

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 010 545**

⑮ Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/5365 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2017 PCT/GB2017/051250**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2017 WO17191460**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2017 E 17723745 (0)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 3452096**

⑮ Título: **Conjugados péptido bicíclico-toxina específicos para MT1-MMP**

⑳ Prioridad:

04.05.2016 GB 201607827

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2025

⑯ Titular/es:

**BICYCLERD LIMITED (100.00%)
Blocks A & B, Portway Building Granta Park,
Great Abington
Cambridge, CB21 6GS, GB**

⑯ Inventor/es:

**TEUFEL, DANIEL;
PAVAN, SILVIA y
BALDASSARRE, LEONARDO**

⑯ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 3 010 545 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 péptido bicíclico-toxina específicos para MT1-MMP

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados de fármacos que comprenden péptidos bicíclicos específicos para MT1-MMP conjugados con uno o más grupos efectores y/o funcionales que tienen utilidad en la terapia contra el cáncer dirigida.

10

Antecedentes de la invención

Los péptidos cíclicos son capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a dianas proteicas y, por lo tanto, son una clase de moléculas atractiva para el desarrollo de opciones terapéuticas. De hecho, varios péptidos cíclicos ya se usan con éxito en la clínica, como, por ejemplo, el péptido antibacteriano vancomicina, el fármaco inmunosupresor ciclosporina o el fármaco antineoplásico octreótido (Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Las buenas propiedades de unión son resultado de una superficie de interacción relativamente grande formada entre el péptido y la diana así como de la flexibilidad conformacional reducida de las estructuras cíclicas. Normalmente, los macrociclos se unen a superficies de varios cientos de angstroms cuadrados, como, por ejemplo, el antagonista 20 CVX15 de péptido cíclico CXCR4 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), *Science* 330, 1066-71), un péptido cíclico con el motivo Arg-Gly-Asp que se une a la integrina αVb3 (355 Å²) (Xiong *et al.* (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) o el inhibidor del péptido cíclico upaína-1 que se une al activador del plasminógeno de tipo urocinasa (603 Å²; Zhao *et al.* (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

25 Debido a su configuración cíclica, los macrociclos peptídicos son menos flexibles que los péptidos lineales, lo que conduce a una menor pérdida de entropía al unirse a las dianas y da como resultado una mayor afinidad de unión. La flexibilidad reducida también conduce al bloqueo de conformaciones específicas de la diana, lo que aumenta la especificidad de unión en comparación con los péptidos lineales. Este efecto se ha ejemplificado por un inhibidor 30 potente y selectivo de la metaloproteinasa de matriz 8 (MMP-8) que perdió su selectividad sobre otras MMP cuando se abrió su anillo Cherney *et al.* (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Las propiedades de unión favorables logradas a través de la macrociclación son incluso más pronunciadas en péptidos multicíclicos que tienen más de un anillo peptídico como, por ejemplo, en vancomicina, nisina y actinomicina.

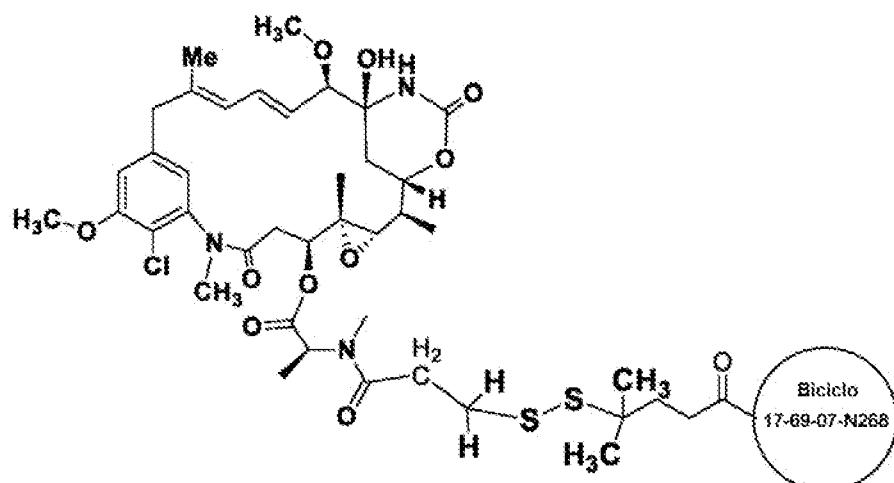
35 Diferentes equipos de investigación han unido previamente polipéptidos con restos cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp y McNamara (1985), *J. Org. Chem.*; Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). Meloen y sus colaboradores habían utilizado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos sobre armazones sintéticos para la imitación estructural de superficies de proteínas (Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). En los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161 se describen métodos para la generación de compuestos candidatos a fármacos en donde dichos compuestos se generan 40 uniendo polipéptidos que contienen cisteína a un armazón molecular como, por ejemplo, tris(bromometil)benceno.

45 Se han desarrollado enfoques combinatorios basados en la presentación en fagos para generar y cribar grandes bibliotecas de péptidos bicíclicos para dianas de interés (Heinis *et al.* (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 y documento WO2009/098450). Resumiendo, se presentaron en fago bibliotecas combinatorias de péptidos lineales que contenían tres restos cisteína y dos regiones de seis aminoácidos aleatorios (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) y se ciclaron uniendo covalentemente las cadenas laterales de cisteína a una molécula pequeña (tris(bromometil)benceno).

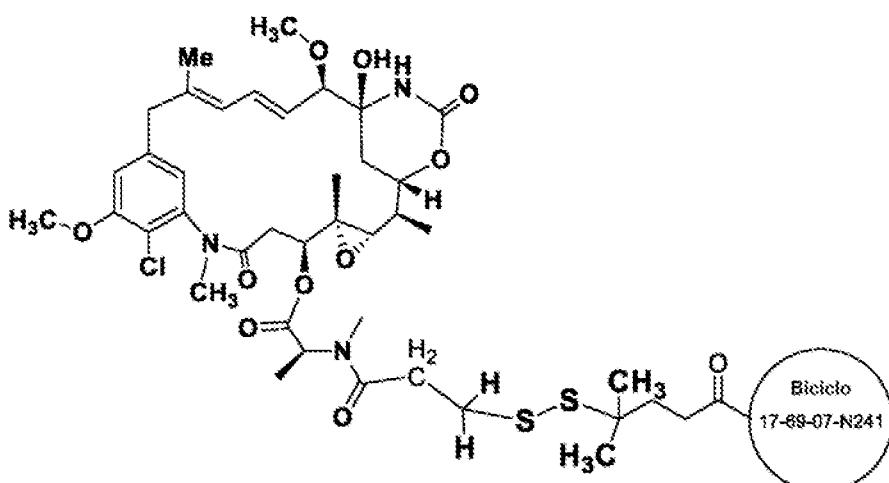
Bouchard *et al.* (2014) *Bioorg Med Chem Lett*, 24(23):5357-63 desvela conjugados anticuerpo-fármaco.

50 **Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco seleccionado de BT17BDC-27:



o BT17BDC-28:



5

en donde Biciclo 17-69-07-N268 representa $-AC_i(D\text{-Ala})NE(1Nal)(D\text{-Ala})C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}-CONH_2$ y Biciclo 17-69-07-N241 representa $-(b\text{Ala})\text{-Sar}10\text{-}AC_i(D\text{-Ala})NE(1Nal)(D\text{-Ala})C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}-CONH_2$, de los cuales ambos se ciclan en C_i , C_{ii} y C_{iii} con 1,3,5-tris(bromometil)benceno (TBMB) produciendo una estructura de 1,3,5-trimetilbenceno trisustituido.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco como se define en el presente documento junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjugado de fármaco como se define en el presente documento para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos.

20 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo para BT17BDC-27 en ratones con xenoinjerto de EBC-1. Las dosis se administraron los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14.

25 **Figura 2:** Peso corporal durante el tratamiento de ratones con xenoinjerto de EBC-1 con BT17BDC-27, que es indicativo de la toxicología asociada al fármaco y de la salud global del animal.

Figura 3: Gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo para BT17BDC-28 en ratones con xenoinjerto de EBC-1. Las dosis se administraron los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14.

30

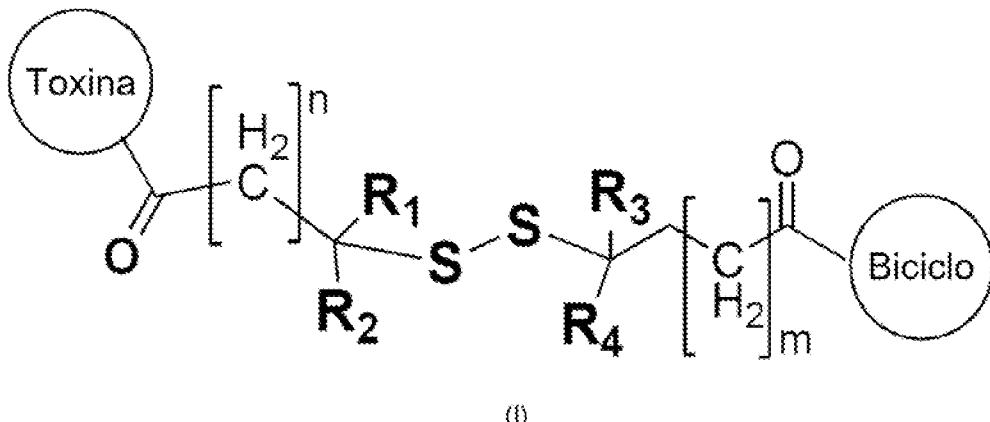
Figura 4: Peso corporal durante el tratamiento de ratones con xenoinjerto de EBC-1 con BT17BDC-28, que es indicativo de la toxicología asociada al fármaco y de la salud global del animal.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden normalmente los expertos habituales en la materia, tal como en las técnicas de la química de péptidos, cultivo celular y presentación en fagos, química de ácidos nucleicos y bioquímica. Se usan técnicas convencionales para biología molecular, métodos genéticos y bioquímicos (véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.^a ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4.^a ed., John Wiley & Sons, Inc.).

Conjugados farmacológicos

En el presente documento se desvela un conjugado de fármaco de fórmula (I):



en donde R₁ y R₂ representan ambos hidrógeno;

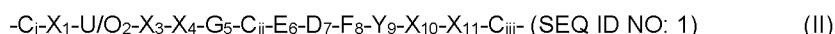
R₃ y R₄ representan ambos alquilo C₁₋₆;

n representa un número entero seleccionado de 1 a 10;

m representa un número entero seleccionado de 0 a 10;

Toxina se refiere a un agente citotóxico;

Biciclo representa un ligando peptídico específico para MT1-MMP que comprende un polipéptido que comprende al menos tres restos cisteína, separados por al menos dos secuencias de bucle, y un armazón molecular que forma enlaces covalentes con los restos cisteína del polipéptido de tal manera que se formen al menos dos bucles de polipéptido en el armazón molecular, en donde el ligando peptídico comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en donde:

C_i, C_{ii} y C_{iii} representan un primer, un segundo y un tercer restos cisteína, respectivamente;

X representa cualquier resto de aminoácido;

U representa un resto de aminoácido polar sin carga seleccionado de N, C, Q, M, S y T; y

O representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de G, A, I, L, P y V.

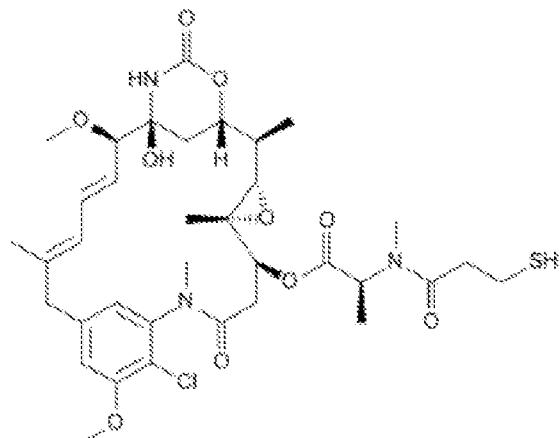
En una realización particular de la divulgación, el agente citotóxico se selecciona de: agentes alquilantes tales como cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida; Antimetabolitos incluyendo análogos de purina, azatioprina y mercaptoperina o análogos de pirimidina; alcaloides y terpenoides vegetales incluyendo alcaloides de la vinca tales como Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina y Vindesina;

Podofilotoxina y sus derivados etopósido y tenipósido; Taxanos, incluyendo paclitaxel, originalmente conocido como Taxol; inhibidores de la topoisomerasa incluyendo camptotecinas: irinotecán y topotecán, e inhibidores de tipo II incluyendo amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido. Los agentes adicionales pueden incluir antibióticos antitumorales que incluyen el inmunosupresor dactinomicina (que se usa en trasplantes de riñón), doxorubicina, epirubicina, bleomicina, caliqueamicinas y otros.

En una realización particular adicional de la divulgación, el agente citotóxico se selecciona de maitansinoides (tales

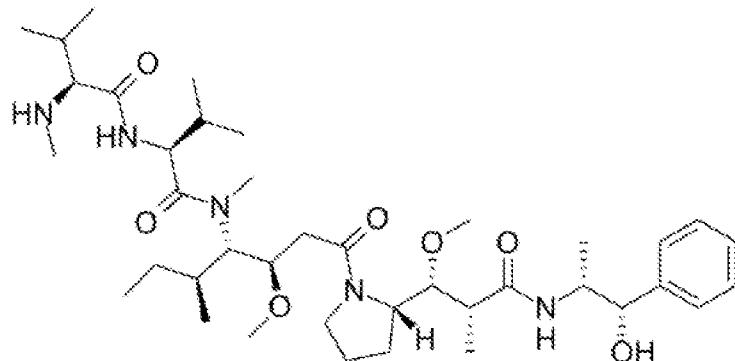
como DM1) o monometilauristatinas (tales como MMAE).

DM1 es un agente citotóxico que es un derivado de maitansina que contiene tiol y tiene la siguiente estructura:



5

La monometilauristatina E (MMAE) es un agente antineoplásico sintético y tiene la siguiente estructura:



10

En el presente documento se presentan datos de los Ejemplos 1 a 3, que demuestran los efectos de los ligandos peptídicos conjugados con toxinas que contienen DM1.

15 La expresión alquilo C₁₋₆, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de dichos grupos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc* butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo o hexilo y similares.

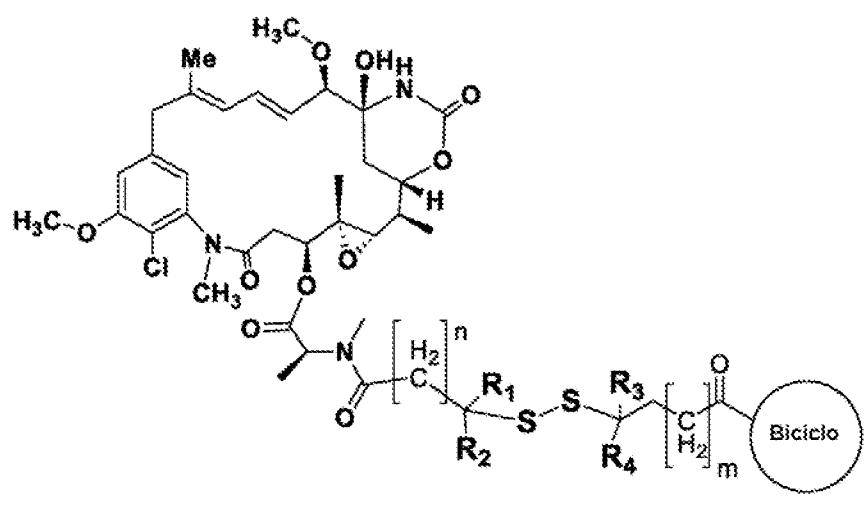
En una realización, R³ y R⁴ son ambos metilo.

20 En una realización, n representa 1.

En una realización, m representa 1.

En una realización, R³ y R⁴ son ambos metilo, n representa 1 y m representa 1.

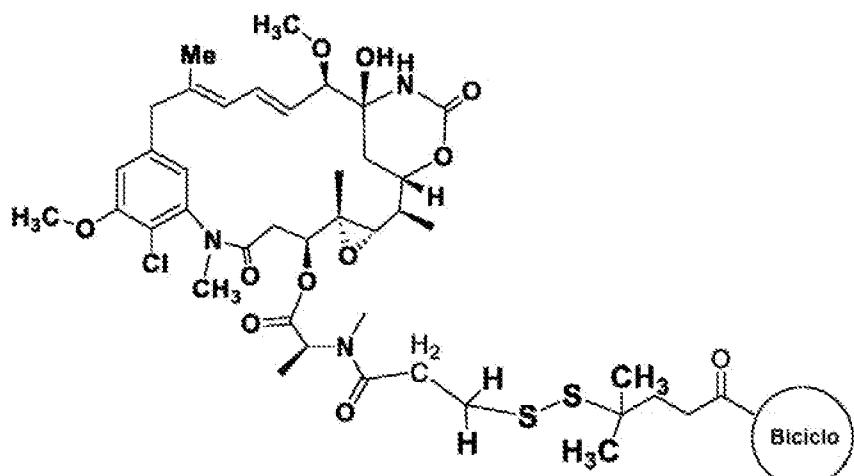
25 En una realización de la divulgación, la toxina es una maytansina y el conjugado comprende un compuesto de fórmula (III):



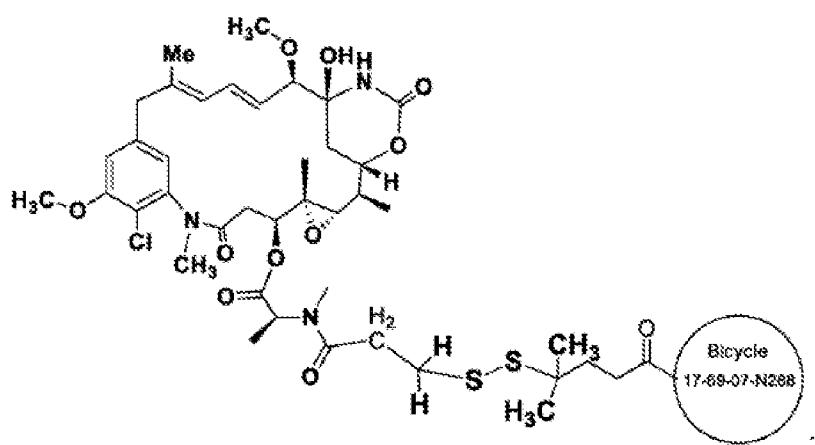
(III)

en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , n , m y Biciclo son como se definen en el presente documento.

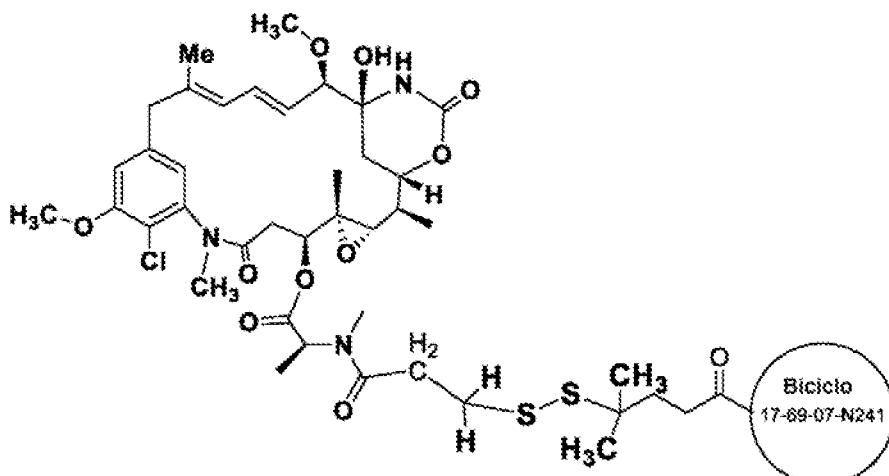
- 5 En una realización adicional de la divulgación del conjugado de fórmula (III), n y m representan 1, R_1 y R_2 representan ambos hidrógeno y R_3 y R_4 representan ambos metilo, es decir, un compuesto de fórmula (III)^a:

(III)^a

- 10 De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el conjugado de fórmula (III) o (III)^a se selecciona de BT17BDC-27:



o BT17BDC-28:



5 BT17BDC-28 emplea el Péptido Bicíclico estabilizado homólogo (17-69-07-N241) que está unido por amida a la construcción de toxina-disulfuro. Este derivado no impedido de la maytansina con $n = 1$ se denomina DM1. La molécula contiene dos grupos metilo de impedimento en el lado del Biciclo, y en el contexto del conjugado anticuerpo-fármaco produce una reducción de 14 veces en su sensibilidad a un agente reductor tal como ditiotreitol. La sensibilidad reducida a la reducción se correlaciona con una menor velocidad de liberación de toxinas.

10 BT17BDC-27 emplea el Péptido Bicíclico estabilizado homólogo (17-69-07-N268) que carece del espaciador molecular bAla-Sar10 de 17-69-07-N241, y que está unido por amida a la construcción toxina-disulfuro. La ausencia del espaciador molecular proporciona una molécula global más pequeña, a costes de síntesis reducidos, con una mayor 15 relación de toxinas por PAF. Este derivado no impedido de la maytansina con $n = 1$ se denomina DM1. La molécula contiene dos grupos metilo de impedimento en el lado del Biciclo, y en el contexto del conjugado anticuerpo-fármaco produce una reducción de 14 veces en su sensibilidad a un agente reductor tal como ditiotreitol. La sensibilidad reducida a la reducción se correlaciona con una menor velocidad de liberación de toxinas.

20 **Nomenclatura**

Numeración

25 Cuando se hace referencia a posiciones de restos de aminoácidos dentro de compuestos de fórmula (II), los restos cisteína (C_i , C_{ii} y C_{iii}) se omiten de la numeración porque son invariantes, por lo tanto, la numeración de los restos de aminoácidos dentro del compuesto de fórmula (II) se indica a continuación:

- C_i - X_1 - U - O_2 - X_3 - X_4 - G_5 - C_{ii} - E_6 - D_7 - F_8 - Y_9 - X_{10} - X_{11} - C_{iii} - (SEQ ID NO: 1).

30 Para los fines de esta descripción, se supone que todos los péptidos bicíclicos se ciclan con TBMB (1,3,5-tris(bromometil)benceno) produciendo una estructura de 1,3,5-trimetilbenceno trisustituido. La ciclación con TBMB se produce en C_i , C_{ii} y C_{iii} .

Secuencia central del péptido bicíclico

35 A cada péptido bicíclico desvelado en el presente documento se le ha asignado un número único de secuencia central que se define como la secuencia de aminoácidos entre la primera cisteína N-terminal (C_i) y la última cisteína C-terminal (C_{iii}). En el ejemplo del identificador 17-69-07, la secuencia central es C_i YNEFGC $_{ii}$ EDFYDIC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 2), y se denomina "17-69-07" o "(17-69-07)".

Código peptídico

40 A determinados péptidos bicíclicos desvelados en el presente documento también se les ha asignado un identificador único usando un código peptídico, tal como 17-69-07-N241, en donde N241 indica un derivado particular de la secuencia central del biciclo 17-69-07. Los diferentes derivados de 17-69-07 tienen diferentes números N, es decir, N001, N002, Nxxx.

Formato molecular

Las extensiones en el extremo N o C de la secuencia central del biciclo se añaden al lado izquierdo o derecho de la secuencia central, separadas por un guion. Por ejemplo, una cola bAla-Sar10-Ala N-terminal se indicaría como:

- 5 bAla-Sar10-A-(17-69-07)
y tiene la secuencia completa de β Ala-Sar10-A-CYNEFGCEDFYDIC (SEQ ID NO: 3).

Modificaciones

10 Las sustituciones de aminoácidos no naturales dentro de la secuencia central del biciclo se indican después de la descripción del Formato molecular. Por ejemplo, si la Tirosina 1 en 17-69-07 se sustituye por D-Alanina, la descripción es (17-69-07) D-Ala1, y la secuencia completa se describiría como C(D-Ala1)NEFGCEDFYDIC (SEQ ID NO: 4).

15 Si se une una cola N-terminal o C-terminal a un péptido bicíclico que también contiene modificaciones en la secuencia central, entonces, mediante el uso de 17-69-07-N241 como ejemplo, la descripción del Formato Molecular es:
bAla-Sar10-A-(17-69-07) DAla1 1Nal4 DAla5 tBuGly11.

Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos completa de 17-69-07-N241 es:
bAla-Sar10-A- C(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)CEDFYD(tBuGly)C (SEQ ID NO: 5).

20 **Ligandos peptídicos bicíclicos de Fórmula (II)**

25 Un ligando peptídico, como se denomina en el presente documento, se refiere a un péptido unido covalentemente a un armazón molecular. Normalmente, dichos péptidos comprenden dos o más grupos reactivos (es decir, restos cisteína) que son capaces de formar enlaces covalentes con el armazón, y una secuencia delimitada entre dichos grupos reactivos que se denomina secuencia de bucle, ya que forma un bucle cuando el péptido se une al armazón. En el presente caso, los péptidos comprenden al menos tres restos cisteína (denominados en el presente documento C_i, C_{ii} y C_{iii}) y forman al menos dos bucles en el armazón.

30 El experto apreciará que la X en las posiciones 1, 3, 4, 10 y 11 de la fórmula (II) puede representar cualquier aminoácido siguiendo los resultados de un barrido de alanina y salidas de selección que permitan sustituciones bien toleradas en estas posiciones.

35 En una realización de la divulgación, la X en la posición 1 de la fórmula (II) se selecciona de uno cualquiera de los siguientes aminoácidos: Y, M, F o V. En una realización adicional de la divulgación, la X en la posición 1 de la fórmula (II) se selecciona de Y, M o F. En una realización adicional más de la divulgación, la X en la posición 1 de la fórmula (II) se selecciona de Y o M. En otra realización adicional más, la X en la posición 1 de la fórmula (II) se selecciona de Y.

40 En una realización de la divulgación, la U/O en la posición 2 de la fórmula (II) se selecciona de un U, tal como un N. En una realización alternativa de la divulgación, la U/O en la posición 2 de la fórmula (II) se selecciona de un O, tal como un G.

45 En una realización de la divulgación, la X en la posición 3 de la fórmula (II) se selecciona de U o Z, en donde U representa un resto de aminoácido polar sin carga seleccionado de N, C, Q, M, S y T y Z representa un resto de aminoácido polar con carga negativa seleccionado de D o E. En una realización adicional de la divulgación, la U en la posición 3 de la fórmula (II) se selecciona de Q. En una realización alternativa de la divulgación, la Z en la posición 3 de la fórmula (II) se selecciona de E.

50 En una realización de la divulgación, la X en la posición 4 de la fórmula (II) se selecciona de J, en donde J representa un resto de aminoácido aromático no polar seleccionado de F, W e Y. En una realización adicional de la divulgación, la J en la posición 4 de la fórmula (II) se selecciona de F. En una realización alternativa de la divulgación, la J en la posición 4 de la fórmula (II) se selecciona de Y. En una realización alternativa de la divulgación, la J en la posición 4 de la fórmula (II) se selecciona de W.

55 En una realización de la divulgación, la X en la posición 10 de la fórmula (II) se selecciona de Z, en donde Z representa un resto de aminoácido polar con carga negativa seleccionado de D o E. En una realización de la divulgación, la Z en la posición 10 de la fórmula (II) se selecciona de D.

60 En una realización de la divulgación, la X en la posición 11 de la fórmula (II) se selecciona de O, en donde O representa un resto de aminoácido alifático no polar seleccionado de G, A, I, L, P y V. En una realización de la divulgación, la O en la posición 11 de la fórmula (II) se selecciona de I.

En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIa):

- 65 -C_i-Y/M/F/V-U/O-U/Z-J-G-C_{ii}-E-D-F-Y-Z-O-C_{iii}- (SEQ ID NO: 6) (IIa);

en donde U, O, J y Z son como se han definido anteriormente en el presente documento.

En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIb):

5 -C_i-Y/M/F/V-N/G-E/Q-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (SEQ ID NO: 7) (IIb).

En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIc):

10 -C_i-Y/M/F-N/G-E/Q-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (SEQ ID NO: 8) (IIc).

10 En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IId):

15 -C_i-Y/M-N-E/Q-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (SEQ ID NO: 9) (IId).

15 En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula (II) es un compuesto de fórmula (IIe):

20 -C_i-Y-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2) (IIe).

20 En una realización adicional más de la divulgación, el péptido de fórmula (II) comprende una secuencia seleccionada de:

25 -C_i-Y-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2);

-C_i-M-N-Q-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-12) (SEQ ID NO: 10);

-C_i-F-G-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-02) (SEQ ID NO: 11);

-C_i-V-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-03) (SEQ ID NO: 12);

-C_i-F-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-04) (SEQ ID NO: 13);

-C_i-Y-N-E-Y-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-07-N057) (SEQ ID NO: 14); y

-C_i-Y-N-E-W-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-44-N002) (SEQ ID NO: 15).

30 Los péptidos de esta realización se identificaron como candidatos potentes después de la maduración por afinidad contra el dominio hemopexina de MT1-MMP.

En otra realización adicional más de la divulgación, el péptido de fórmula (II) comprende una secuencia seleccionada de:

35

-C_i-Y-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2); y

-C_i-M-N-Q-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-12) (SEQ ID NO: 10).

40 Los péptidos de esta realización se identificaron como los candidatos de mayor afinidad después de la maduración por afinidad contra el dominio hemopexina de MT1-MMP, la síntesis de las secuencias bicíclicas centrales y la medición cuantitativa de las afinidades usando experimentos de competencia.

45 En otra realización adicional más de la divulgación, el péptido de fórmula (II) comprende una secuencia seleccionada de -C_i-Y-N-E-F-G-C_{ii}-E-D-F-Y-D-I-C_{iii}- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2). El péptido de esta realización se identificó como el miembro más potente y estable de la familia de ligandos peptídicos dentro de la fórmula (II).

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el péptido de fórmula (II) comprende una secuencia seleccionada de:

50 bAla-Sar10-A-(17-69-07) D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11 (17-69-07-N241, con la secuencia completa (bAla)-Sar10-AC_i(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}); o
A-(17-69-07) D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11 (17-69-07-N268, con la secuencia completa AC_i (D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}),

55 respectivamente, donde el extremo N está presente como el grupo amino libre y el extremo C está amidado.

En los Ejemplos 1-3 se presentan datos que demuestran propiedades *in vitro* e *in vivo* favorables de conjugados de fármacos que comprenden estos péptidos bicíclicos.

60 En una realización, determinados péptidos de fórmula (II) son totalmente reactivos cruzados con MT1-MMP murina, de perro, de macaco cangrejero y humana. En una realización adicional, los ligandos peptídicos ejemplificados específicamente de la invención son totalmente reactivos cruzados con MT1-MMP murina, de perro, de macaco cangrejero y humana. Por ejemplo, tanto los derivados no estabilizados como los estabilizados de 17-69-07 (es decir, 17-69-07-N219, 17-69-07-N241 y 17-69-07-N268) son totalmente reactivos cruzados.

65 En una realización adicional más de la divulgación, el péptido de fórmula (II) es selectivo para MT1-MMP, pero no

reacciona de forma cruzada con MMP-1, MMP-2, MMP-15 y MMP-16. La secuencia central 17-69-07 y la variante estabilizada 17-69-07-N258, son singularmente selectivas para MT1-MMP.

Ventajas de los ligandos peptídicos

5 Determinados péptidos bicíclicos de fórmula (II) tienen una serie de propiedades ventajosas que les permiten ser considerados como moléculas similares a fármacos adecuadas para la administración por inyección, inhalación, nasal, ocular, oral o tópica. Dichas propiedades ventajosas incluyen:

- 10 - Reactividad cruzada entre especies. Este es un requisito típico para la farmacodinámica preclínica y la evaluación farmacocinética;
- 15 - Estabilidad a las proteasas. Los ligandos peptídicos bicíclicos deberían demostrar idealmente estabilidad a proteasas plasmáticas, proteasas epiteliales ("ancladas a la membrana"), proteasas gástricas e intestinales, proteasas de la superficie pulmonar, proteasas intracelulares y similares. La estabilidad a proteasa debe mantenerse entre diferentes especies de tal manera que pueda desarrollarse un candidato líder bicíclico en modelos animales así como administrarlo con confianza a seres humanos;
- 20 - Perfil de solubilidad deseable. Esto va en función de la proporción de restos cargados e hidrófilos frente a hidrófobos y de enlaces de H intra/intermoleculares, que es importante para fines de formulación y absorción; y
- 25 - Una semivida en plasma óptima en la circulación. Dependiendo de la indicación clínica y del régimen de tratamiento, puede ser necesario desarrollar un péptido bicíclico para una exposición breve en un entorno de manejo de enfermedades agudas, o desarrollar un péptido bicíclico con una retención mejorada en la circulación y, por lo tanto, sea óptimo para el manejo de cuadros clínicos más crónicos. Otros factores que determinan la semivida en plasma deseable son los requisitos de exposición sostenida para una máxima eficiencia terapéutica frente a la toxicología acompañante debido a la exposición sostenida al agente.

Sales farmacéuticamente aceptables

30 Se apreciará que las formas de sal están dentro del alcance de esta divulgación, y las referencias a compuestos peptídicos bicíclicos de fórmula (II) incluyen las formas de sal de dichos compuestos.

35 Las sales de la presente divulgación pueden sintetizarse a partir del compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales tales como los métodos descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editora), ISBN: 3-90639-026-8, tapa dura, 388 páginas, agosto de 2002. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos.

40 Las sales de adición de ácido (monosalas o disales) pueden formarse con una amplia diversidad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen mono o di-sales formadas con un ácido seleccionado del grupo que consiste en los ácidos acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspártico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) alcanfórico, alcanfor-sulfónico, (+)-(1S)-alcanfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutárico, glicólico, hipúrico, ácidos hidroálicos (por ejemplo, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico), isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico, \pm -DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, \pm -DL-mandélico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, pirúvico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebálico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiociánico, p-toluenosulfónico, ácidos undecilénico y valérico, así como aminoácidos acilados y resinas de intercambio catiónico.

55 Un grupo particular de sales consiste en sales formadas a partir de los ácidos acético, clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, sulfúrico, metanosulfónico (mesilato), etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. Una sal particular es la sal de clorhidrato. Otra sal particular es la sal de acetato.

60 Si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con una base orgánica o inorgánica, generando un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metales alcalinos tales como Li⁺, Na⁺ y K⁺, cationes de metales alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes tales como Al³⁺ o Zn⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ion amonio (es decir, NH₄⁺) y iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Algunos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: metilamina, etilamina, dietilamina, propilamina, diciclohexilamina, trietilamina, butilamina,

etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

- 5 Cuando los compuestos de fórmula (II) contienen una función amina, éstos pueden formar sales de amonio cuaternario, por ejemplo, mediante reacción con un agente alquilante de acuerdo con métodos bien conocidos por el experto en la materia. Dichos compuestos de amonio cuaternario están dentro del alcance de la fórmula (II).

Derivados modificados

- 10 Se apreciará que los derivados modificados de los ligandos peptídicos como se definen en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación. Los ejemplos de dichos derivados modificados adecuados incluyen una o más modificaciones seleccionadas de: modificaciones N-terminales y/o C-terminales; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos por uno o más restos de aminoácidos no naturales (tal como el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos polares por uno o más aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos no polares con otros aminoácidos isostéricos o isoelectrónicos no naturales); adición de un grupo espaciador; reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación por uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación; sustitución de uno o más restos de aminoácidos por una alanina, reemplazo de uno o más restos de aminoácidos L por uno o más restos de aminoácidos D; N-alquilación de uno o más enlaces amida dentro del ligando peptídico bicíclico; reemplazo de uno o más enlaces peptídicos por un enlace sustituto; modificación de la longitud de la cadena principal del péptido; sustitución del hidrógeno en el carbono alfa de uno o más restos de aminoácidos con otro grupo químico, modificación de aminoácidos tales como cisteína, lisina, glutamato/aspartato y tirosina con reactivos adecuados reactivos con amina, tiol, ácido carboxílico y fenol para funcionalizar dichos aminoácidos, e introducción o reemplazo de aminoácidos que introducen reactividades ortogonales adecuadas para la funcionalización, por ejemplo, aminoácidos que portan grupos azida o alquino que permiten la funcionalización con restos fracciones que portan alquino o azida, respectivamente.

30 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende una modificación en la posición de aminoácido 1 y/o 9. Estas posiciones, especialmente cuando hay tirosina presente, son más susceptibles a la degradación proteolítica.

35 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal y/o C-terminal. En una realización adicional de la divulgación, en donde el derivado modificado comprende una modificación N-terminal usando una química amino-reactiva adecuada, y/o una modificación C-terminal usando una química carboxi-reactiva adecuada. En una realización adicional de la divulgación, dicha modificación N-terminal o C-terminal comprende la adición de un grupo efector, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico, un radioquelante o un cromóforo.

40 En una realización adicional de la divulgación, el derivado modificado comprende una modificación N-terminal. La modificación N-terminal puede comprender un grupo acetilo N-terminal, en donde el grupo cisteína N-terminal (el grupo denominado en el presente documento C_i) se protege con caperuza con anhídrido acético u otros reactivos apropiados durante la síntesis de péptidos dando lugar a una molécula acetilada N-terminalmente. Esto proporciona la ventaja de eliminar un punto de reconocimiento potencial para aminopeptidasas y evita el potencial de degradación del péptido bicíclico.

45 En una realización alternativa de la divulgación, la modificación N-terminal comprende la adición de un grupo espaciador molecular que facilita la conjugación de grupos efectores y la retención de la potencia del péptido bicíclico con su diana, tal como un grupo Ala, G-Sar10-A o bAla-Sar10-A. En una realización de la divulgación, el grupo espaciador se selecciona de bAla-Sar10-A (es decir, 17-69-07-N241). La adición de estos grupos espaciadores al péptido bicíclico 17-69-07 no altera la potencia frente a la proteína diana.

55 En una realización adicional de la divulgación, el derivado modificado comprende una modificación en el extremo C. La modificación C-terminal puede comprender un grupo amida, en donde el grupo cisteína C-terminal (el grupo denominado en el presente documento C_{iii}) se sintetiza como una amida durante la síntesis de péptidos dando lugar a una molécula amidada C-terminalmente. Esto proporciona la ventaja de eliminar un punto de reconocimiento potencial para la carboxipeptidasa y reduce el potencial de degradación proteolítica del péptido bicíclico.

60 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos por uno o más restos de aminoácidos no naturales. Pueden seleccionarse aminoácidos no naturales que tengan cadenas laterales isostéricas/iselectrónicas que no sean reconocidas por proteasas degradativas ni tengan ningún efecto adverso sobre la potencia de la diana.

65 Como alternativa, pueden usarse aminoácidos no naturales que tengan cadenas laterales de aminoácidos restringidas, de tal manera que la hidrólisis proteolítica del enlace peptídico cercano se impida conformacional y estéricamente. En particular, estos se refieren a análogos de prolina, cadenas laterales voluminosas, derivados disustituidos en C_a (por ejemplo, ácido aminoisobutírico, Aib) y aminoácidos cíclicos, siendo un derivado simple el ácido amino-

ciclopropilcarboxílico.

- En una realización de la divulgación, el resto de aminoácido no natural se sustituye en la posición 4. Varios restos de aminoácidos no naturales son bien tolerados en esta posición. En una realización adicional de la divulgación, los restos de aminoácidos no naturales, tales como los presentes en la posición 4, se seleccionan de: 1-naftilalanina; 2-naftilalanina; ciclohexilglicina; fenilglicina; *terc*-butilglicina; 3,4-diclorofenilalanina; ciclohexilalanina; y homofenilalanina.
- 5 En una realización adicional más de la divulgación, los restos de aminoácidos no naturales, tales como los presentes en la posición 4, se seleccionan de: 1-naftilalanina; 2-naftilalanina; y 3,4-diclorofenilalanina. Estas sustituciones potencian la afinidad en comparación con la secuencia de tipo silvestre sin modificar.
- 10 En una realización adicional más de la divulgación, los restos de aminoácidos no naturales, tales como los presentes en la posición 4, se seleccionan de: 1-naftilalanina. Esta sustitución proporcionó el mayor nivel de potenciación de la afinidad (más de 7 veces) en comparación con el tipo silvestre.
- 15 En una realización de la divulgación, el resto de aminoácido no natural se introduce en la posición 9 y/u 11. En estas posiciones se toleran bien varios restos de aminoácidos no naturales.
- 20 En una realización adicional de la divulgación, los restos de aminoácidos no naturales, tales como los presentes en la posición 9, se seleccionan de: 4-bromofenilalanina, pentafluoro-fenilalanina, tal como 4-bromofenilalanina.
- 25 En una realización adicional más de la divulgación, los restos de aminoácidos no naturales, tales como los presentes en la posición 11, se selecciona de: *terc*-butilglicina. La potenciación de la actividad y la fuerte protección de la cadena principal del aminoácido vecinal frente a la hidrólisis proteolítica se consigue mediante la obstrucción estérica.
- 30 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende una pluralidad de las modificaciones mencionadas anteriormente, tales como 2, 3, 4 o 5 o más modificaciones, por ejemplo, en donde el derivado modificado comprende 2, 3, 4 o 5 o más de las siguientes modificaciones, tales como todas las 5 modificaciones siguientes: D-alanina en las posiciones 1 y 5, una 1-naftilalanina en la posición 4, una 4-bromofenilalanina en la posición 9 y una *terc*-butilglicina en la posición 11. Esta multisustitución se tolera conjuntamente con una potencia que es superior a la del tipo silvestre. En una realización adicional más de la divulgación, el derivado modificado comprende las siguientes modificaciones: D-alanina en las posiciones 1 y 5, una 1-naftilalanina en la posición 4 y una *terc*-butilglicina en la posición 11. Esta multisustitución se tolera conjuntamente con una potencia que es superior a la del tipo silvestre.
- 35 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador. En una realización adicional de la divulgación, el derivado modificado comprende la adición de un grupo espaciador a la cisteína N-terminal (C_i) y/o la cisteína C-terminal (C_{ii}).
- 40 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos sensibles a la oxidación por uno o más restos de aminoácidos resistentes a la oxidación. En una realización adicional de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de un residuo de triptófano por un residuo de naftilalanina o alanina. Esta realización proporciona la ventaja de mejorar el perfil de estabilidad farmacéutica del ligando peptídico bicíclico resultante.
- 45 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos cargados por uno o más restos de aminoácidos hidrófobos. En una realización alternativa de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos hidrófobos por uno o más restos de aminoácidos cargados. El equilibrio correcto de restos de aminoácidos cargados frente a hidrófobos es una característica importante de los ligandos peptídicos bicíclicos. Por ejemplo, los restos de aminoácidos hidrófobos influyen en el grado de unión a proteínas plasmáticas y, por lo tanto, en la concentración de la fracción libre disponible en el plasma, mientras que los restos de aminoácidos cargados (en particular, arginina) pueden influir en la interacción del péptido con las membranas de fosfolípidos en las superficies celulares. Los dos en combinación pueden influir en la semivida, el volumen de distribución y la exposición del fármaco peptídico y pueden adaptarse de acuerdo con el criterio de valoración clínico. Además, la combinación y el número correctos de restos de aminoácidos cargados frente a hidrófobos pueden reducir la irritación en el lugar de inyección (si el fármaco peptídico se ha administrado por vía subcutánea).
- 50 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos L por uno o más restos de aminoácidos D. Se cree que esta realización aumenta la estabilidad proteolítica por impedimento estérico y por una propensión de los D-aminoácidos a estabilizar las conformaciones de giro β (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).
- 55 En una realización adicional de la divulgación, el resto de aminoácido en la posición 1 se sustituye por un aminoácido D, tal como D-alanina. Esta sustitución consigue la retención de la potencia sin la consiguiente degradación.

En una realización adicional de la divulgación, el resto de aminoácido en la posición 5 se sustituye por un aminoácido D, tal como D-alanina o D-arginina. Esta sustitución consigue la retención de la potencia sin la consiguiente degradación.

5 En una realización de la divulgación, el derivado modificado comprende la eliminación de cualquier resto de aminoácido y la sustitución por alaninas. Esta realización proporciona la ventaja de eliminar posibles sitio o sitios de ataque proteolítico.

10 Cabe señalar que cada una de las modificaciones mencionadas anteriormente sirve para mejorar deliberadamente la potencia o la estabilidad del péptido. Pueden lograrse mejoras de potencia adicionales basadas en modificaciones a través de los siguientes mecanismos:

15 - Incorporar restos hidrófobos que aprovechen el efecto hidrófobo y conduzcan a velocidades de desactivación más bajas, de tal manera que se logren afinidades más altas;

20 - Incorporar grupos cargados que aprovechen interacciones iónicas de largo alcance, lo que conduce a velocidades de activación más rápidas y a afinidades más altas (véase, por ejemplo, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), *Nature Struct. Biol.* 3, 427-31); y

25 - Incorporar restricciones adicionales en el péptido, por ejemplo, restringiendo las cadenas laterales de aminoácidos correctamente de tal manera que la pérdida de entropía sea mínima tras la unión a la diana, restringiendo los ángulos de torsión de la cadena principal de tal manera que la pérdida de entropía sea mínima tras la unión a la diana e introduciendo ciclaciones adicionales en la molécula por razones idénticas.

30 (para revisiones, véanse Gentilucci et al, *Curr. Pharmaceutical Design*, (2010), 16, 3185-203 y Nestor et al, *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418).

Variaciones isotópicas

35 La presente divulgación incluye todos los compuestos marcados con (radio)isótopos farmacéuticamente aceptables de la invención, es decir, compuestos de fórmula (II), en donde uno o más átomos se reemplazan por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza, y compuestos de fórmula (II), en donde se unen grupos quelantes metálicos (denominados "efectores") que son capaces de contener (radio)isótopos relevantes, y compuestos de fórmula (I), en donde determinados grupos funcionales se reemplazan covalentemente por (radio)isótopos relevantes o grupos funcionales marcados isotópicamente.

40 Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la invención comprenden isótopos de hidrógeno, tales como ^2H (D) y ^3H (T), carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , cloro, tales como ^{36}Cl , flúor, tal como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I , ^{125}I y ^{131}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , fósforo, tal como ^{32}P , azufre, tal como ^{35}S , cobre, tal como ^{64}Cu , galio, tales como ^{67}Ga o ^{68}Ga , litio, tal como ^{90}Y y lutecio, tal como ^{177}Lu , y bismuto, tal como ^{213}Bi .

45 Determinados compuestos marcados isotópicamente de fórmula (II), por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución tisular de fármacos y/o sustratos, y para evaluar clínicamente la presencia y/o ausencia de la diana MT1-MMP en tejidos enfermos tales como tumores y otros lugares. Los compuestos de fórmula (II) pueden tener además valiosas propiedades diagnósticas ya que pueden usarse para detectar o identificar la formación de un complejo entre un compuesto marcado y otras moléculas, péptidos, proteínas, enzimas o receptores. Los métodos de detección o identificación pueden usar compuestos que están marcados con agentes de marcado tales como radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas (por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, aequorina y luciferasa), etc. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H (T), y carbono-14, es decir ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección fáciles.

55 La sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ^2H (D), puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias.

60 La sustitución con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de topografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación de la diana.

65 La incorporación de isótopos en grupos efectores quelantes de metales, tales como ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga y ^{177}Lu pueden ser útil para visualizar antígenos específicos de tumores empleando formación de imágenes por PET o SPECT.

70 La incorporación de isótopos en grupos efectores quelantes de metales, tales como, pero sin limitación, ^{90}Y , ^{177}Lu y ^{213}Bi , puede presentar la opción de radioterapia dirigida, por la que los compuestos de fórmula (II) que portan quelantes

de metales transportan el radionúclido terapéutico hacia la proteína diana y el sitio de acción.

Los compuestos marcados isotópicamente de fórmula (II) pueden prepararse generalmente por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o por procesos análogos a los descritos en los Ejemplos adjuntas usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado previamente.

Actividad de unión

10 La especificidad, en el contexto del presente documento, se refiere a la capacidad de un ligando de unirse o interactuar de otro modo con su diana affinity, excluyendo entidades que son similares a la diana. Por ejemplo, la especificidad puede referirse a la capacidad de un ligando para inhibir la interacción de una enzima humana, pero no una enzima homóloga de una especie diferente. Usando el enfoque descrito en el presente documento, la especificidad puede modularse, es decir, aumentarse o disminuirse, para hacer que los ligandos sean más o menos capaces de interactuar con homólogos o parálogos de la diana prevista. Especificidad no pretende ser sinónimo de actividad, afinidad o avidez, y la potencia de la acción de un ligando sobre su diana (tal como, por ejemplo, la afinidad de unión o el nivel de inhibición) no están necesariamente relacionada con su especificidad.

15

20 La actividad de unión, como se usa en el presente documento, se refiere a mediciones de unión cuantitativas tomadas de ensayos de unión, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la actividad de unión se refiere a la cantidad de ligando peptídico que se une a una concentración diana dada.

25 La multiespecificidad es la capacidad de unirse a dos o más dianas. Normalmente, los péptidos de unión son capaces de unirse a una única diana, tal como un epítopo en el caso de un anticuerpo, debido a sus propiedades conformacionales. Sin embargo, pueden desarrollarse péptidos capaces de unirse a dos o más dianas; anticuerpos doblemente específicos, por ejemplo, como se sabe en la técnica a la que se ha hecho referencia anteriormente. En la presente divulgación, los ligandos peptídicos pueden ser capaces de unirse a dos o más dianas y son, por lo tanto, multiespecíficos. De manera adecuada, se unen a dos dianas y son doblemente específicos. La unión puede ser independiente, lo que significaría que los sitios de unión para las dianas en el péptido no están estructuralmente impedidos por la unión de una u otra de las dianas. En este caso, ambas dianas pueden unirse independientemente. De forma más general, se espera que la unión de una diana impida, al menos parcialmente, la unión de la otra.

30

35 Existe una diferencia fundamental entre un ligando doblemente específico y un ligando con especificidad que abarca dos dianas relacionadas. En el primer caso, el ligando es específico para ambas dianas individualmente e interactúa con cada una de ellas de manera específica. Por ejemplo, un primer bucle del ligando puede unirse a una primera diana y un segundo bucle a una segunda diana. En el segundo caso, el ligando es inespecífico porque no diferencia entre las dos dianas, por ejemplo, mediante la interacción con un epítopo de las dianas que es común a ambas.

40 En el contexto de la presente divulgación, es posible que un ligando que tenga actividad con respecto a, por ejemplo, una diana y un ortólogo, pueda ser un ligando biespecífico. Sin embargo, en una realización de la divulgación, el ligando no es biespecífico, pero tiene una especificidad menos precisa, de manera que se une tanto a la diana como a uno o más ortólogos. En general, un ligando que no se ha seleccionado contra una diana y su ortólogo tiene menos probabilidad de ser biespecífico debido a la ausencia de presión selectiva hacia la biespecificidad. La longitud del bucle en el péptido bicíclico puede ser decisiva para proporcionar una superficie de unión a medida que permite obtener una buena reactividad cruzada entre la diana y el ortólogo, manteniendo una alta selectividad hacia homólogos menos relacionados.

45

50 Si los ligandos son realmente biespecíficos, en una realización de la divulgación, al menos una de las especificidades diana de los ligandos será común entre los ligandos seleccionados, y el nivel de esa especificidad puede modularse mediante los métodos desvelados en el presente documento. No es necesario compartir segundas o ulteriores especificidades, ni que sean objeto de los procedimientos que se exponen en el presente documento.

55 Una diana es una molécula o parte de la misma a la que se unen o con la que interactúan de otro modo los ligandos peptídicos. Aunque la unión se considera un requisito previo para la actividad de la mayoría de los tipos, y puede ser una actividad en sí misma, se prevén otras actividades. Por lo tanto, la presente invención no requiere la medición de la unión directa o indirectamente.

60 El armazón molecular es cualquier molécula que sea capaz de conectar el péptido en múltiples puntos para transmitir una o más características estructurales al péptido. Preferentemente, el armazón molecular comprende al menos tres puntos de unión para el péptido, denominados grupos reactivos del armazón. Estos grupos son capaces de reaccionar con los restos cisteína (C_i, C_{ii} y C_{iii}) en el péptido para formar un enlace covalente. No se limitan a formar un enlace disulfuro, que es objeto de escisión reductora y desintegración simultánea de la molécula, sino que forman uniones tioéter covalentes estables. A continuación se describen las estructuras preferidas para los armazones moleculares.

65 *Armazón molecular*

Se describen armazones moleculares en, por ejemplo, el documento WO 2009/098450, y las referencias citadas en el mismo, en particular los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161.

5 Como se ha indicado en los documentos anteriores, el armazón molecular puede ser una molécula pequeña, tal como una molécula orgánica pequeña.

En una realización de la divulgación, el armazón molecular puede ser, o puede basarse en, monómeros naturales tales como nucleósidos, azúcares o esteroídes. Por ejemplo, el armazón molecular puede comprender un polímero corto de dichas entidades, tales como un dímero o un trímero.

10 En una realización de la divulgación, el armazón molecular es un compuesto de toxicidad conocida, por ejemplo, de baja toxicidad. Los ejemplos de compuestos adecuados incluyen colesteroles, nucleótidos, esteroídes o fármacos existentes tales como tamazepam.

15 En una realización de la divulgación, el armazón molecular puede ser una macromolécula. En una realización de la divulgación el armazón molecular es una macromolécula compuesta por aminoácidos, nucleótidos o carbohidratos.

En una realización de la divulgación el armazón molecular comprende grupos reactivos que son capaces de reaccionar con uno o más grupos funcionales del polipéptido para formar enlaces covalentes.

20 El armazón molecular puede comprender grupos químicos que forman el enlace con un péptido, tales como aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, azidas, anhídridos, succinimidas, maleimidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

25 En una realización de la divulgación, el armazón molecular puede comprender o consistir en tris(bromometil)benceno, especialmente 1,3,5-tris(bromometil)benceno ("TBMB") o un derivado del mismo. De acuerdo con el primer aspecto de la invención, el armazón molecular es 1,3,5-tris(bromometil)benceno (TBMB).

30 En una realización de la divulgación, el armazón molecular es 2,4,6-tris(bromometil)mesitileno. Esta molécula es similar al 1,3,5-tris(bromometil)benceno, pero contiene tres grupos metilo adicionales unidos al anillo de benceno. Esto tiene la ventaja de que los grupos metilo adicionales pueden formar contactos adicionales con el polipéptido y, por lo tanto, añadir una restricción estructural adicional.

35 El armazón molecular de la invención contiene grupos químicos que permiten a los grupos funcionales del polipéptido de la biblioteca codificada de la invención formar enlaces covalentes con el armazón molecular. Dichos grupos químicos se seleccionan de una amplia gama de grupos funcionales, incluyendo aminas, tioles, alcoholes, cetonas, aldehídos, nitrilos, ácidos carboxílicos, ésteres, alquenos, alquinos, anhídridos, succinimidas, maleimidas, azidas, haluros de alquilo y haluros de acilo.

40 Los grupos reactivos del armazón que podrían usarse en el armazón molecular para reaccionar con los grupos tiol de las cisteínas son haluros de alquilo (o también denominados halogenoalcanos o haloalcanos).

45 Los ejemplos incluyen bromometilbenceno (el grupo reactivo del armazón ejemplificado por TBMB) o yodoacetamida. Otros grupos reactivos de armazón que se usan para acoplar selectivamente compuestos a las cisteínas de las proteínas son las maleimidas. Los ejemplos de maleimidas que pueden usarse como armazones moleculares en las realizaciones de la divulgación incluyen: tris-(2-maleimidoetil)amina, tris-(2-maleimidoetil)benceno, tris-(maleimido)benceno. La selenocisteína también es un aminoácido natural que tiene una reactividad similar a la de la cisteína y puede usarse para las mismas reacciones. Por lo tanto, siempre que se mencione la cisteína, normalmente es aceptable sustituirla por selenocisteína, a menos que el contexto sugiera otra cosa.

50 **Síntesis**

55 Los péptidos de fórmula (II) pueden fabricarse sintéticamente mediante técnicas convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida seguidas de reacción con un armazón molecular *in vitro*. Cuando esto se realiza, puede usarse la química convencional. Esto permite la preparación rápida a gran escala de material soluble para experimentos posteriores adicionales o validación. Dichos métodos podrían realizarse usando química convencional tal como la descrita en Timmerman *et al.* (citado anteriormente).

60 Por lo tanto, la invención también se refiere a la fabricación de polipéptidos o conjugados seleccionados como se expone en el presente documento, en donde la fabricación comprende etapas adicionales opcionales como se explica a continuación. En una realización de la divulgación, estas etapas se realizan en el polipéptido/conjugado del producto final elaborado mediante síntesis química.

65 Opcionalmente, los restos de aminoácidos en el polipéptido de interés pueden sustituirse cuando se elabora un conjugado o complejo.

Los péptidos también pueden extenderse, para incorporar, por ejemplo, otro bucle y, por lo tanto, introducir múltiples especificidades.

5 Para extender el péptido, simplemente puede extenderse químicamente en su extremo N o el extremo C o dentro de los bucles o en cualquier otro lugar usando lisinas protegidas ortogonalmente (y análogos) usando química convencional en fase sólida o fase de solución. Pueden usarse técnicas de (bio)conjugación convencionales para introducir un extremo N o C activado o activable. Como alternativa pueden realizarse adiciones mediante condensación de fragmentos o ligadura química natural, por ejemplo, como se describe en (Dawson *et al.* 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779) o mediante enzimas, por ejemplo, usando subtiligasa como se describe en (Chang *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de diciembre de 1994; 91(26):12544-8 o en Hikari *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volumen 18, número 22, 15 de noviembre de 2008, páginas 6000-6003).

10 Como alternativa, los péptidos pueden extenderse o modificarse mediante una conjugación adicional a través de enlaces disulfuro. Esto tiene la ventaja adicional de permitir que el primer y el segundo péptido se disocien entre sí una vez dentro del entorno reductor de la célula. En este caso, el armazón molecular (por ejemplo, TBMB) podría 15 añadirse durante la síntesis química del primer péptido para que reaccione con los tres grupos de cisteína; después podría añadirse una cisteína o tiol adicional al extremo N o C del primer péptido, de tal manera que esta cisteína o tiol solo reaccionara con una cisteína o tiol libre del segundo péptido, formando un conjugado péptido bicíclico ligado a disulfuro-péptido.

20 20 Las técnicas similares se aplican igualmente a la síntesis/acoplamiento de dos macrociclos bicíclicos y biespecíficos, creando potencialmente una molécula tetraespecífica.

25 Además, la adición de otros grupos funcionales o grupos efectores puede lograrse de la misma manera, usando la química apropiada, acoplándose en los extremos N o C o a través de cadenas laterales. En una realización de la divulgación, el acoplamiento se realiza de tal manera que no bloquee la actividad de ninguna de las entidades.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para preparar un conjugado de fármaco como se define en el presente documento que comprende la vía de síntesis descrita en el Esquema I.

30 *Composiciones farmacéuticas*

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco como se define en el presente documento junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 Generalmente, los conjugados de fármacos se usarán en forma purificada junto con excipientes o portadores farmacológicamente apropiados. Normalmente, estos excipientes o portadores incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y/o tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden elegirse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

45 45 Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer. Los conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, también puede estar presentes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a Edición).

50 50 Los conjugados de fármacos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y diversos fármacos inmunoterápicos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros agentes junto con los conjugados de fármacos de la presente invención, o incluso combinaciones de conjugados de fármacos de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como los que comprenden polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos diana, ya sea que se agrupen o no antes de la administración.

60 60 La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de aquellas conocidas comúnmente por los expertos en la materia. Para la terapia, incluyendo, sin limitación, inmunoterapia, los conjugados de fármacos de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas convencionales. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía transdérmica, a través de la vía pulmonar o también, apropiadamente, por infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y la condición del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que el médico debe tener en cuenta.

65 65 Los conjugados de fármacos de esta invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un

portador adecuado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a diversos grados de pérdida de actividad y que los niveles pueden tener que ajustarse hacia arriba para compensar.

- 5 Las composiciones que contienen los presentes conjugados de fármacos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En determinadas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr al menos una inhibición parcial, supresión, modulación, destrucción, o algún otro parámetro medible, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz".
- 10 Las cantidades necesarias para alcanzar esta dosis dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunológico del propio paciente, pero generalmente varían de 0,005 a 5,0 mg de conjugados de fármacos seleccionado por kilogramo de peso corporal, usándose más comúnmente dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes conjugados de fármacos o también pueden administrarse cócteles de los mismos en dosis similares o ligeramente inferiores.
- 15 Una composición que contiene un conjugado de fármaco de acuerdo con la presente invención puede usarse en entornos profilácticos y terapéuticos para facilitar la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los conjugados de fármacos descritos en el presente documento pueden usarse de manera extracorpórea o selectiva *in vitro* para destruir, agotar o eliminar de otro modo de manera eficaz una población de células diana de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero puede combinarse de manera extracorpórea con los conjugados de fármacos seleccionados, por lo que las células no deseadas se destruyen o se eliminan de otro modo de la sangre para devolverlas al mamífero de acuerdo con técnicas convencionales.
- 25 **Usos terapéuticos**

Los péptidos bicíclicos de fórmula (II) tienen utilidad específica como aglutinantes de alta afinidad de la metaloproteasa de membrana de tipo 1 (MT1-MMP, también conocida como MMP14). La MT1-MMP es una metaloproteasa transmembrana que desempeña una función fundamental en la remodelación de la matriz extracelular, directamente al degradar varios de sus componentes e indirectamente al activar la pro-MMP2. MT1-MMP es crucial para la angiogénesis tumoral (Sounni *et al.* (2002) *FASEB J.* 16(6), 555-564) y se sobreexpresa en diversos tumores sólidos, por lo tanto, los conjugados de fármacos que comprenden péptidos bicíclicos de unión a MT1-MMP de la presente invención tienen una utilidad particular en el tratamiento dirigido del cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos. En una realización de la divulgación, el péptido bicíclico de fórmula (II) es específico para la MT1-MMP humana de la divulgación. En una realización adicional de la divulgación, el péptido bicíclico de fórmula (II) es específico para la MT1-MMP de ratón. En una realización adicional más de la divulgación, el péptido bicíclico de fórmula (II) es específico para la MT1-MMP humana y de ratón. En una realización adicional más de la divulgación, el péptido bicíclico de fórmula (II) es específico para la MT1-MMP humana, de ratón y de perro.

40 Los ligandos polipeptídicos de fórmula (II) pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayo y reactivo *in vitro* y similares. Los ligandos que tienen niveles seleccionados de especificidad son útiles en aplicaciones que implican pruebas en animales no humanos, donde la reactividad cruzada es deseable, o en aplicaciones de diagnóstico, donde la reactividad cruzada con homólogos o parálogos ha de ser controlada cuidadosamente. En algunas aplicaciones, tales como aplicaciones de vacuna, la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a intervalos predeterminados de antígenos puede ser aprovechada para adaptar una vacuna a enfermedades y patógenos específicos.

45 Los ligandos peptídicos sustancialmente puros de al menos el 90 al 95 % de homogeneidad son los preferidos para la administración a un mamífero, y del 98 al 99 % o más de homogeneidad es lo más preferido para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos seleccionados pueden usarse de manera diagnóstica o terapéutica (incluso de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

55 Los conjugados de los ligandos peptídicos de la presente invención normalmente encontrarán uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos.

60 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporcionan conjugados de fármaco del ligando peptídico como se define en el presente documento para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos.

65 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite un conjugado de fármaco del ligando peptídico como se define en el presente documento.

- Los ejemplos de cánceres (y sus equivalentes benignos) que pueden tratarse (o inhibirse) incluyen, pero no se limitan a tumores de origen epitelial (adenomas y carcinomas de diversos tipos incluyendo adenocarcinomas, carcinomas escamosos, carcinomas de células transicionales y otros carcinomas) tales como carcinomas de vejiga y tracto urinario, mama, tracto gastrointestinal (incluyendo el esófago, estómago (gástrico), intestino delgado, colon, recto y ano), hígado (carcinoma hepatocelular), vesícula biliar y sistema biliar, páncreas exocrino, riñón, pulmón (por ejemplo, adenocarcinomas, carcinomas pulmonares microcíticos, carcinomas pulmonares no microcíticos, carcinomas bronquioalveolares y mesoteliomas), cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres de lengua, cavidad bucal, laringe, faringe, nasofaringe, amígdala, glándulas salivales, cavidad nasal y senos paranasales), ovario, trompas de Falopio, peritoneo, vagina, vulva, pene, cuello uterino, miometrio, endometrio, tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular de tiroides), suprarrenal, próstata, piel y anexos (por ejemplo, melanoma, carcinoma basocelular, carcinoma escamocelular, queratoacantoma, nevo displásico); neoplasias hematológicas (es decir, linfomas) y trastornos hematológicos preneoplásicos y trastornos de bajo potencial neoplásico, incluyendo neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas del linaje linfóide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda [ALL], leucemia linfocítica crónica [CLL], linfomas de linfocitos B, tales como linfoma difuso de linfocitos B grandes [DLBCL], linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, linfomas y leucemias de linfocitos T, linfomas de linfocitos citolíticos naturales [NK], linfomas de Hodgkin, leucemia de células pilosas, gamopatía monoclonal de significado incierto, plasmacitoma, mieloma múltiple y trastornos linfoproliferativos postrasplante), y neoplasias hematológicas y afecciones relacionadas de linaje mieloide (por ejemplo, leucemia mieloide aguda [AML], leucemia mieloide crónica [CML], leucemia mielomonocítica crónica [CMML], síndrome hipereosinofílico, trastornos mieloproliferativos tales como policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria, síndrome mieloproliferativo, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica); tumores de origen mesenquimal, por ejemplo, sarcomas de tejido blando, hueso o cartílago, tales como osteosarcomas, fibrosarcomas, condrosarcomas, rhabdomiosarcomas, leiomirosarcomas, liposarcomas, angiosarcomas, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, sarcomas sinoviales, sarcomas epiteloides, tumores del estroma gastrointestinal, histiocitomas benignos y malignos y dermatofibrosarcoma protuberans; tumores del sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, astrocitomas, gliomas y glioblastomas, meningiomas, ependimomas, tumores pineales y schwannomas); tumores endocrinos (por ejemplo, tumores pituitarios, tumores suprarrenales, tumores de células de los islotes, tumores paratiroideos, tumores carcinoides y carcinoma medular de la tiroides); tumores oculares y anexiales (por ejemplo, retinoblastoma); tumores de células germinales y trofoblásticos (por ejemplo, teratomas, seminomas, disgerminomas, molas hidatiformes y coriocarcinomas); y tumores pediátricos y embrionarios (por ejemplo, meduloblastoma, neuroblastoma, tumor de Wilms y tumores neuroectodérmicos primitivos); o síndromes, congénitos o de otro tipo, que dejan al paciente susceptible a la malignidad (por ejemplo, xeroderma pigmentoso).
- 35 Las referencias en el presente documento al término "prevención" implican la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un acontecimiento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad.
- 40 Están disponibles sistemas de modelos animales que pueden usarse para evaluar la eficacia de los conjugados de fármacos en la protección contra la enfermedad o en el tratamiento de la misma. La presente invención facilita el uso de sistemas de modelos animales, que permite el desarrollo de ligandos polipeptídicos que pueden reaccionar de forma cruzada con dianas humanas y animales, para permitir el uso de modelos animales.
- 45 La invención se describe con más detalle a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Expresión de proteínas

50 Las repeticiones similares a hemopexina de MT1-MMP (también conocidas como dominio hemopexina de MT1-MMP), restos Cys319-Gly511 del gen humano, se expresaron transitoriamente en células HEK293 como proteína soluble secretada marcada con His6 N-terminalmente, usando el vector de expresión pEXPR-IBA42 (IBA). Después de la expresión, la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad de Níquel-NTA seguida de filtración en gel, y la pureza se comprobó mediante SDS-PAGE. La variabilidad entre lotes también se controló mediante experimentos de desplazamiento térmico de fluorescencia en presencia/ausencia de un bicielo de unión al dominio hemopexina.

Síntesis de péptidos

55 La síntesis de péptidos se basó en la química Fmoc, usando un sintetizador de péptidos Symphony fabricado por Peptide Instruments y un sintetizador Syro II de MultiSynTech. Se emplearon aminoácidos Fmoc convencionales (Sigma, Merck), con los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Gln(Trt); His(Trt); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc); y Tyr(tBu) (Sigma). El reactivo de acoplamiento fue HCTU (Pepceuticals), se empleó diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma) como base, y la desprotección se consiguió

con piperidina al 20 % en DMF (AGTC). Las síntesis se realizaron usando 0,37 mmol/g de resina Fmoc-Rink amida AM (AGTC), se utilizaron Fmoc-aminoácidos en un exceso de cuatro veces y la base estaba en un exceso de cuatro veces con respecto a los aminoácidos. Los aminoácidos se disolvieron a 0,2 M en DMSO, HCTU a 0,4 M en DMF y DIPEA a 1,6 M en N-metilpirrolidona (Alfa Aesar). Las condiciones eran de manera que las reacciones de acoplamiento contenían DMSO entre el 20 y el 50 % en DMF, lo que redujo la agregación y las supresiones durante la síntesis en fase sólida y potenció los rendimientos. Los tiempos de acoplamiento fueron generalmente de 30 minutos y los de desprotección de 2 x 5 minutos. Se acopló Fmoc-N-metilglicina (Fmoc-Sar-OH, Merck) durante 1 h y los tiempos de desprotección y acoplamiento para el siguiente resto fueron de 20 min y 1 h, respectivamente. Después de la síntesis, la resina se lavó con diclorometano y se secó. La escisión de los grupos protectores de cadena lateral y del soporte se efectuó usando 10 ml de TFA/H₂O/iPr₃SiH/ditiotreitol 95:2,5:2,5 v/v/w durante 3 horas. Tras la escisión, la resina gastada se retiró por filtración, y el filtrado se añadió a 35 ml de dietileter que se había enfriado a -80 °C. El sedimento de péptidos se centrifugó, el sobrenadante etéreo se desechó y el precipitado de péptidos se lavó con éter frío dos veces más. Después, los péptidos se resolubilizaron en 5-10 ml de acetonitrilo-agua y se liofilizaron. Se extrajo una muestra pequeña para analizar la pureza del producto en bruto mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF, Voyager DE de Applied Biosystems). Después de la liofilización, se tomaron polvos de péptidos en 10 ml de clorhidrato de guanidinio 6 M en H₂O, suplementado con 0,5 ml de ditiotreitol 1 M, y se cargaron en una columna de HPLC preparativa C8 Luna (Phenomenex). Los disolventes (H₂O, acetonitrilo) se acidificaron con ácido heptafluorobutírico al 0,1 %. El gradiente varió entre el 30-70 % de acetonitrilo en 15 minutos, a un caudal de 15-20 ml /min, usando un sistema de HPLC preparativa Gilson. Las fracciones que contenían material peptídico lineal puro (identificado por MALDI) se combinaron y se modificaron con 1,3,5-tris(bromometil)benceno (TBMB, Sigma). Para esto, el péptido lineal se diluyó con H₂O hasta ~35 ml, se añadieron ~500 µl de TBMB 100 mM en acetonitrilo y la reacción se inició con 5 ml de NH₄HCO₃ 1 M en H₂O. Se dejó que la reacción continuara durante ~30-60 min a TA y se liofilizó una vez que la reacción se completó (a juzgar por MALDI). Después de la liofilización, el péptido modificado se purificó como se indicó anteriormente, mientras reemplaza la columna Luna C8 con una columna Gemini C18 (Phenomenex) y cambia el ácido a ácido trifluoroacético al 0,1 %. Las fracciones puras que contenían el material modificado con TMB correcto se agruparon, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C para su almacenamiento.

Todos los aminoácidos, a menos que se indique de otro modo, se usaron en las configuraciones L.

30 Los aminoácidos no naturales se incorporaron en la secuencia peptídica usando los métodos generales descritos anteriormente.

La lista de precursores de aminoácidos no naturales empleados en el presente documento se resume en la tabla a continuación:

35

Proveedor	Nombre corto	Nombre químico completo
AGTC	D-Asp	Fmoc-D-Asp(tBu)-OH
Iris Biotech	HPhe	Fmoc-L-Homofenilalanina
Alfa Aesar	5FPhe	Fmoc-pentafluoro-L-fenilalanina
PolyPeptide Group	4BrPhe	Fmoc-4-bromo-L-fenilalanina
Iris Biotech	bAla	Fmoc-beta-Ala-OH
Iris Biotech	3Pal	Fmoc-L-3Pal-OH
Iris Biotech	4Pal	Fmoc-L-4Pal-OH
Iris Biotech	D-Pro	Fmoc-D-Pro-OH
Merck Novabiochem	Aib	Fmoc-Aib-OH
Merck Novabiochem	D-Ala	Fmoc-D-Ala-OH
Merck Novabiochem	D-Arg	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH
Merck Novabiochem	D-Gln	Fmoc-D-Gln(Trt)-OH
Merck Novabiochem	D-His	Fmoc-D-His(Trt)-OH
Merck Novabiochem	Hyp	Fmoc-Hyp(tBu)-OH
Merck Novabiochem	D-Leu	Fmoc-D-Leu-OH
Merck Novabiochem	HArg	Fmoc-L-HArg(Boc)2-OH

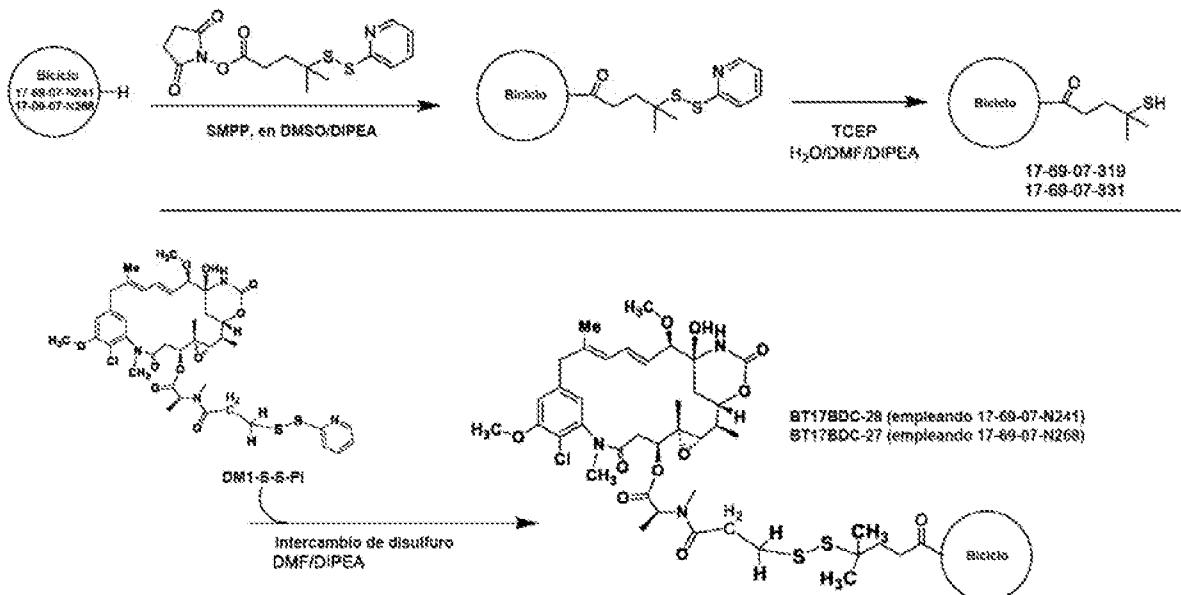
(continuación)

Proveedor	Nombre corto	Nombre químico completo
Peptech Corporation	4,4-BPAI	Fmoc-L-4, 4'-Bifenilalanina
Peptech Corporation	3,3-DPA	Fmoc-L-3,3-Difenilalanina
Peptech Corporation	Dpg	Fmoc-Dipropilglicina
Peptech Corporation	1Nal	Fmoc-L-1-Naftilalanina
Peptech Corporation	2NAl	Fmoc-L-2-Naftilalanina
Peptech Corporation	Pip	Ácido Fmoc-L-Pipecólico
Polypeptide Group	Aze	Ácido Fmoc-L-azetidin-2-carboxílico
Polypeptide Group	Cha	Fmoc-beta-ciclohexil-L-alanina
Polypeptide Group	4FluoPro	Ácido (2S,4R)-Fmoc-4-fluoro-pirrolidin-2-carboxílico
AGTC	D-Asp	Fmoc-D-Asp(tBu)-OH
Merck	tBuGly	Fmoc-a-terc-butilglicina
Iris Biotech	Chg	Fmoc-L-ciclohexilglicina
Fluorochem	Phg	Fmoc-Fenilglicina-OH
Iris Biotech	3Pal	Fmoc-L-3Pal-OH
Iris Biotech	4Pal	Fmoc-L-4Pal-OH
Merck Novabiochem	D-Leu	Fmoc-D-Leu-OH
Merck Novabiochem	HArg	Fmoc-L-HArg(Boc)2-OH
Polypeptide Group	3,4 DCPhe	Fmoc-3,4-dicloro-L-fenilalanina
Polypeptide Group	Cha	Fmoc-beta-ciclohexil-L-alanina

Los péptidos utilizados para los estudios farmacocinéticos se liofilizaron en TFA al 0,1 % en agua para obtener las sales de TFA o los ácidos libres de los compuestos.

- 5 *Síntesis de BT17BDC-27 y BT17BDC-28 usando 17-69-07-N268 y 17-69-07-N241 como Péptidos Bicíclicos precursores*
- 10 Los péptidos precursores 17-69-07-N241 y 17-69-07-N268 tienen las secuencias (bAla)-Sar10-AC(D-Ala)NE(1 Nal)(D-Ala)CEDFYD(tBuGly)C y AC(D-Ala)NE(1 Nal)(D-Ala)CEDFYD(tBuGly)C, respectivamente. Ambos se ciclan con TBMB como se ha indicado anteriormente, contienen un grupo amino único en el extremo N que se usa como sitio de conjugación, y están amidados C-terminalmente.
- 15 El esquema de síntesis se muestra a continuación:

Esquema I



5 Los pesos moleculares de los precursores y de los péptidos de tiol intermedios, se muestran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Propiedades moleculares de BT17BDC-27 y BT17BDC-28

BD C	Peso molecular	Precursor de biciclo de tiol reactivo	Peso molecular	Precursor de biciclo	Peso molecular
BT17BDC-27	2742,567	17-69-07-N331	2007,30	17-69-07-N268	1877,08
BT17BDC-28	3524,427	17-69-07-N319	2789,16	17-69-07-N241	2658,95

Síntesis de 17-69-07-N331

10 Se añadieron 2,1 ml de solución 20,1 mM de Biciclo (17-69-07-N268) en DMSO (0,042 mmol, 80 mg) a 0,6 ml de solución 94,0 mM de éster SMPP NHS (N.º de CAS: 890409-85-5) en DMSO anhídrico (0,0546 mmol), seguido de la adición de 154 μ l de DIPEA puro (0,884 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, se tomaron muestras de la reacción y se analizaron mediante LCMS, y la reacción se consideró completa.

15 Se añadieron directamente a la mezcla de reacción 423 μ l de solución 200 mM de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina neutralizada con bicarbonato de amonio a pH ~8) (0,0846 mmol) a temperatura ambiente. Después de 30 min, se tomaron muestras de la reacción de reducción y se determinó que se había completado mediante LCMS.

20 Para la purificación, la solución (~3,0 ml) se diluyó y se purificó mediante el purificador ÄKTA 100 equipado con una columna C18 (columna de HPLC preparativa YMC-Actus Triart C18, 12 nm, 10 μ m, 250 x 50,0 mm) (YMC) (35 x 200 mm) usando agua (TFA al 0,1 %) y acetonitrilo (TFA al 0,1 %) como fases móviles. El gradiente fue del 35 - 65 % de acetonitrilo durante 20 minutos a un caudal de 100 ml/min. Las fracciones que contenían el producto (determinado mediante UV y seleccionado por pureza como se determina mediante LCMS) se combinaron y se liofilizaron, proporcionando 73 mg de 17-69-07-N331 puro (rendimiento del 83 %).

Síntesis de 17-69-07-N319

30 Las condiciones y la purificación fueron las mismas que con 17-69-07-N331, partiendo de 0,219 mmol (583 mg) de 17-69-07-N241, obteniéndose 417 mg de 17-69-07-N319 (rendimiento del 68 %).

Síntesis de DM1-S-S-Pi

35 Se añadió ditiopiridina (341 mg, 1,55 mmol) a una solución de DM1-SH (229 mg, 0,31 mmol) en DMF anhídrico (12,43 ml) con DIPEA (531 μ l, 3,1 mmol). La reacción se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 1,5 horas; el progreso de la reacción se evaluó mediante ESI MS. La ESI MS confirmó que el producto había formado MZ 847,3 Da y que el material de partida se había consumido. El producto se purificó usando una columna preparativa

5 Phenomenex Luna C18 con fases móviles que contenían TFA al 0,1 %, en un gradiente del 20-80 % de acetonitrilo en 9 volúmenes de columna. La mezcla de reacción se diluyó en acetonitrilo y después se diluyó con agua (concentración final de acetonitrilo del 20 %, final de DMF del 4 %). Se agruparon las fracciones que tenían una pureza >95 % mediante HPLC analítica de fase inversa. El producto (DM1-S-S-Pi) se cuantificó mediante absorbancia UV a 280 nm (e = 5935 Mcm-1) en MeCN:agua 1:1, produciéndose 185 mg aislados (rendimiento del 70 %).

Síntesis de BT178DC-27

10 Se disolvió el péptido 17-69-07-N331 (239 mg, 119 mmol) a una concentración de 30 mM en DMF anhidra con DIPEA (123 ml, 59 mmol). También se disolvió DM1-S-S-Piridilo (60 mg, 71 mmol) en DMF anhidra a una concentración de 25 mM. La solución de DM1-S-S-Piridilo se añadió a la solución de péptido y se mezcló. El progreso de la reacción se analizó después de 1 hora mediante HPLC y MS. El tiempo de reacción fue de 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó en una solución de acetonitrilo al 20 %/agua, a una concentración final de DMF del 2 %. La mezcla de reacción en bruto se purificó usando una columna preparativa Phenomenex Luna C18 con fases móviles que contenían TFA al 0,1 %, en gradiente de acetonitrilo al 20-90 % en 9 volúmenes de columna. Se obtuvieron 190 mg de péptido purificado >95 % a partir de dos reacciones, con un aporte total de péptidos de 461 mg (rendimiento del 36,2 %). El péptido se cuantificó usando la absorbancia medida a 280 nm (e = 13225 Mcm-1).

Síntesis de BT17BDC-28

20 Se disolvió el péptido 17-69-07-N319 (206 mg, 74 mmol) a una concentración de 30 mM en DMF anhidra con DIPEA (100 ml, 59 mmol). También se disolvió DM1-S-S-Piridilo (50 mg, 59 mmol) en DMF anhidra a una concentración de 25 mM. La solución de DM1-S-S-Piridilo se añadió a la solución de péptido y se mezcló. El progreso de la reacción se analizó después de 1 hora mediante HPLC y MS. El tiempo de reacción fue de 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó en acetonitrilo y después se diluyó en agua, concentración final de DMF del 4 %, acetonitrilo del 20 %. La mezcla de reacción se filtró antes de la purificación mediante RP-HPLC. La mezcla de reacción en bruto se purificó como se ha descrito anteriormente y se obtuvieron 230 mg de péptido purificado >95 % a partir de dos reacciones, con un aporte total de péptidos de 395 mg (rendimiento del 55,3 %). El conjugado se cuantificó usando la absorbancia medida a 280 nm (e = 13225 Mcm-1) en HEPES 50 mM pH 7,5.

Determinación de la constante de velocidad de disociación de los aglutinantes bicíclicos a MT1-MMP

Ensayos de polarización de fluorescencia de unión directa (anisotropía)

35 Se realizan ensayos de polarización de fluorescencia de unión directa o anisotropía valorando una concentración constante de indicador fluorescente (en este caso, el péptido bicíclico fluoresceinado que se ha de estudiar) con su compañero de unión (en este caso, el dominio hemopexina de MT1-MMP). A medida que aumenta la concentración del compañero de unión durante la valoración, la señal de polarización cambia en proporción a la fracción de material unido y no unido. Esto permite determinar cuantitativamente las velocidades de disociación (Kd). Los datos del ensayo 40 pueden ajustarse usando ecuaciones de unión de ligando convencionales.

45 Normalmente, lo ideal es que las concentraciones del indicador estén muy por debajo de la Kd del par indicador:solución volumétrica, y las concentraciones elegidas por lo general son de ~1 nM o menos. La concentración de la solución volumétrica (compañero de unión) varía entre 0,1 nM y normalmente 5 μ M. El intervalo se elige de manera que pueda observarse el cambio máximo en la polarización fluorescente. Los tampones empleados son solución salina tamponada con fosfato en presencia de Tween al 0,01 %. Los experimentos se realizaron en placas de color negro de 384 pocillos de baja unión/bajo volumen (Corning 3820) y la señal de polarización fluorescente se midió usando un lector de placas BMG Pherastar FS.

50 Los indicadores fluorescentes a los que se hace referencia en el texto son péptidos bicíclicos que se han fluoresceinado usando 5,6-carboxifluoresceína. La fluoresceinación puede realizarse en el grupo amino N-terminal del péptido, que se separa de la secuencia central del biciclo por un espaciador de sarcosina (por lo general Sar5). Esto puede hacerse durante la síntesis en fase sólida por Fmoc o post-sintéticamente (después de la ciclación con TBMB y la purificación) si el grupo amino N-terminal es exclusivo del péptido. La fluoresceinación también puede realizarse en el extremo C, por lo general en una Lisina introducida como el primer resto C-terminal, que después se separa de la secuencia central del biciclo mediante un espaciador de sarcosina (por lo general Sar6). Por lo tanto, los indicadores N-terminales pueden tener un formato molecular descrito como Fluo-Gly-Sar5-A(SecuenciaCentralDeBiciclo) y (SecuenciaCentralDeBiciclo)-A-Sar6-K(Fluo) para una construcción fluoresceinada C-terminalmente. Los indicadores fluorescentes utilizados en los Ejemplos son A-(17-69)-A-Sar6-K(Fluo), A-(17-69-07)-A-Sar6-K(Fluo) y A-(17-69-12)-A-Sar6-K(Fluo). Debido a la naturaleza ácida de los péptidos fluorescentes 17-69, normalmente se prepararon como soluciones madre concentradas de DMSO, a partir de las cuales se prepararon diluciones en tampón de Tris 100 mM pH 8.

Ensayos de competencia usando polarización de fluorescencia (anisotropía)

65 Debido a sus altas afinidades con el dominio Hemopexina de MT1-MMP (PEX), los derivados fluoresceinados de 17-

69-07 y 17-69-12 (indicados como 17-69-07-N040 y 17-69-12-N005, respectivamente) pueden usarse para experimentos de competencia (usando FP para la detección). En este caso, un complejo preformado de PEX con el indicador fluorescente de unión a PEX se valora con péptido bicíclico libre no fluoresceinado. Puesto que se espera que todos los péptidos a base de 17-69 se unan en el mismo sitio, la solución volumétrica desplazará el indicador fluorescente del PEX.

5 La disociación del complejo puede medirse cuantitativamente y puede determinarse la Kd del competidor (solución volumétrica) para la proteína diana. La ventaja del método de competencia es que las afinidades de los péptidos bicíclicos no fluoresceinados pueden determinarse con precisión y rapidez.

10 Las concentraciones del indicador por lo general están en la Kd o por debajo (en este caso, 1 nM) y la proteína de unión (en este caso, hemopexina de MT1-MMP) está en un exceso de 15 veces, de manera que se une >90 % del indicador. Posteriormente, se valora el péptido bicíclico competidor no fluorescente (por lo general sólo la secuencia central del biciclo), de manera que desplace el indicador fluorescente de la proteína diana. El desplazamiento del indicador se mide y se asocia a una caída de la polarización de fluorescencia. La caída en la polarización de fluorescencia es proporcional a la fracción de proteína diana unida con la solución volumétrica no fluorescente y, por 15 lo tanto, es una medida de la afinidad de la solución volumétrica con la proteína diana.

20 Los datos en bruto se ajustan a la solución analítica de la ecuación cúbica que describe los equilibrios entre el indicador fluorescente, la solución volumétrica y la proteína de unión. El ajuste requiere el valor de la afinidad del indicador fluorescente a la proteína diana, que puede determinarse por separado mediante experimentos de FP de unión directa (véase la sección anterior). El ajuste de la curva se realizó usando SigmaPlot 12.0 y se usó una versión adaptada de la ecuación descrita por Zhi-Xin Wang (*FEBS Letters* 360 (1995) 111-114).

Perfiles de estabilidad en plasma

25 Método N.º 1:

Se desarrolló un ensayo rápido de perfiles de estabilidad en plasma que empleaba detección por espectrometría de masas (MALDI-TOF, Voyager DE, Applied Biosystems) de la masa precursora, así como de los fragmentos inducidos por plasma-proteasa de la misma. Al evaluar la naturaleza de los fragmentos, pueden determinarse sitios de escisión preferidos. En este caso, se diluyó directamente una solución madre de péptido 1 - 1,5 mM (en DMSO) en plasma de ratón/rata/humano (laboratorios Sera, usando citrato como anticoagulante), proporcionando una concentración final de péptido de 50 μ M, y se incubó durante un máximo de 48 horas a 37 °C. Se tomaron muestras de 5 μ l en los puntos temporales apropiados y se congelaron a -80 °C. Para el análisis, las muestras se descongelaron, se mezclaron con 25 μ l de acetonitrilo:metanol:agua 3:3:1, y se centrifugaron a 13.000 durante 5 min. Se aspiraron 5 μ l del sobrenadante que contenía el péptido y se mezclaron con bicarbonato de amonio 30 mM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo:H₂O. Despues, se aplicó puntualmente 1 μ l en la placa de MALDI, se secó y se aplicó en capas Matrix (ácido alfa-cianocinámico, Sigma, preparada como solución saturada en acetonitrilo:agua 1:1 que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %) sobre la muestra (1 μ l), se secó y se analizó usando MALDI TOF. Cabe señalar que éste es un ensayo cualitativo que sirve para detectar cambios comparativos en la estabilidad plasmática entre diferentes secuencias de péptidos bicíclicos, y funciona como una excelente herramienta para determinar sitios de escisión preferidos.

Método N.º 2

45 Para obtener cuantitativamente la estabilidad plasmática de los péptidos bicíclicos, se mezclaron soluciones madre de péptidos (160 μ M en DMSO) con plasma (humano, de rata o de ratón), de manera que las concentraciones finales fueran de 4 μ M, y se incubaron a 37 °C. Se tomaron muestras de 40 μ l periódicamente hasta 24 horas y se congelaron a -80 °C. Antes del análisis por LC-MS, se descongelaron muestras y se mezclaron con 3 volúmenes (en este caso, 120 μ l) de 1 parte de agua, 3 partes de acetonitrilo y 3 partes de metanol. Las suspensiones lechosas se centrifugaron durante 40 minutos a 14.000 rpm en una centrifugadora enfriada, y los sobrenadantes que contenían péptidos se cuantificaron para especies con carga doble/triple y fragmentos de MS/MS de las mismas usando un instrumento Waters Xevo TQ-D, usando al mismo tiempo como referencia una curva patrón extraída de plasma de los mismos péptidos. La semivida de degradación en plasma se usó para evaluar la estabilidad comparativa de las moléculas.

Eficacia de BT17BDC-27 y BT17BDC-28 en ratones con xenoinjerto de EBC-1.

55 Se trataron ratones atípicos Balb/c portadores de tumores de xenoinjerto de EBC-1 subcutáneos con BDC (conjugado péptido bicíclico-fármaco, por sus siglas en inglés) o vehículo. Los BDC se dosificaron 3 veces por semana durante 2 semanas, la dosificación se inició cuando los tumores medían aproximadamente 150-200 mm³. Se controló a los ratones y se registraron mediciones de volumen tumoral y peso corporal 3 veces por semana.

60 **Ejemplo 1: Análisis de afinidad de BT17BDC-27 y BT17-BDC-28**

65 Se prepararon dos BDC de DM1-toxina (denominadas en lo sucesivo en el presente documento BT17BDC-27 y BT17BDC-28), en las que se introdujo un impedimento idéntico en el lado Bicíclico de la construcción molecular. Los grupos de impedimento son grupos metilo que están situados en las posiciones R³ y R⁴.

BT17BDC-28 emplea el péptido bicíclico 17-69-07-N241, que contiene el espaciador molecular bAla-Sar10 unido N-terminalmente al Péptido Bicíclico que contiene las 4 modificaciones (D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11).

5 BT17BDC-27 emplea el péptido bicíclico 17-69-07-N268, que carece del espaciador molecular bAla-Sar10 unido N-terminalmente al Péptido Bicíclico de 17-69-07-N241, conteniendo al mismo tiempo las mismas 4 modificaciones (D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11).

10 Las secuencias de Péptido Bicíclico de 17-69-07-N241 y 17-69-07-N268, y sus afinidades a MT1-MMP determinadas mediante experimentos de competencia por polarización de fluorescencia, se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Afinidades de unión de 17-69-07-N241 y 17-69-07-N268

Código peptídico	Descripción molecular	Kd (nM)
17-69-07-N241	bAla-Sar10-A-(17-69-07) D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11	1,21 ± 0,24
17-69-07-N268	A-(17-69-07) D-Ala1 1Nal4 D-Ala5 tBuGly11	1,70 ± 0,28

15 De los datos se desprende claramente que el espaciador molecular bAla-Sar10 no es necesario para la retención de la afinidad a la diana, y por lo tanto, la conjugación con un efecto (en este caso, DM1) conceiblemente se tolera.

16 Además, el BDC que carece del espaciador molecular Sar10 hidrófilo tiene un peso molecular más bajo y una mayor relación de toxina a peso, así como una mayor hidrofobia general que, en conjunto, pueden influir en el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico.

20 BT17BDC-27 y BT17BDC-28 se sintetizaron de acuerdo con el Esquema I. En este caso, los precursores del Péptido Bicíclico que contienen amina (17-69-07-N268 y 17-69-07-N241, respectivamente) se conjugaron con SMPP (que introduce el disulfuro impedido protegido con piridil-disulfuro) y se redujeron para revelar el tiol libre pero impedido en el Péptido Bicíclico. Despues, se intercambió el disulfuro con DM1 activado por piridil-disulfuro (DM1-S-S-Pi) para proporcionar los productos deseados.

25 **Ejemplo 2: Caracterización *in vitro* de BT17BDC-27 y BT17BDC-28**

30 Ambas estructuras de conjugados BDC se evaluaron para varios parámetros *in vitro* tales como la retención de potencia con respecto al dominio hemopexina de MT1-MMP humana, la estabilidad en plasma de ratón, humano y de rata, y la estabilidad frente a agentes reductores tales como ditiotreitol.

30 Los datos se resumen en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Propiedades *in vitro* de BT17BDC-27 y BT17BDC-28

Conjugado de fármaco de biciclo	Kd (nM)	t _{1/2} (horas)	t _{1/2} (horas)	t _{1/2} (horas)	Estabilidad relativa al DTT	Estabilidad relativa al DTT
	(Dominio hemopexina) ^a	(plasma humano) ^b	(plasma de ratón) ^b	(plasma de rata) ^b	(ADC) ^c	(BDC) ^d
BT17BDC-27	0,69 ± 0,26 (n=2)	36	23	9	14	32
BT17BDC-28	1,65 ± 1,08 (n=2)	29	19	13	14	28

donde n = número de repeticiones

^a: determinado mediante experimentos de competencia por polarización de fluorescencia usando 17-69-07-N040 como indicador

^b: determinado usando LC-MS cuantitativa. Tiempo de incubación de hasta 24 horas en plasma, conteniendo BDC 4 µM.

^c: de Kellogg *et al.* (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717. Nótese que estos valores se refieren a conjugados anticuerpo-fármaco que contienen el enlazador de disulfuro descrito en el texto

^d: determinado mediante LC-MS cuantitativa. Nótese que estos valores se refieren a conjugados Biciclo-Fármaco que contienen el enlazador de disulfuro descrito en el texto. Los métodos se adaptaron de Kellogg *et al.* (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717.

35 Los datos indican que las construcciones toleran la fijación de toxina, incluso en ausencia del espaciador molecular Sar10, ya que se conservan las afinidades por la diana MT1-MMP. Además, la estabilidad relativa al DTT en comparación con los BDC de disulfuro no impedidos es prácticamente idéntica tanto para BT17BDC-27 como para BT17BDC-28, lo que indica que la presencia o ausencia del espaciador molecular no influye en la velocidad de liberación de toxinas.

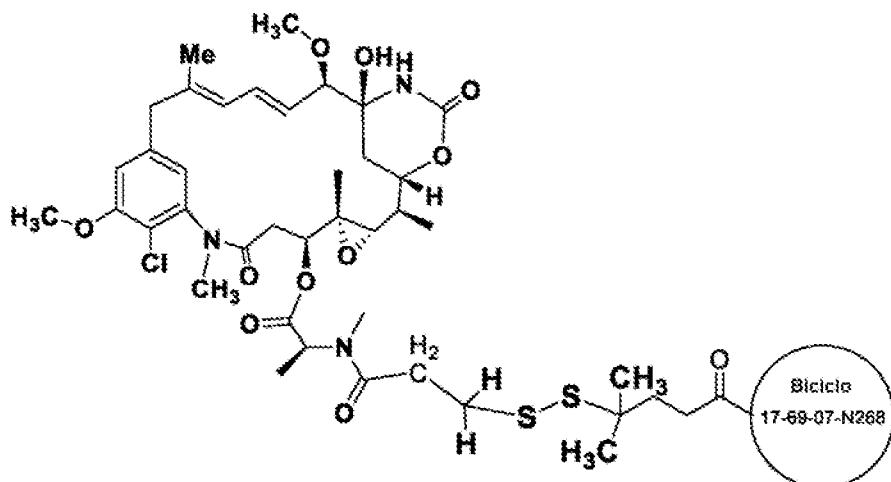
40 **Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* de BT17BDC-27 y BT17BDC-28**

Se probó la eficacia de ambos BDC en modelos de xenoinjerto en ratón *in vivo*, usando la estirpe de carcinoma escamoso de pulmón humano EBC-1.

- 5 BT17BDC-27 fue más eficaz que BT17BDC-28, ya que eliminó los tumores en 14 días (Figura 1) a 10 mg/kg. A esta dosis se observó una ligera reducción del peso corporal (Figura 2). Por el contrario, a 10 mg/kg, BT17BDC-28 condujo a una estasis del crecimiento tumoral pero no a una regresión activa (Figura 3), mientras que no se observó pérdida de peso para BT17BDC-28 (Figura 4). BT17BDC-27 merece mayor atención debido a su apreciable eficacia y tolerabilidad a dosis iguales o inferiores a 5 mg/kg.

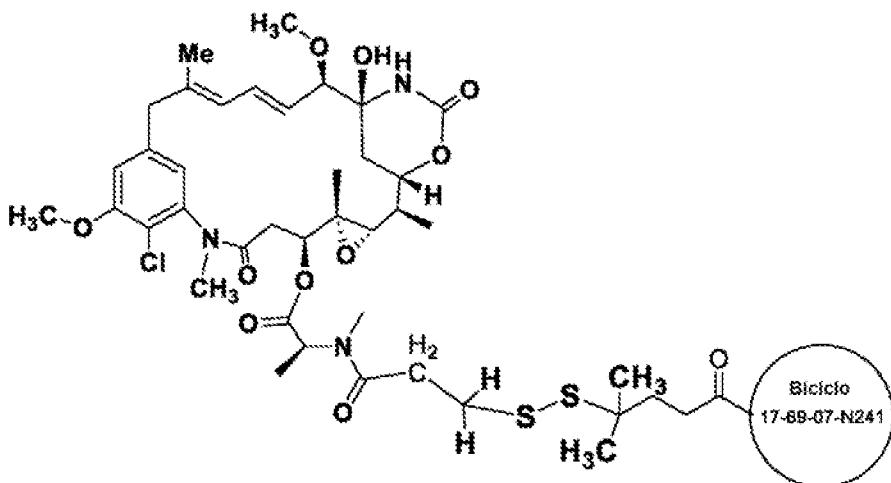
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fármaco seleccionado de BT17BDC-27:



5

o BT17BDC-28:



10

en donde Biciclo 17-69-07-N268 representa -AC_i(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}-CONH₂ y Biciclo 17-69-07-N241 representa -(bAla)-Sar10-ACi(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)C_{ii}EDFYD(tBuGly)C_{iii}-CONH₂, de los cuales ambos se ciclan en C_i, C_{ii} y C_{iii} con 1,3,5-tris(bromometil)benceno (TBMB) produciendo una estructura de 1,3,5-trimetilbenceno trisustituido.

15

2. Un proceso para preparar un conjugado de fármaco como se define en la reivindicación 1, que comprende la vía de síntesis descrita en el Esquema I.

3. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de fármaco de la reivindicación 1, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

4. El conjugado de fármaco como se define en la reivindicación 1, para su uso en la prevención, la supresión o el tratamiento de cáncer, en particular tumores sólidos tales como carcinomas pulmonares no microcíticos.

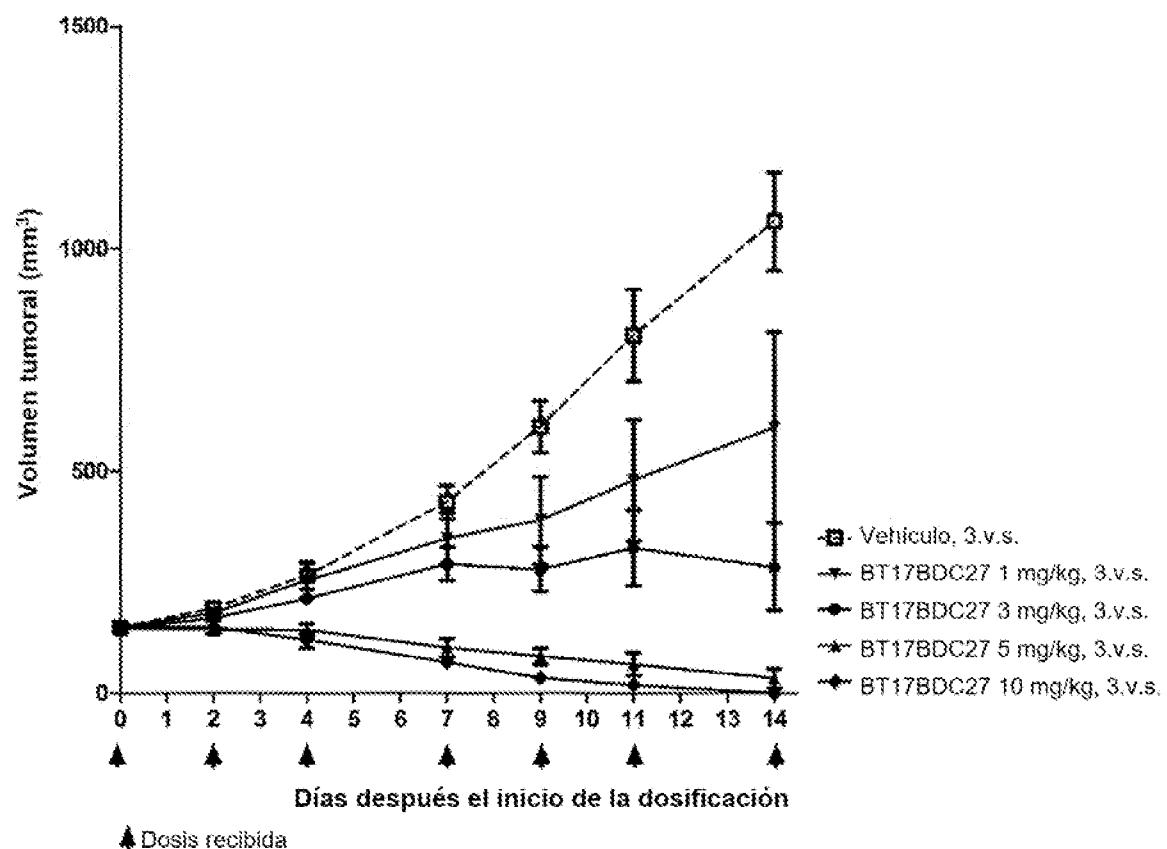


FIGURA 1

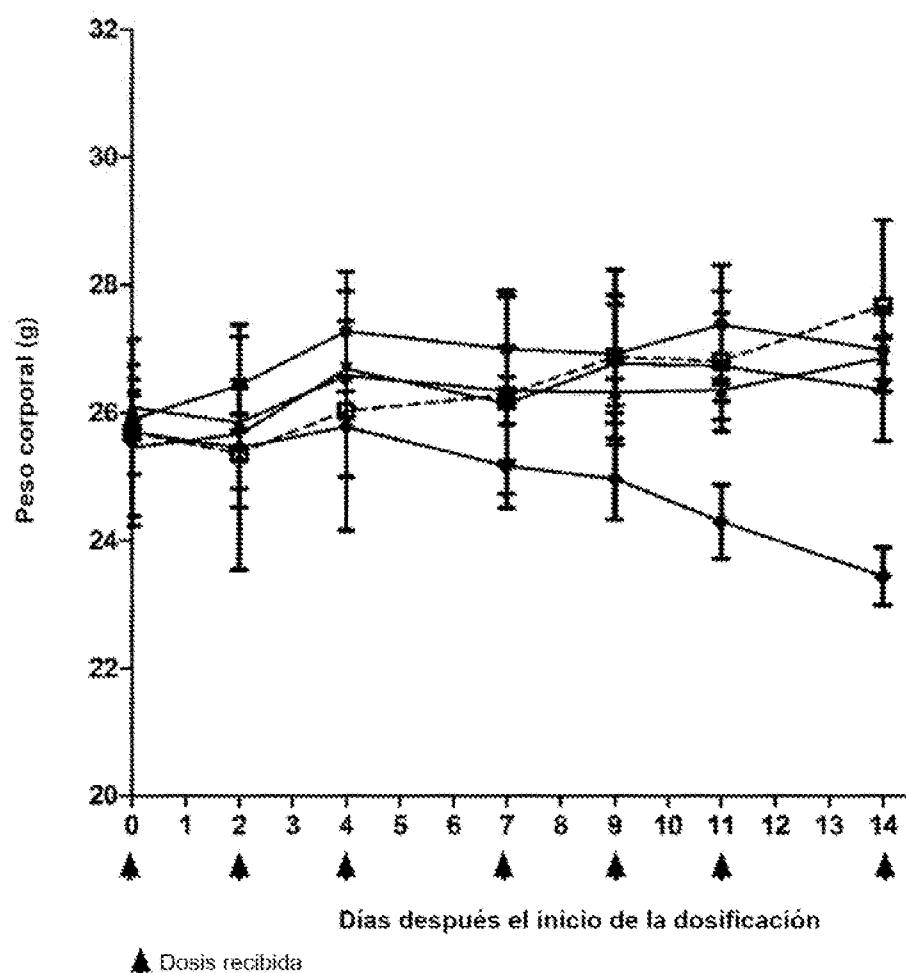


FIGURA 2

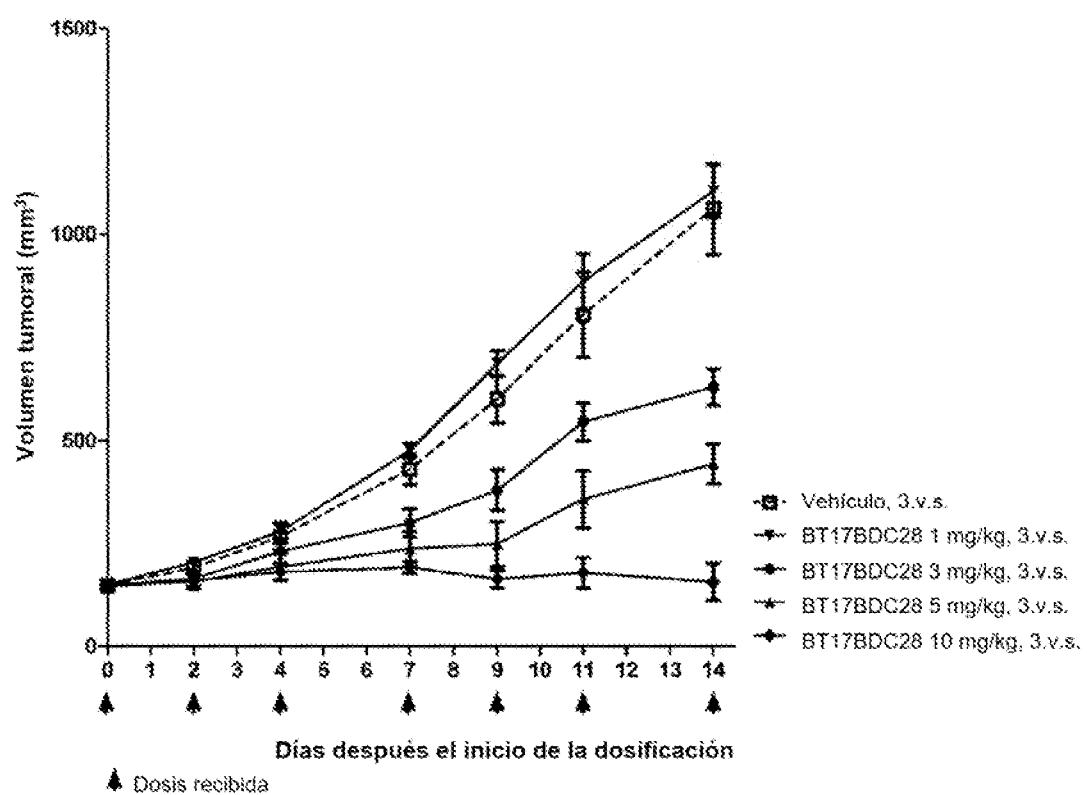


FIGURA 3

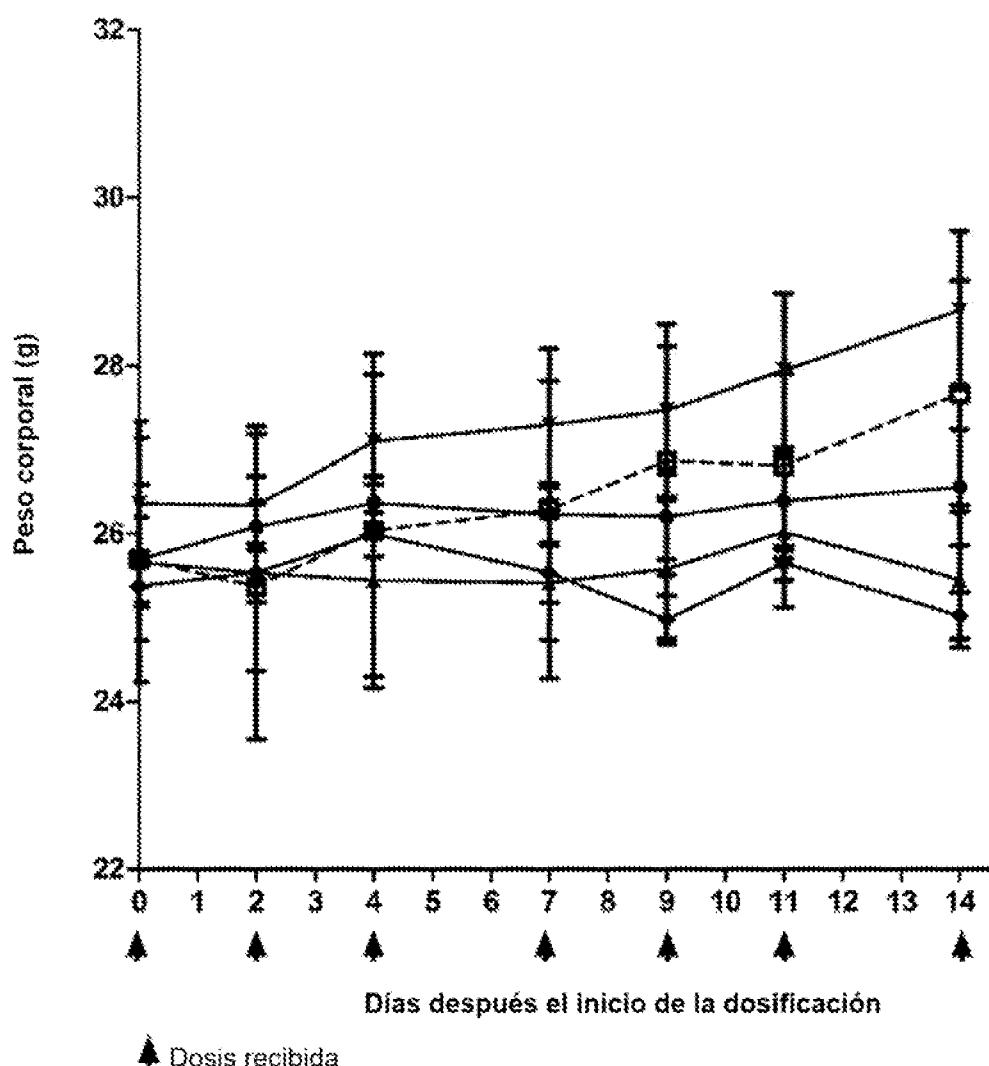


FIGURA 4