L₃; y



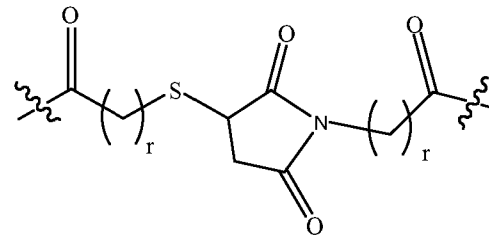
L₄;

10

L_c' es un birradical seleccionado entre el grupo que consiste en: -NH-(CH₂)_r-C(=O)-; -NH-CH-((CH₂)_rNH₂)-C(=O)-; -C(=O)-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-(CH₂)_r-C(=O)-; -S-CH₂-CH(NH⁺)-C(=O)-; -O-(CH₂)_r-C(=O)-; -(CH₂)_r-C(=O)-;

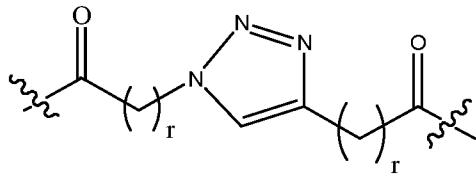


L₁;

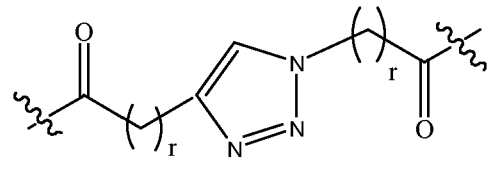


L₂;

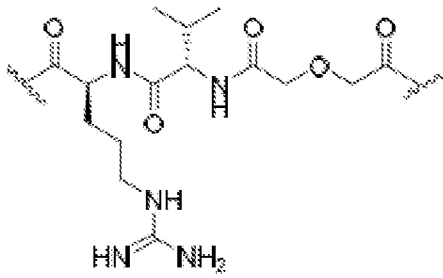
15



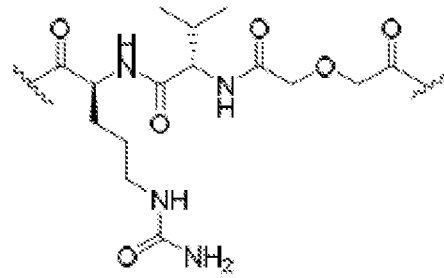
L₃;



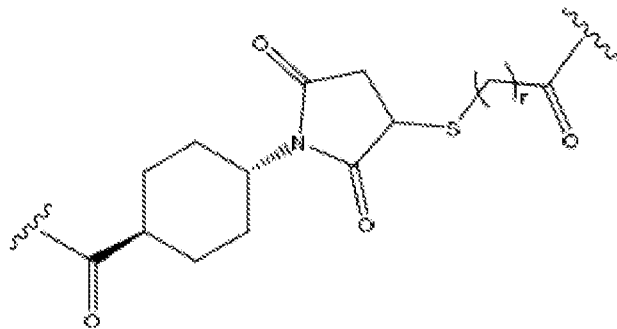
L₄;



L₁₂;

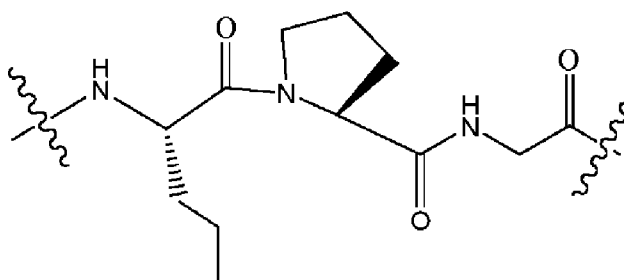


L₁₃;



L₁₄; y

5




L₁₅

P es un birradical de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- (a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos X₁KAPETALX₂ con un enlace intrapeptídico entre X₁ y X₂ que es un enlace amida; en donde X₁ se selecciona entre el grupo que consiste en Dap y Dab; y X₂ se selecciona entre el grupo que consiste en D (ácido aspártico) y E (ácido glutámico); es decir,


10

SEQ ID NO:1: $X_1\text{KAPETALX}_2$



- (b) un péptido que tiene una longitud de 12-20 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro, y comprende una secuencia de aminoácidos que es: $X_3\text{KAPETALX}_4\text{AAA}$; que tiene al menos un enlace intrapeptídico disulfuro o diselenuro entre X_3 y X_4 , en donde X_3 y X_4 son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas);


SEQ ID NO:2: $X_3\text{KAPETALX}_4\text{AAA}$




- 10 (c) un péptido que tiene una longitud de 9-11 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro o diselenuro que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en $X_5\text{KAPETALX}_6$; $X_5\text{KAPETALX}_6\text{A}$; y $X_5\text{KAPETALX}_6\text{AA}$ que tiene al menos un enlace disulfuro o diselenuro intrapeptídico entre X_5 y X_6 ; en donde X_5 y X_6 son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas), es decir,

15


SEQ ID NO:3: $X_5\text{KAPETALX}_6$



SEQ ID NO:4: $X_5\text{KAPETALX}_6\text{A}$



SEQ ID NO:5: $X_5\text{KAPETALX}_6\text{AA}$



- (d) un péptido que tiene 16 residuos de aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos $X_7\text{NX}_8\text{KAPETALX}_9\text{AAAX}_{10}\text{H}$ con un enlace disulfuro o diselenuro intrapeptídico entre X_7 y X_9 , y entre X_8 y X_{10} ; en donde X_7 - X_{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C (cisteínas), Sec (selenocisteínas) y Pen (penicilaminas); siempre que X_7 y X_9 sean iguales, y X_8 - X_{10} sean iguales, es decir,

SEQ ID NO:6: $X_7\text{NX}_8\text{KAPETALX}_9\text{AAAX}_{10}\text{H}$



- 25 y (e) péptido que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1\text{KAPETALX}_2$ en donde X_1 se selecciona del grupo que consiste en Dap y Dab; y X_2 se selecciona del grupo que consiste en D (ácido aspártico) y E (ácido glutámico) (SEQ ID NO:7);

W es un birradical seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-\text{C}(=\text{O})-$ y $-\text{NH}-\text{CH}((\text{CH}_2)_r, \text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})-$;

30

Y es un radical se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}_3$ y $-\text{NHR}_3$;

s es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 1;

35 n es un número entero de 0 a 6;

r es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 5;

k es un número entero de 5 a 8;

40

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente entre un alquilo (C_1 - C_6);

R_3 es un radical seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo- (C_1 - C_6);

- 45 L_a' está unido al radical Z mediante un enlace que se selecciona del grupo que consiste en un éster, éter, uretano, éter de sililo, sulfonato, fosfato, cetil, hemicetal, carbonato y carbamato, formándose el enlace entre los grupos $\text{C}=\text{O}$, SO_2 , Si, P, CH o CH_2 en el lado izquierdo de las fórmulas L_a' dibujadas y uno de los grupos hidroxilo del SN38;

cuando $n = 0$, L_a' está unido al radical L_c' a través de un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

5

cuando $n = 1$, L_a' está unido al radical L_b' a través de un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, éster disulfuro y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_b' ; y L_b' está unido al radical L_c' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en la amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_b' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

10

cuando n es mayor que 1, L_b' son iguales o diferentes y están unidos entre sí a través de un enlace químicamente factible seleccionado del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster; siendo un terminal L_b' unido a L_a' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre los grupos funcionales del lado derecho de las fórmulas L_a' dibujadas y los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas L_b' dibujadas; y siendo otro terminal L_b' unido a L_c' mediante un enlace químicamente factible que se selecciona del grupo que consiste en amina, amida, éter, tioéter, disulfuro, éster y tioéster, formándose el enlace entre el grupo funcional del lado derecho de las fórmulas L_b' dibujadas y el grupo funcional del lado izquierdo de las fórmulas L_c' dibujadas;

15

20

L_c' se une al birradical P a través de un enlace amida formado con el grupo carbonilo del lado derecho de las fórmulas L_c' dibujadas y un grupo amino del primer aminoácido de la secuencia peptídica P;

25

cuando $s=0$, P se une directamente a Y a través de una amida, ácido carboxílico o enlace éster, formándose el enlace entre el C=O del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P, y el radical Y que es $-NH_2$, $-OH$, $-OR_3$ o $-NHR_3$; y

cuando $s=1$ P está unido a un radical W a través de un enlace amida formado con un C=O del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P, el enlace que se forma entre los grupos funcionales del lado izquierdo de las fórmulas W dibujadas y los grupos funcionales (C=O) del C-terminal del último aminoácido de la secuencia P del lado derecho de la secuencia dibujadas; y W está unido a Y de la siguiente manera: $-C(=O)-NH-(CH_2)-C(=O)-Y$, o $-C(=O)-NH-CH((CH_2)_nNH_2)-C(=O)-Y$.

30

35

2. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Z está unido a un enlazador L por el grupo hidroxilo (b) del principio activo farmacéutico.

3. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Z está unido a un enlazador L por el grupo hidroxilo (a) del principio activo farmacéutico.

40

4. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde P es un birradical de un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y

45

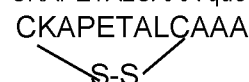
D que es un enlace amida, que es SEQ ID NO:8:



(b) un péptido que tiene una longitud de 9-20 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro, y comprende una secuencia de aminoácidos que es:

50

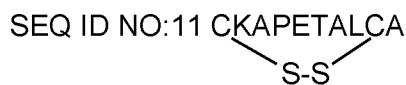
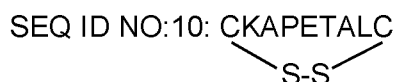
CKAPETALCAA que tiene al menos un enlace disulfuro intrapeptídico entre las cisteínas 1 y 9, que es SEQ ID NO:9:



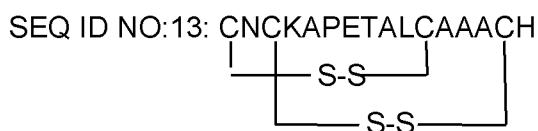
(c) un péptido que tiene una longitud de 9-11 restos de aminoácidos que tiene al menos un enlace intrapeptídico que es un enlace disulfuro y que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

55

CKAPETALC; CKAPETALCA; y CKAPETALCAA que tiene al menos un enlace disulfuro intrapeptídico entre las cisteínas 1 y 9, que son



(d) un péptido que tiene 16 residuos de aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos CNCKAPETALCAAACH con un enlace disulfuro intrapeptídico entre la primera y la tercera cisteína que son las cisteínas 1 y 11, y entre la segunda y la cuarta cisteína que son las cisteínas 3 y 15, es decir,



(e) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD (SEQ ID NO:14).

10

5. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 4, en donde, P es un birradical de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

(a) el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD con un enlace intrapeptídico entre Dap y D que es un enlace amida (SEQ ID NO:7);

15

(b) el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos CKAPETALC con al menos un enlace disulfuro intrapeptídico entre cisteínas en posición 1 y 9 (SEQ ID NO:10);

20 (c) el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos DapKAPETALD (SEQ ID NO:14).

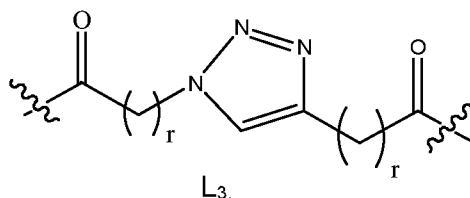
6. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde

L_a' es un birradical seleccionado entre el grupo que consiste en: $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-NH-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-S-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-O-$, $-C(=O)-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$; L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 , L_6 , L_7 y L_{12} .

25

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde L es un enlazador que es un birradical compuesto de 3 a 8 birradicales y n es un número entero de 1 a 6.

30 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde L_a' es L_3 de la fórmula siguiente y L_c' es $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$,



35 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde L_b' se selecciona del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_r-O-$, $-(CH_2)_r-O-$, y $-(CH_2)_r-NH-$, y combinaciones de los mismos.

10. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde:

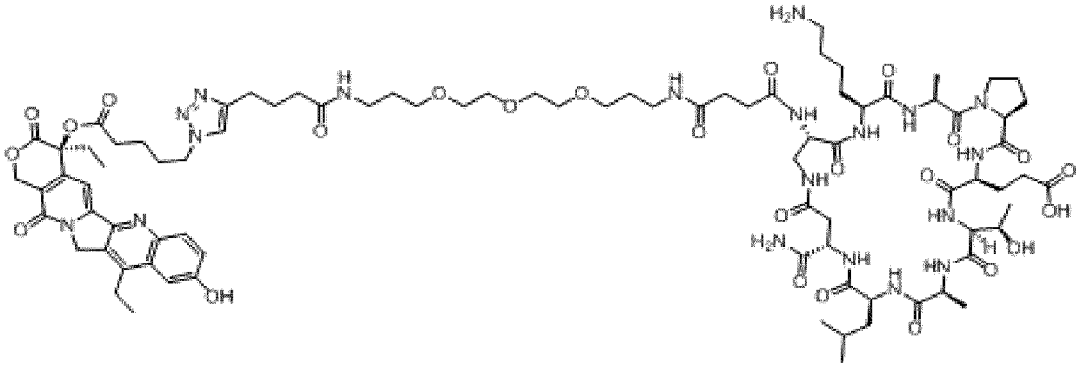
40 a) L es un enlazador que es un birradical compuesto de 2 birradicales, $n = 0$, L_a' es L_{12} , y L_c' es L_{13} ; o como alternativa,

b) L es un enlazador que es un birradical compuesto de 2 birradicales, $n = 0$, L_a' es $-C(=O)-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$, y L_c' es L_{15} .

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de la siguiente lista:

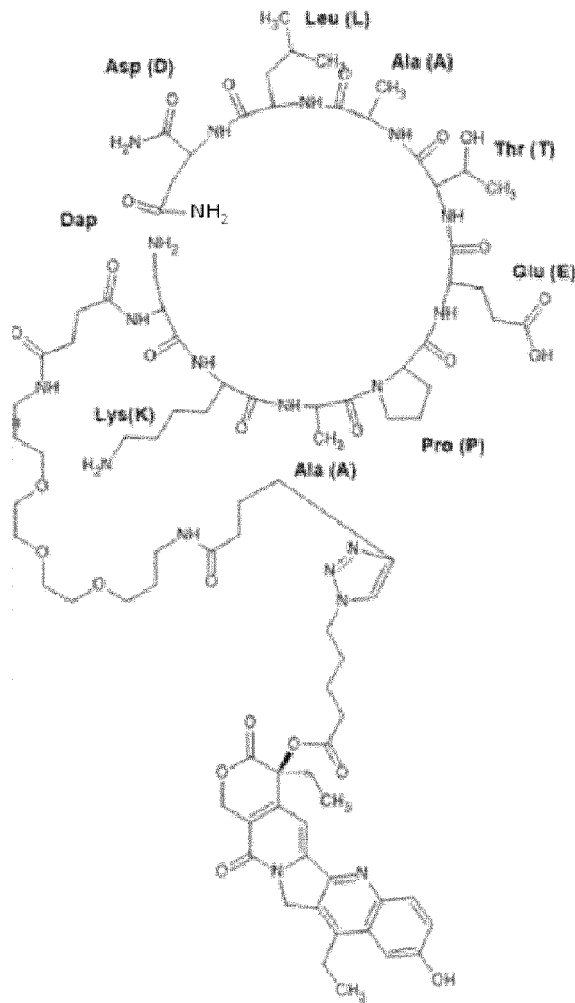
fórmula (la):

5



(la);

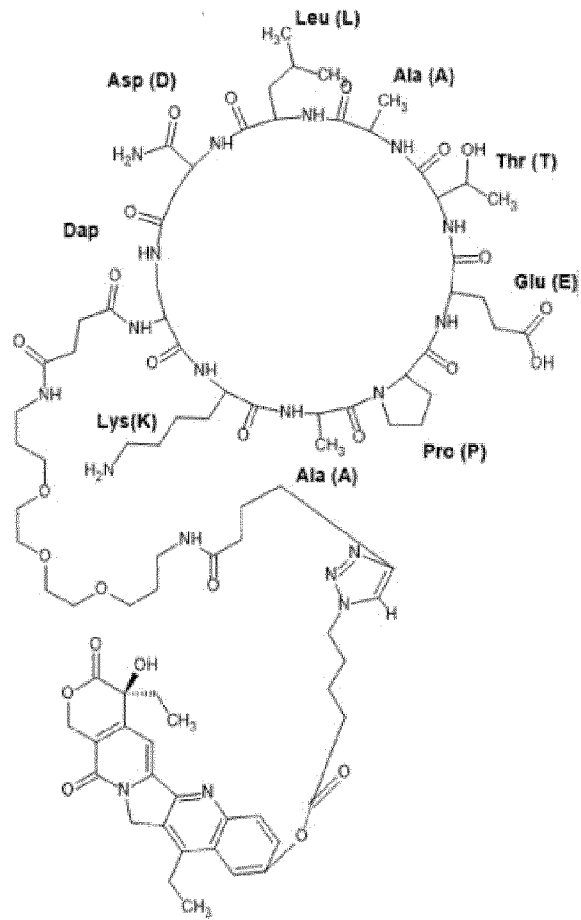
fórmula (lb):



(lb);

10

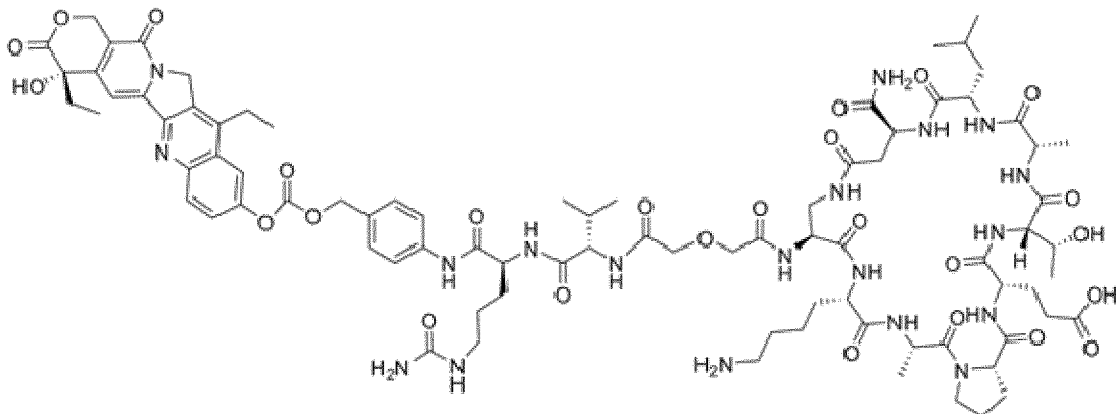
fórmula (lc):



(lc);

fórmula (ld):

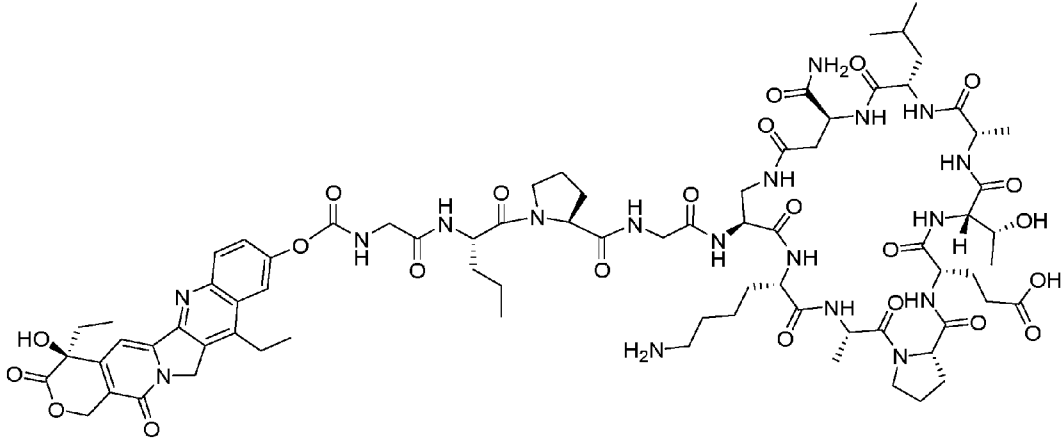
5



(ld); y

fórmula (le):

10



(le).

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, junto con cantidades apropiadas de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso como un medicamento.
14. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, incluyendo un ser humano.
15. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tratamiento del cáncer comprende el tratamiento de un tumor seleccionado entre el grupo que consiste en tumores sólidos extracraneales, tumores oculares y tumores del SNC; o un cáncer seleccionado del grupo que consiste en glioma adulto, gliomas pediátricos, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, DIPG, neuroblastoma y rhabdomyosarcoma.

GLIOMA ADULTO: U87

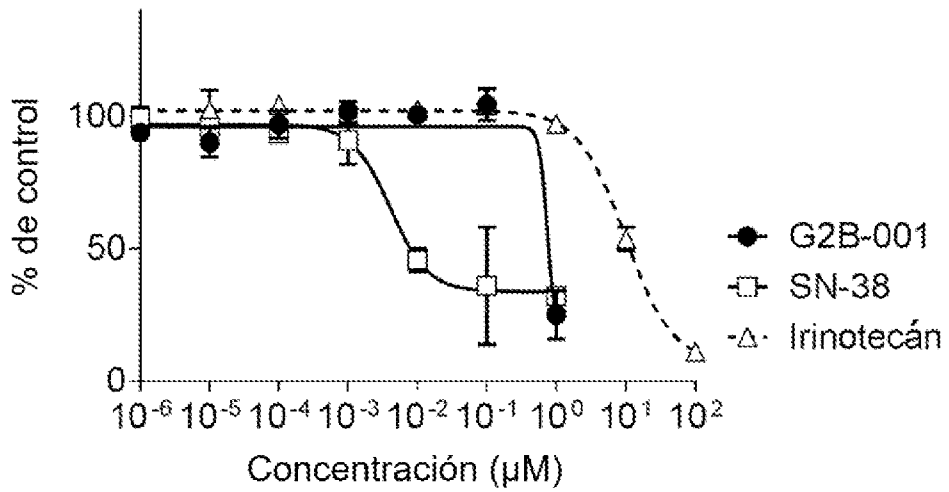


FIG. 1

GLIOMA ADULTO: U373

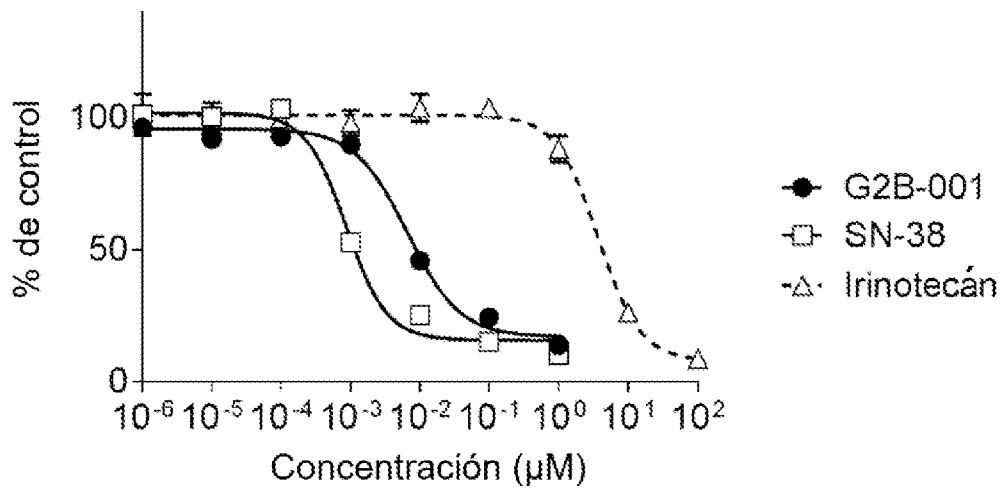


FIG. 2

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-DIPG-007

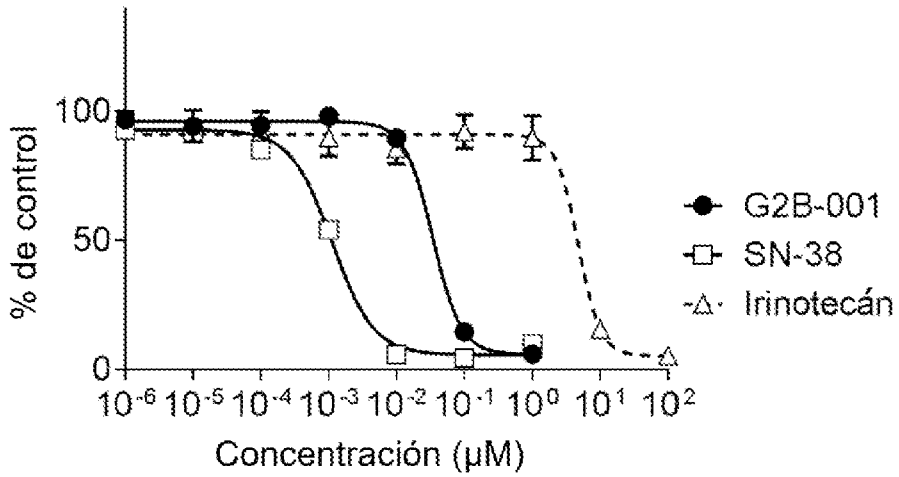


FIG. 3

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-DIPG-011

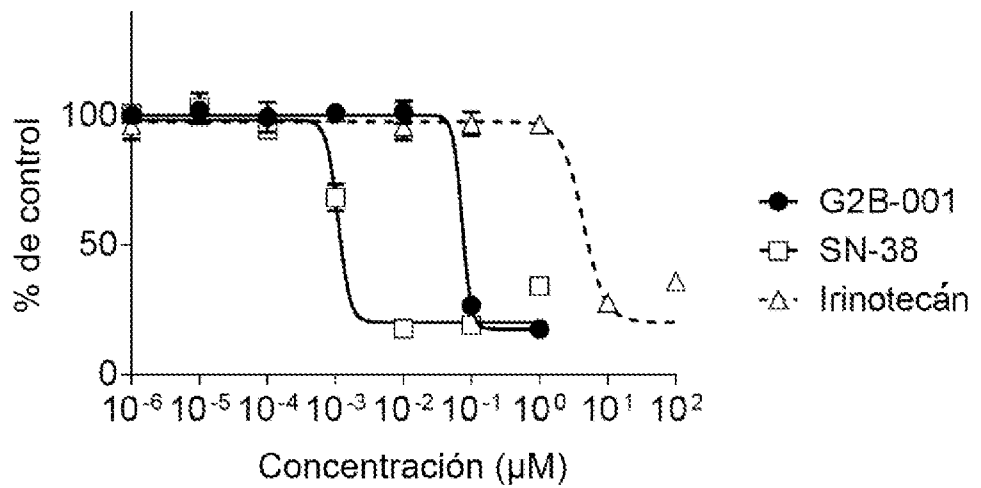


FIG. 4

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-GBM-001

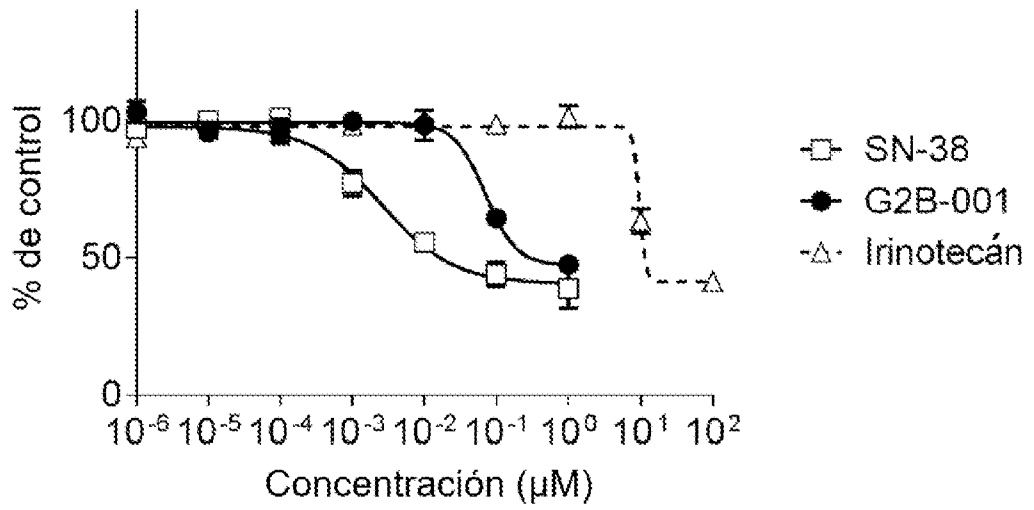


FIG. 5

RETINOBLASTOMA: HSJD-RBT-5

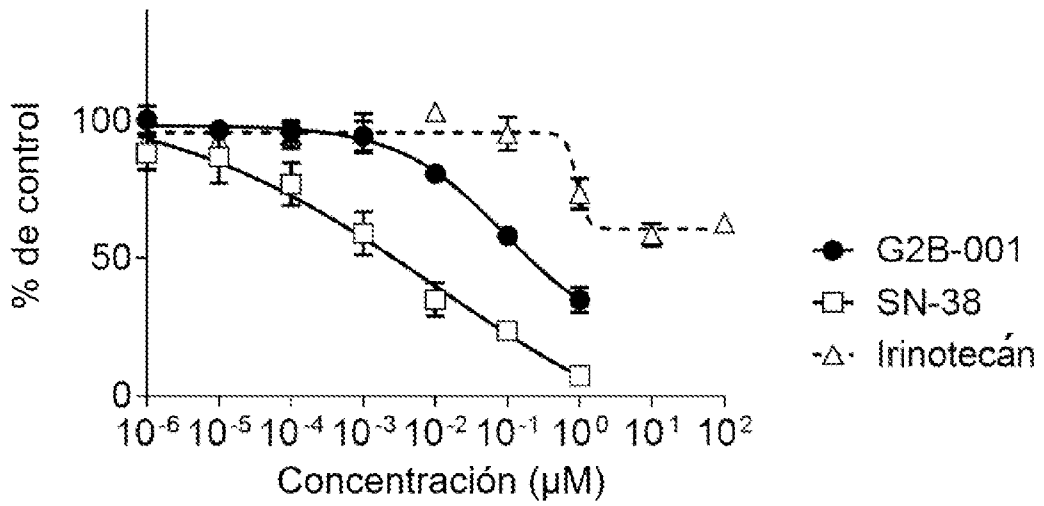


FIG. 6

RETINOBLASTOMA: HSJD-RBT-7

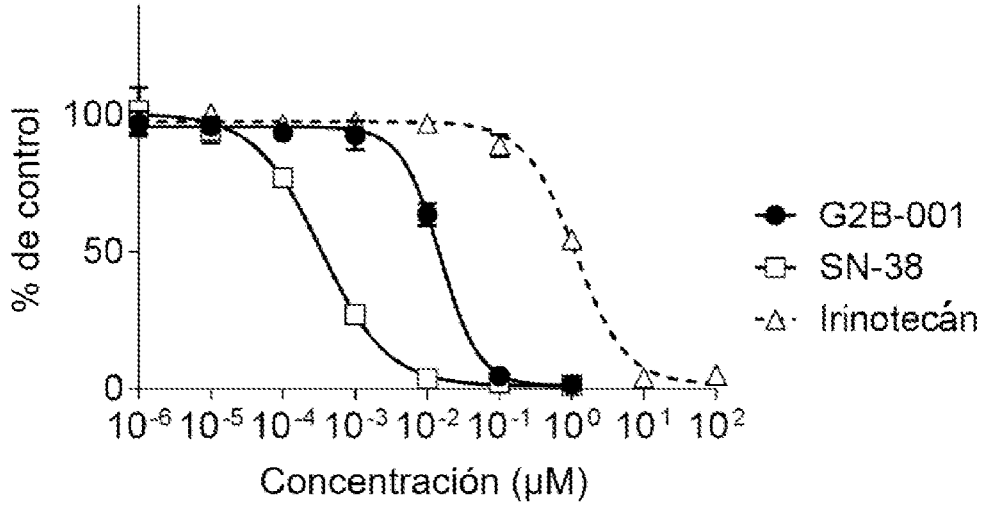


FIG. 7

RETINOBLASTOMA: HSJD-RBT-14

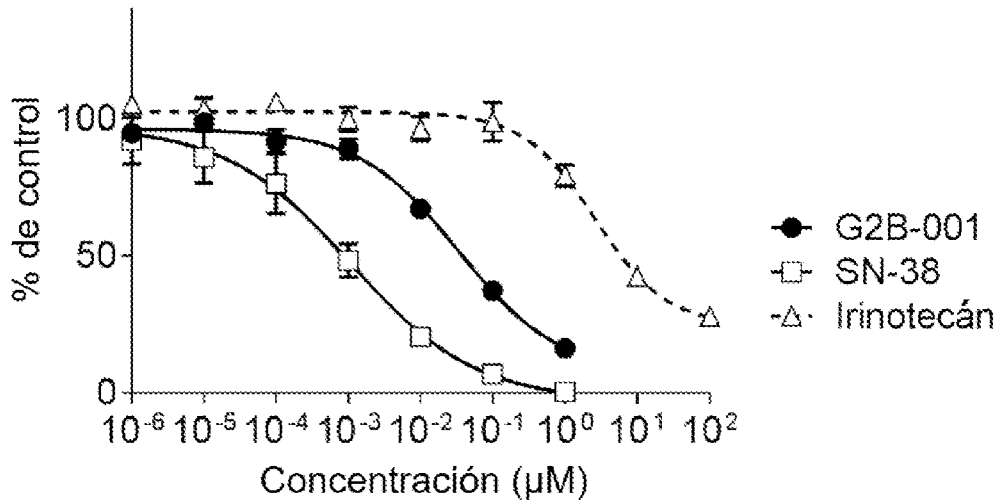


FIG. 8

SARCOMA DE EWING: A673

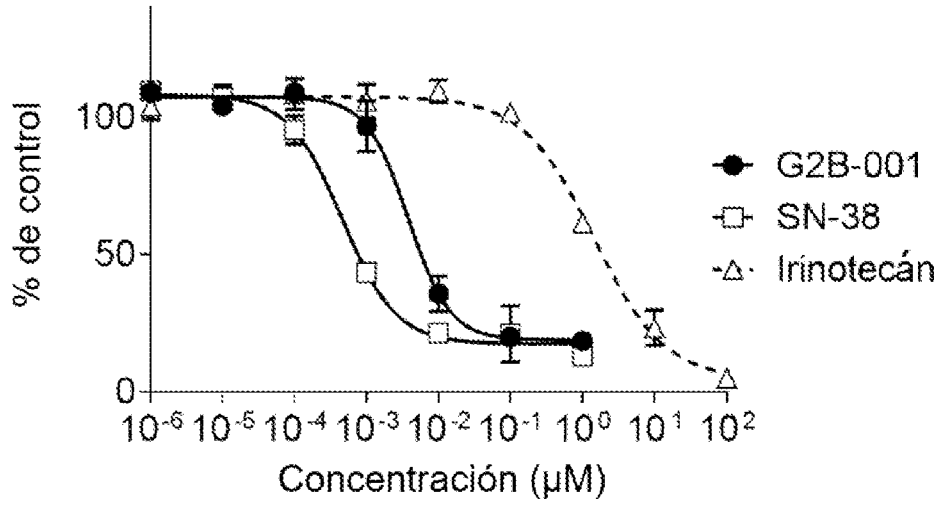


FIG. 9

RABDOMIOSARCOMA: Rd

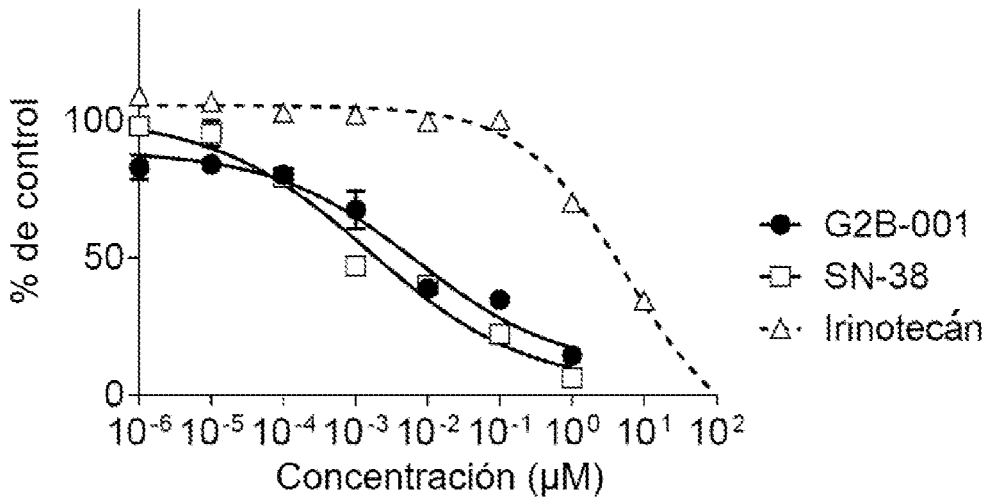


FIG. 10

RABDOMIOSARCOMA: RH4

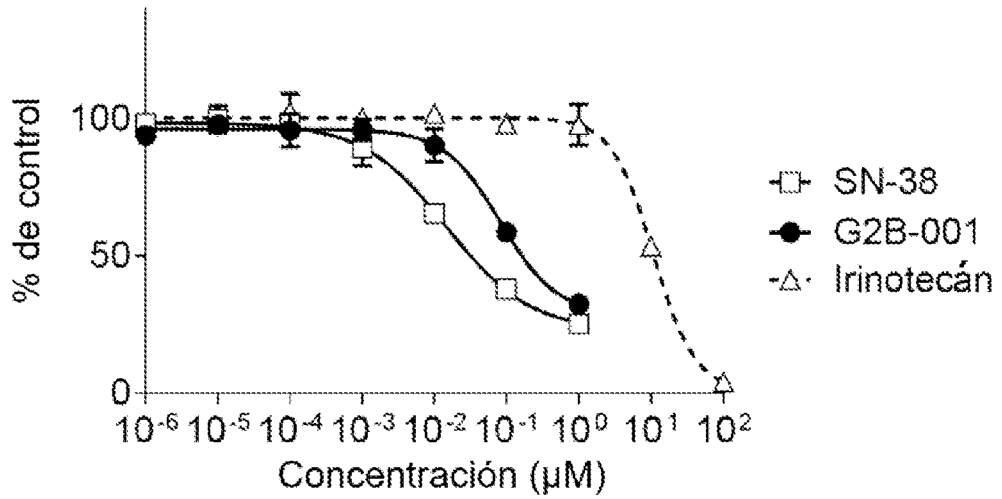


FIG.11

NEUROBLASTOMA: LAN-1

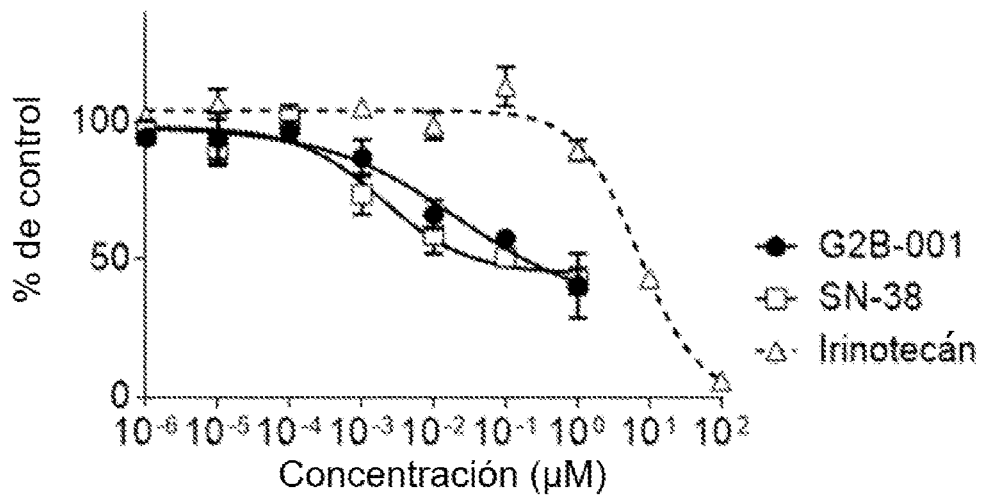


FIG. 12

NEUROBLASTOMA: SK-N-JD

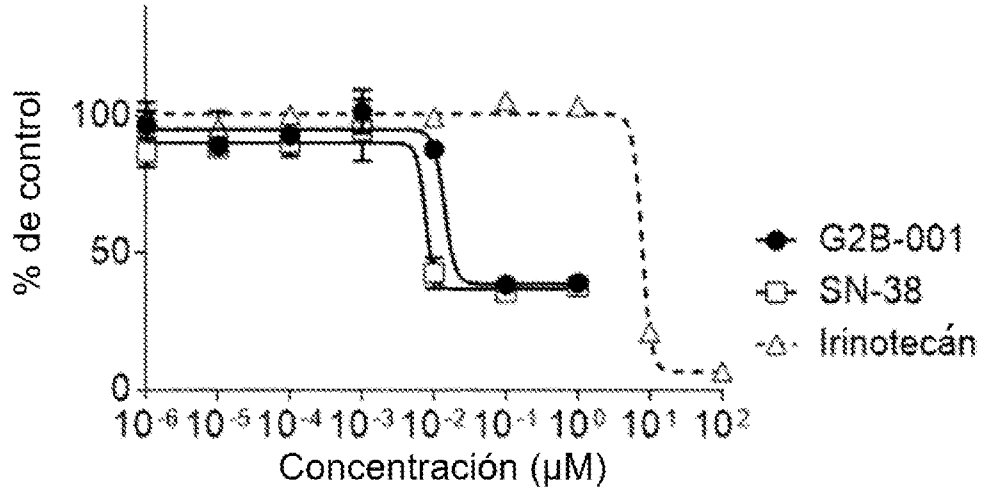


FIG. 13

NEUROBLASTOMA: HSJD-NB-004

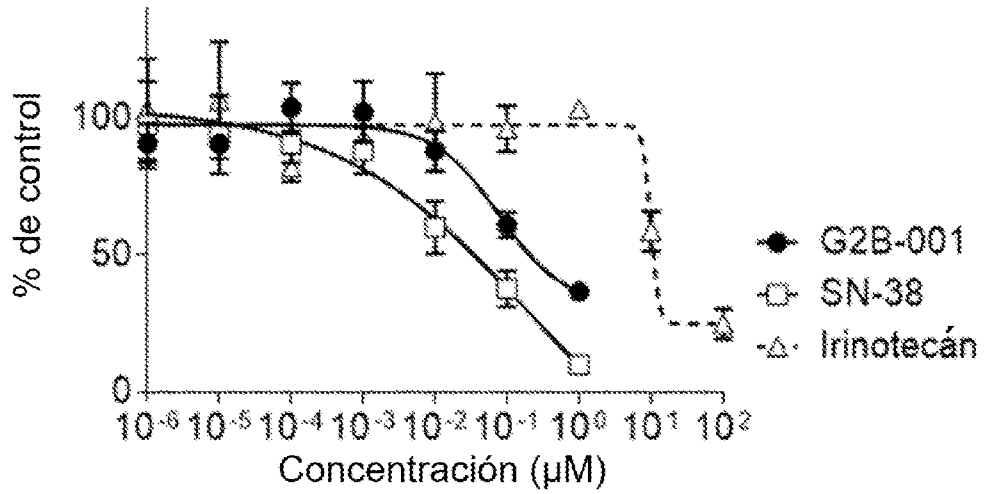


FIG. 14

NEUROBLASTOMA: NB-005

NEUROBLASTOMA: NB-005

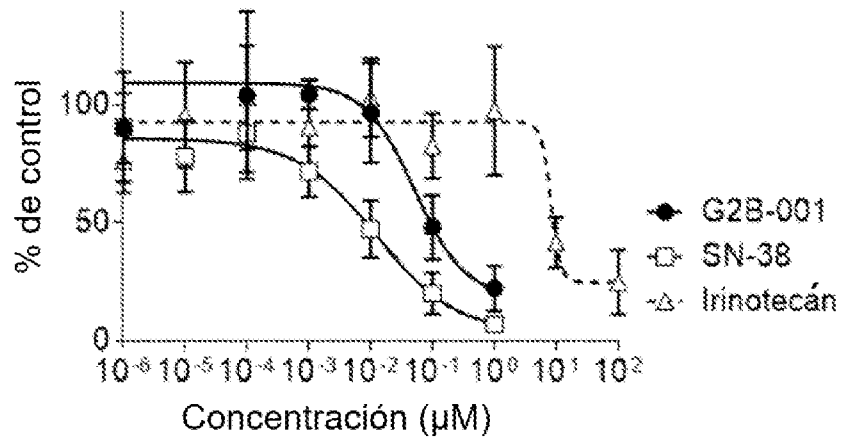


FIG. 15

NEUROBLASTOMA: HSJD-NB-016

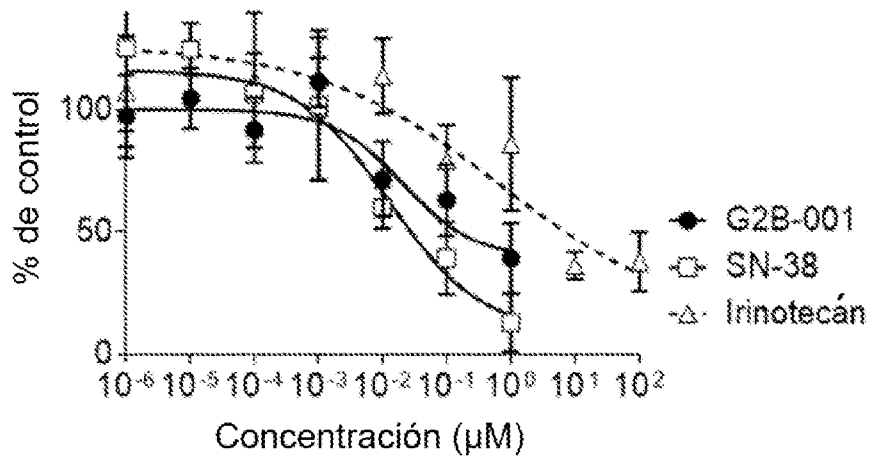


FIG. 16

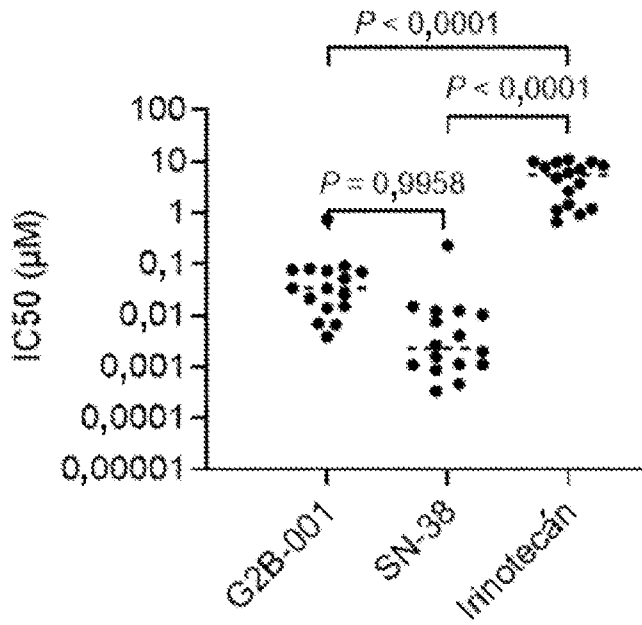


FIG. 17

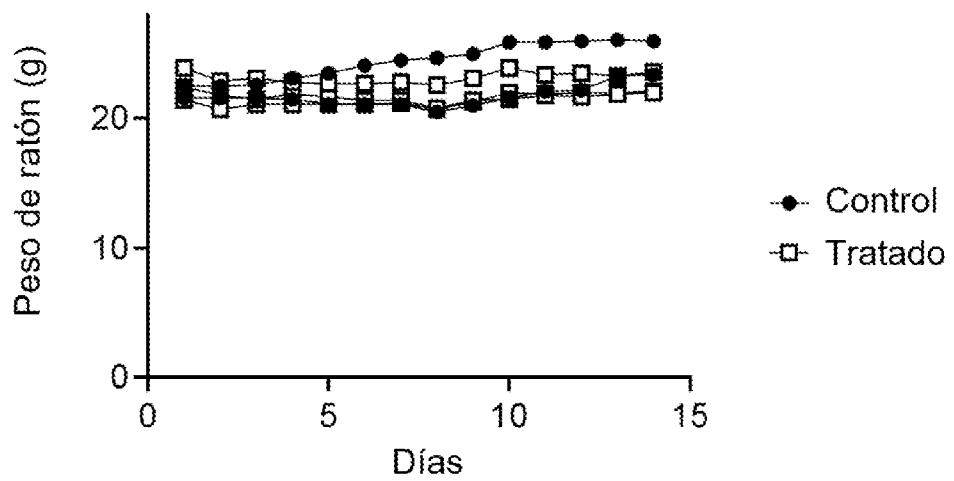


FIG. 18

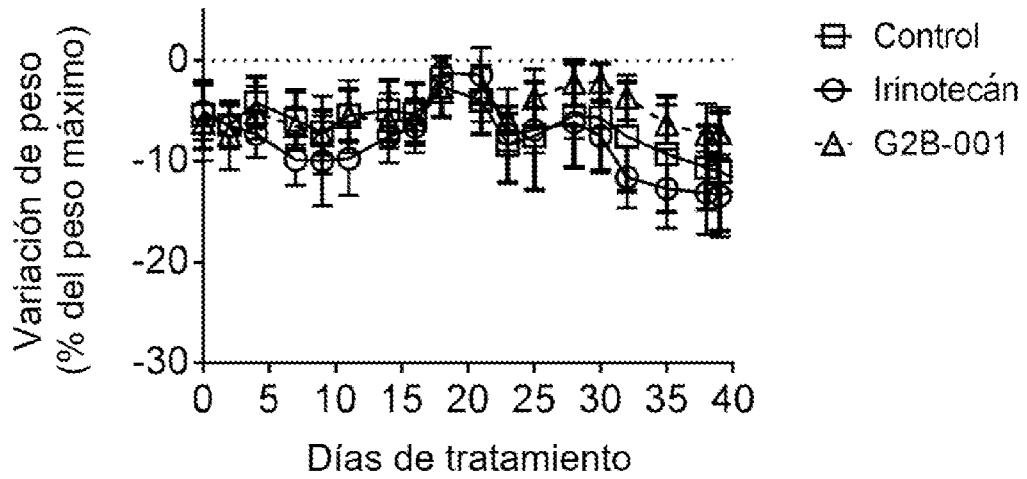


FIG. 19

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-DIPG-007

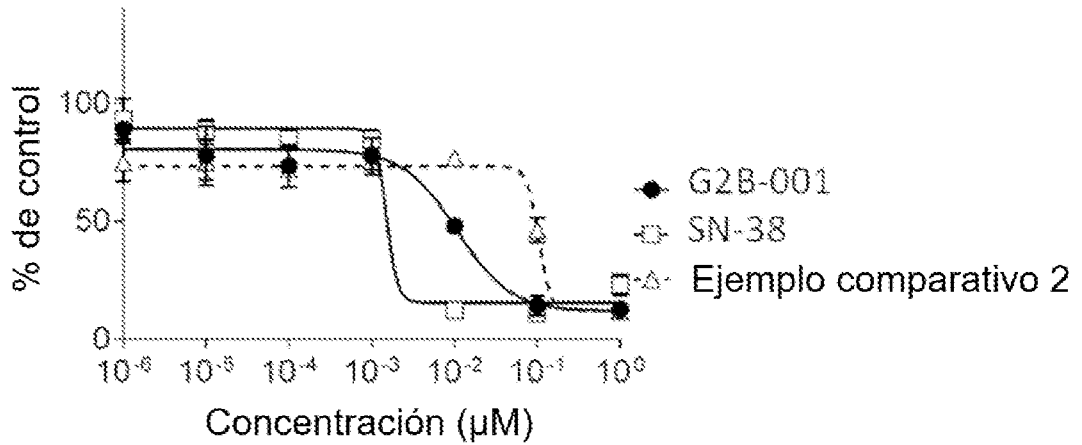


FIG. 20

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-GBM-001

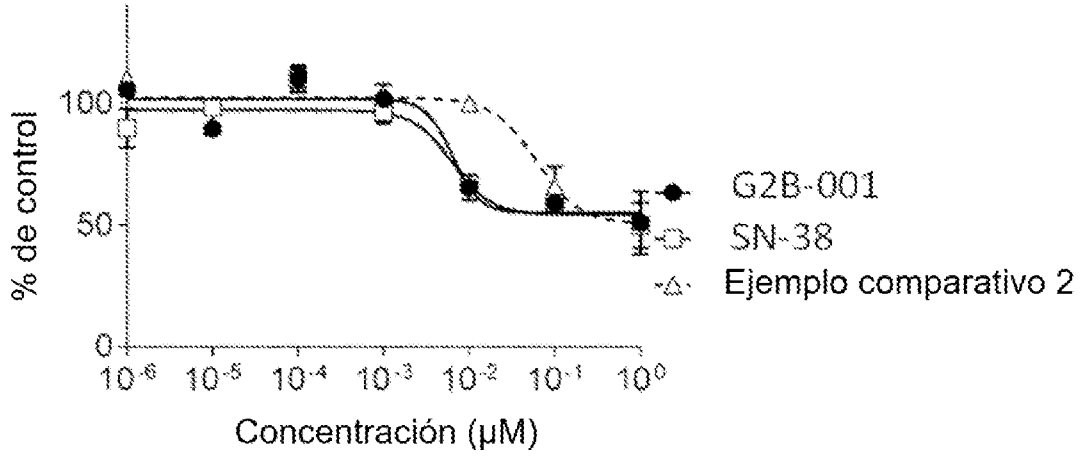


FIG. 21

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-DIPG-007

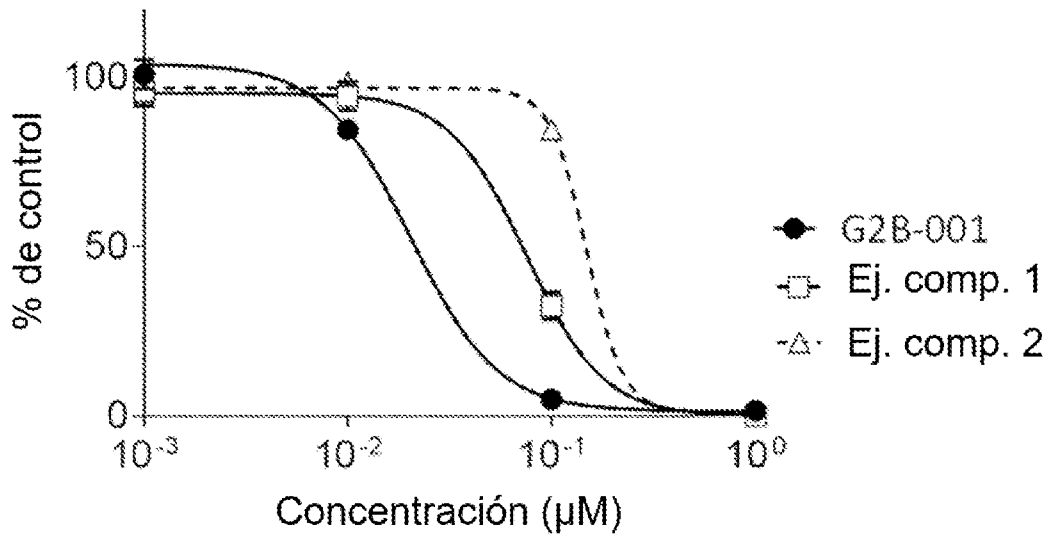


FIG. 22

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-GBM-001

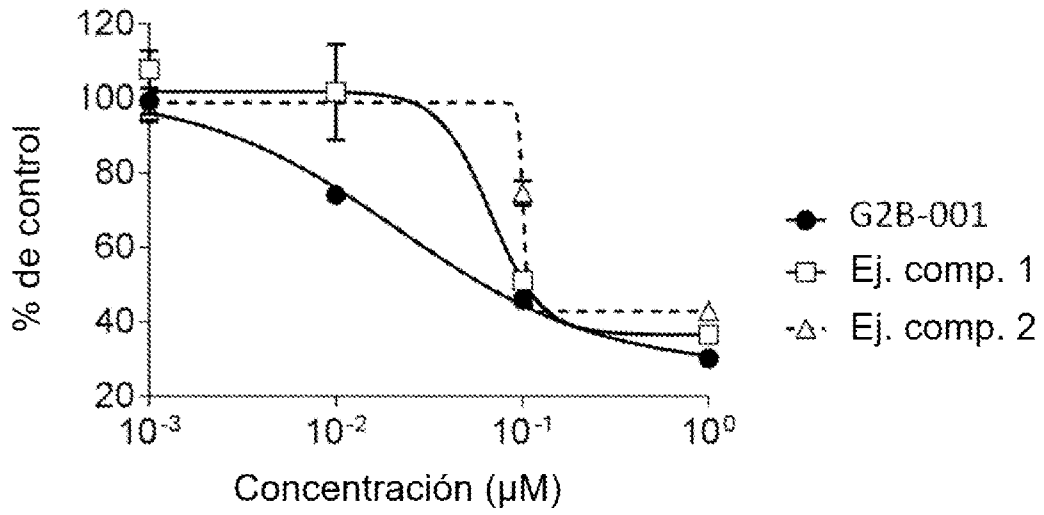


FIG. 23

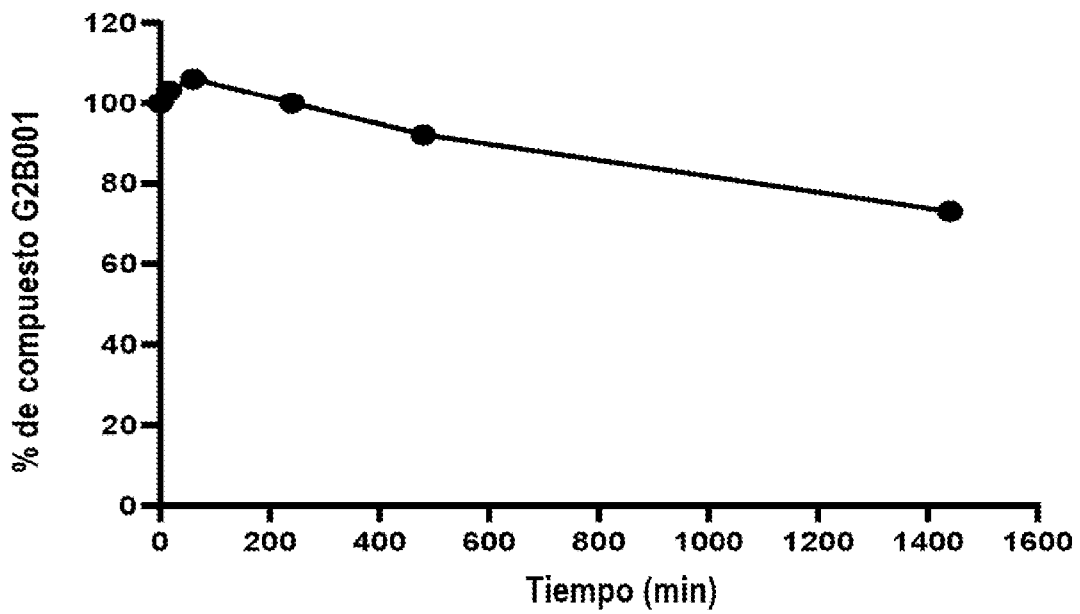


FIG. 24

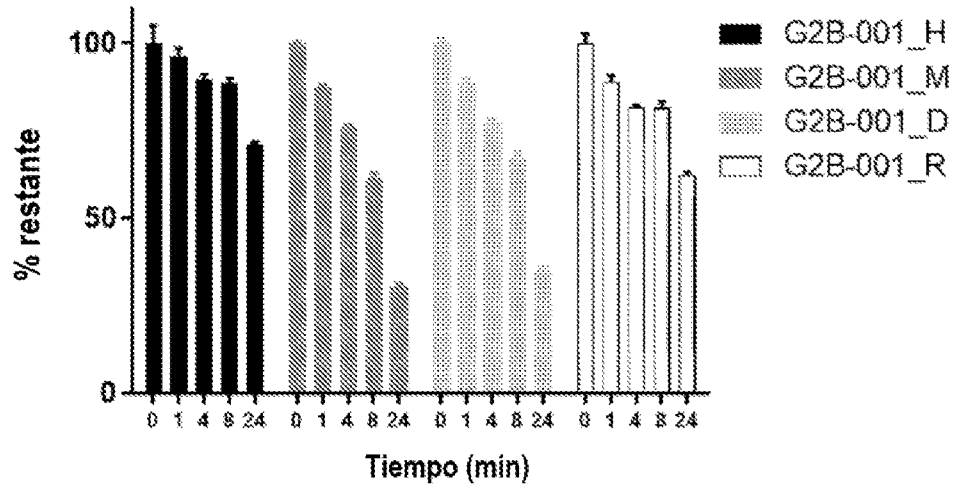


FIG. 25

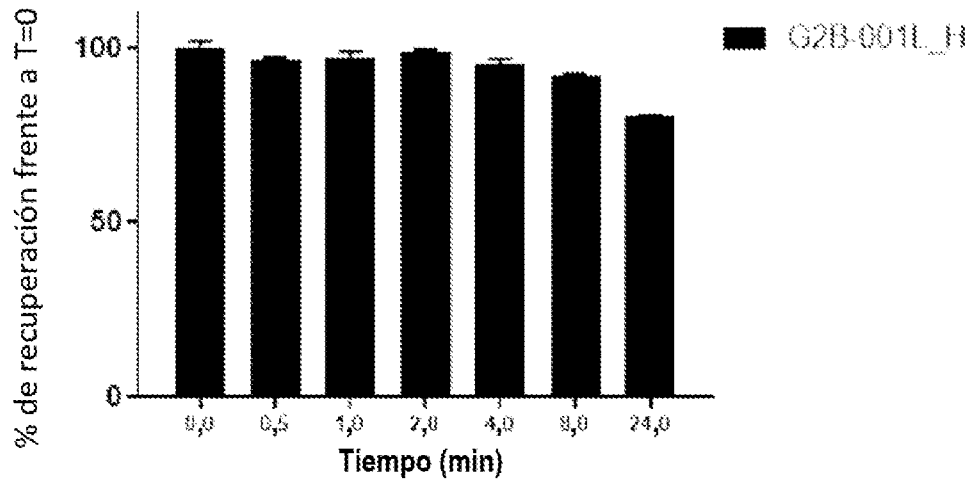


FIG 26

GLIOMA PEDIÁTRICO: HSJD-DIPG-007

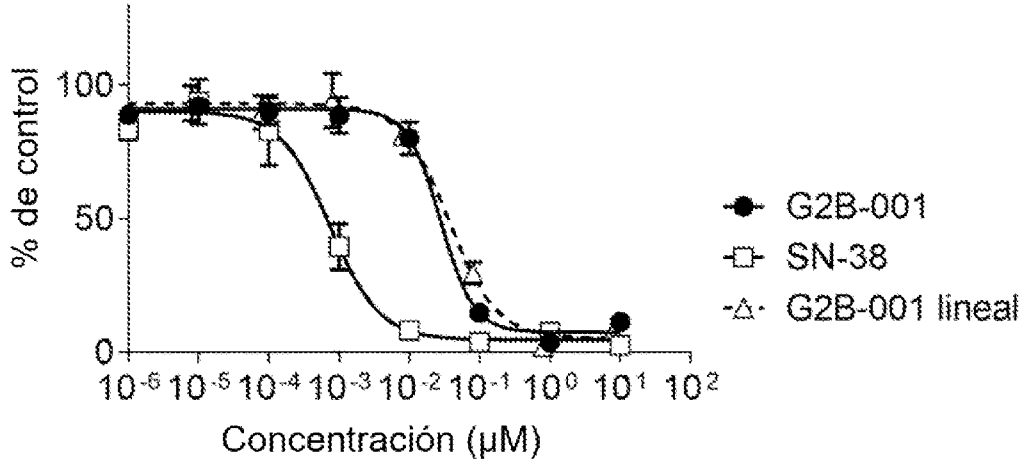


FIG. 27

NEUROBLASTOMA: HSJD-NB-013

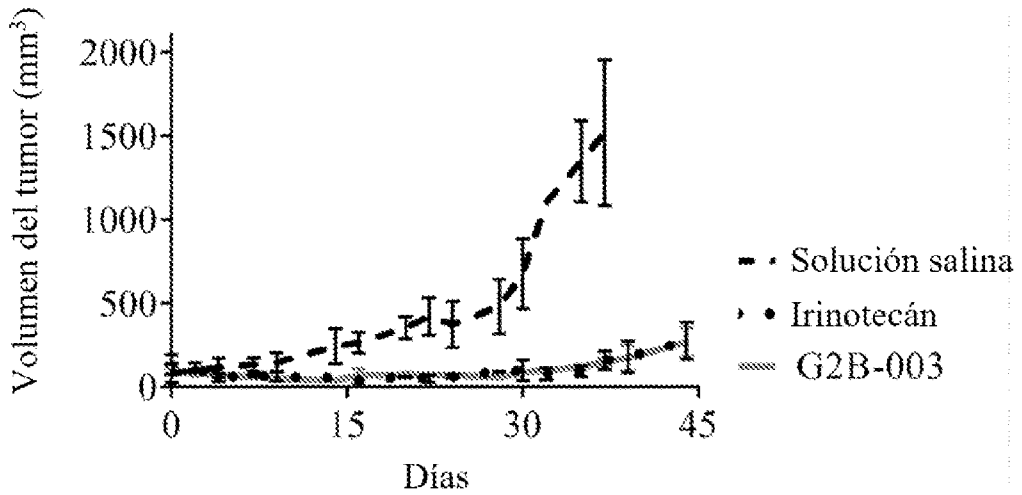


FIG. 28