

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 082**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2004 E 04705573 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **09.11.2005 EP 1592457**

54 Título: **Conjugado de folato-vinblastina como medicamento**

30 Prioridad:

27.01.2003 US 442845 P

01.08.2003 US 492119 P

31.10.2003 US 516188 P

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

08.02.2013

73 Titular/es:

**ENDOCYTE, INC. (100.0%)
3000 Kent Avenue, Suite A1-100
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**VLAHOV, IONTCHO RADOSLAVOV;
LEAMON, CHRISTOPHER PAUL;
PARKER, MATTHEW A.;
HOWARD, STEPHEN J.;
SANTHAPURAM, HARI KRISHNA;
SATYAM, APPARAO y
REDDY, JOSEPH ANAND**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 395 082 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

Conjugado de folato-vinblastina como medicamento.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad a tenor del título 35 del Código de los Estados Unidos, § 119(e) para la solicitud de Patente de los Estados Unidos con N.º de serie 60/442.845, titulada " Vitamin-Receptor Binding Drug Delivery Conjugates", presentada el 27 de enero de 2003, la solicitud de Patente de los Estados Unidos con N.º de serie 60/492.119, titulada " Vitamin-Receptor Binding Drug Delivery Conjugates", presentada el 1 de agosto de 2003, y la solicitud de Patente de los Estados Unidos con N.º de serie 60/516.188, titulada " Vitamin-Receptor Binding Drug Delivery Conjugates", presentada el 31 de octubre de 2003.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a composiciones y a su uso en la administración dirigida de fármacos. Más concretamente, la invención se dirige a conjugados para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas para usar en el tratamiento de estados patógenos causados por poblaciones de células patógenas, y a composiciones farmacéuticas fabricadas a partir de los anteriores.

Antecedente de la invención

15 El sistema inmune de los mamíferos constituye un medio para reconocer y eliminar células tumorales, otras células patógenas y patógenos extraños invasores. Aunque el sistema inmune constituye normalmente una línea de defensa fuerte, existen muchos casos en los que células cancerosas, otras células patógenas y patógenos extraños invasores pueden eludir la respuesta inmune del hospedador y proliferar o persistir con la consiguiente patogenicidad para el hospedador. Los agentes quimioterapéuticos y las radioterapias se han desarrollado para eliminar, por ejemplo, neoplasias en replicación. Sin embargo, muchos de los agentes quimioterapéuticos actualmente disponibles y pautas de radioterapia tienen efectos secundarios adversos por que no solo actúan destruyendo las células patógenas, sino que también afectan las células normales del hospedador, como las células del sistema hematopoyético. Los efectos secundarios adversos de estos fármacos contra el cáncer destacan la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos selectivos para la población de células patógenas y con menos toxicidad para el hospedador.

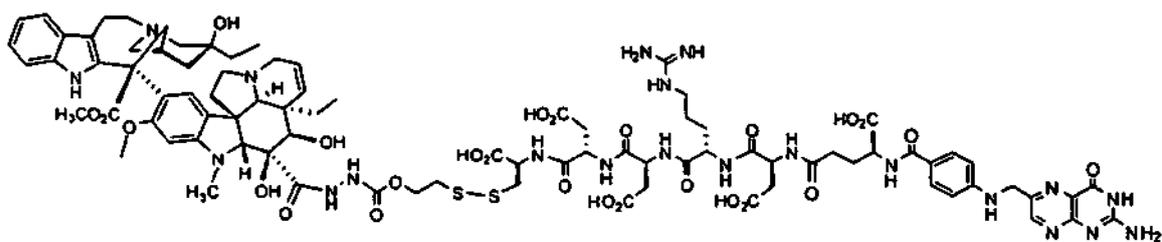
20 Los investigadores han desarrollado protocolos terapéuticos para destruir células patógenas dirigiendo compuestos citotóxicos a dichas células. Muchos de estos protocolos usan toxinas conjugadas con anticuerpos que se unen a antígenos expresados de forma única o en exceso por las células patógenas en un intento de minimizar la administración de la toxina a células normales. Con este enfoque, se han desarrollado varias inmunotoxinas constituidas por anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos en células patógenas, estando los anticuerpos unidos a toxinas como la ricina, la exotoxina de Pseudomonas, la toxina diftérica, y el factor de necrosis tumoral. Estas inmunotoxinas se dirigen a células patógenas, tales como células tumorales, que contienen los antígenos específicos reconocidos por el anticuerpo (Olsnes, S., Immunol Today, 10, pp. 291-295, 1989; Melby, E.L., Cancer Res., 53(8), pp. 1755-1760, 1993; Better, M.D., número de publicación PCT WO 91/07418, publicado el 30 de mayo de 1991).

30 Otro enfoque para dirigir fármacos contra poblaciones de células patógenas, como células cancerosas o patógenos extraños, en un hospedador es potenciar la respuesta inmune del hospedador contra las células patógenas para evitar la necesidad de administrar compuestos que pueden mostrar también toxicidad independiente para el hospedador. Una estrategia para inmunoterapia notificada es unir anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos multiméricos diseñados por ingeniería genética, a la superficie de células tumorales para presentar la región constante de los anticuerpos sobre la superficie celular e inducir la muerte de la célula tumoral por diferentes procesos mediados por el sistema inmune (De Vita, V.T., Biologic Therapy of Cancer, 2ª ed. Filadelfia, Lippincott, 1995; Soullillou, J.P., Patente de los Estados Unidos 5.672.486). Sin embargo, estos enfoques se han visto complicados por las dificultades para definir antígenos específicos tumorales.

Resumen de la invención

40 En un intento de desarrollar tratamientos eficaces específicos para células patógenas y con toxicidad minimizada para las células normales, se han desarrollado conjugados para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas. La presente invención se puede aplicar a poblaciones de células patógenas que expresan de manera única, preferiblemente expresan, o expresan en exceso, receptores de folato o receptores que se unen a derivados o análogos del folato.

45 La invención se refiere a un conjugado para administrar fármacos que tiene la fórmula



La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende el conjugado para administrar fármacos anterior y un vehículo, diluyente o excipiente de la misma farmacéuticamente aceptable.

5 La invención se refiere adicionalmente al uso del conjugado para administrar fármacos anterior o la composición anterior en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente. En un aspecto relacionado, la invención se refiere al conjugado para administrar fármacos anterior o la composición anterior en un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente.

10 En algunas realizaciones de la invención, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer oral, de tiroides, endocrino, de la piel, gástrico, esofágico, laríngeo, pancreático, de colon, de vejiga, óseo, ovárico, cervical, uterino, de mama, testicular, prostático, rectal, de riñón, de hígado y de pulmón. Un cáncer concreto es el cáncer de ovarios. Otro cáncer concreto es el cáncer de mama. Otro cáncer concreto adicional es el cáncer de pulmón.

La invención se refiere a la anterior materia sujeto. Sin embargo, se incluye lo siguiente con el fin de ilustrar adicionalmente y proporcionar información de respaldo relativa a la materia sujeto reivindicada.

15 Un conjugado para administrar fármacos comprende un resto de unión al receptor de vitaminas, un enlazador bivalente, y un fármaco. Tal como se usa en el presente documento, "V" se refiere a un resto de unión al receptor de vitaminas e incluye vitaminas, y análogos o derivados de las mismas de unión al receptor de vitaminas, y el término "vitamina o análogo o derivado de la misma" se refiere a vitaminas y análogos y derivados de la misma que son capaces de unirse a los receptores de vitamina. Tal como se usa en el presente documento, "D" se refiere a fármacos, e incluye análogos y derivados de los mismos. La vitamina, o el análogo o el derivado de la misma, está
 20 unido covalentemente al enlazador bivalente (L), y el fármaco, o el análogo o el derivado del mismo, también está unido covalentemente al enlazador bivalente (L). El enlazador bivalente (L) puede comprender varios enlazadores. Por ejemplo, el enlazador bivalente (L) puede comprender uno o más componentes seleccionados entre enlazadores separadores (I_s), enlazadores liberables (I_r), y enlazadores con heteroátomo (I_H), y combinaciones de los mismos, en cualquier orden.

25 Los conjugados para administración de fármaco que ilustran esta realización incluyen:

V-L-D

V-(I_r)_c-D

V-(I_s)_a-D

V-(I_s)_a-(I_r)_c-D

30 V-(I_r)_c-(I_s)_a-D

V-(I_H)_b-(I_r)_c-D

V-(I_r)_c-(I_H)_b-D

V-(I_H)_d-(I_r)_c-(I_H)_e-D

V-(I_s)_a-(I_H)_b-(I_r)_c-D

35 V-(I_r)_c-(I_H)-(I_s)_a-D

V-(I_H)_d-(I_s)_a-(I_r)_c-(I_H)_e-D

V-(I_H)_d-(I_r)_c-(I_s)_a-(I_H)_e-D

V-(I_H)_d-(I_s)_a-(I_H)_b-(I_r)_c-(I_H)_e-D

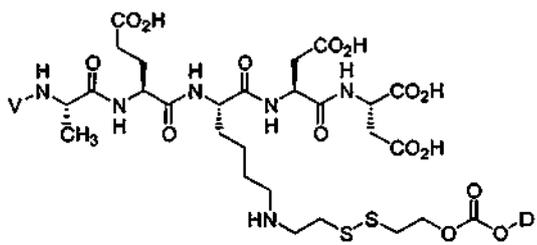
V-(I_H)_d-(I_r)_c-(I_H)_b-(I_s)_a-(I_H)_e-D

40 V-(I_s)_a-(I_r)_c-(I_H)_b-D



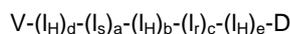
en los que a, b, c, d, y e son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, o 4, (I_s), (I_H), y (I_r) son como se han definido en el presente documento, V es una vitamina, o análogo o derivado de la misma, y D es un fármaco, o análogo o derivado del mismo, y en donde el L bivalente abarca uno de una variedad de (I_s), (I_H), y (I_r), en cualquier orden y cualquier combinación. Se entiende que los anteriores ejemplos del enlazador bivalente L están previstos para ilustrar la amplia variedad de ensamblajes entre (I_H), (I_s), y (I_r) que abarca el enlazador bivalente.

Se entiende que cada uno de los enlazadores separadores, de heteroátomo y liberables es bivalente. Debe entenderse además que la conectividad de cada uno de los diferentes enlazadores separadores, de heteroátomo y liberables, y entre los diferentes enlazadores separadores, de heteroátomo y liberables y D y/o V, como se ha definido en el presente documento, pueden producirse en cualquiera de los átomos de los enlazadores separadores, de heteroátomo y liberables, y no se producen necesariamente en ningún extremo aparente de ninguno de los diferentes enlazadores separadores, de heteroátomo y liberables. Por ejemplo, en la realización a modo de ejemplo en la que el enlazador bivalente es:



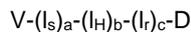
es decir, en la que el enlazador bivalente L es $-(I_H)-(I_s)_5-(I_r-I_H)_2-D$, en la que (I_H) es nitrógeno, (I_s)₅ es Ala-Glu-Lys-Asp, y (I_r-I_H)₂ es $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-O-C(O)-O-$, respectivamente, el enlazador (I_r-I_H)₂ está conectado a la parte intermedia del enlazador (I_s)₅.

El conjugado para administrar fármaco puede comprender un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), y un fármaco, y el enlazador bivalente (L) comprende uno o más enlazadores de heteroátomo (I_H). El resto de unión al receptor de vitamina puede estar covalentemente unido al enlazador bivalente (L) mediante un primer enlazador de heteroátomo (I_H)_d y el fármaco puede estar covalentemente unido al enlazador bivalente (L) mediante un segundo enlazador de heteroátomo (I_H)_e. El enlazador bivalente (L) puede también comprender uno o más enlazadores separadores y enlazadores liberables, en donde los enlazadores separadores y los enlazadores liberables pueden estar covalentemente unido entre sí de manera diferente a un tercer enlazador de heteroátomo (I_H)_b. Dicho conjugado para administrar fármacos se ilustra de la siguiente forma:



en la que a, b, c, d, y e son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, o 4, (I_s), (I_H), y (I_r), y V y D son como se han definido en el presente documento, y en la que el enlazador bivalente L abarca (I_s), (I_H), y (I_r) tal como se ha ilustrado.

El conjugado para administrar fármaco puede comprender un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), y un fármaco, y el enlazador bivalente (L) puede comprender un enlazador de heteroátomo (I_H). El resto de unión al receptor de vitamina puede ser una vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, y el fármaco puede incluir análogos o derivados del mismo. La vitamina, o el análogo o el derivado de la misma, puede estar covalentemente unido al enlazador bivalente (L) y el fármaco, o el análogo o el derivado del mismo, puede estar unido covalentemente al enlazador bivalente (L). El enlazador bivalente (L) puede también comprender enlazadores separadores y enlazadores liberables, y los enlazadores separadores y los enlazadores liberables pueden estar covalentemente unidos entre sí de forma diferente que mediante el enlazador de heteroátomo. Se ilustra de la siguiente forma un conjugado para administrar fármaco:



en la que a, b, y c son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, o 4, (I_s), (I_H), y (I_r), y V y D son como se han definido en el presente documento, y en la que el enlazador bivalente L abarca (I_s), (I_H), y (I_r) como se ilustra.

Un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede tener también la fórmula general V-L-D. En esta realización, L se construye con uno o más enlazadores (I_r)_c, (I_s)_a, y (I_H)_b, y combinaciones de los mismos, en cualquier orden, en la que (I_r) es un enlazador liberable, (I_s) es un enlazador separador, (I_H) es un enlazador de heteroátomo, y a, b, y c son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, o 4, V es una vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, y D es un fármaco, o un análogo o un derivado del mismo. Se apreciará que los conjugados para administración de fármaco descritos en la presente memoria pueden incluir un enlazador bivalente que tiene más de un enlazador separador, enlazador liberable, o enlazador de heteroátomo. Por ejemplo, se contemplan enlazadores bivalentes que incluyen dos o más enlazadores liberables (I_r). Además, las configuraciones de dichos enlazadores liberables incluyen enlazadores bivalentes en los que los enlazadores liberables están unidos

covalentemente entre sí, y en las que los enlazadores liberables están separados entre sí por uno o más enlazadores de heteroátomo y/o enlazadores separadores.

5 Un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede tener también la fórmula general V-L-D en la que L es un enlazador bivalente que comprende $(I_s)_a$ y $(I_H)_b$, y combinaciones de los mismos en cualquier orden, en la que $(I_s)_a$ y $(I_H)_b$, y V y D son como se han definido en el presente documento. En esta realización, el fármaco del conjugado para administrar fármaco puede ser un hapteno como fluoresceína o nitrofenilo.

10 Un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede tener también la fórmula general V-L-D, en la que L es un enlazador bivalente que comprende $(I_s)_a$, $(I_H)_b$, y $(I_r)_c$, y combinaciones de los mismos en cualquier orden, en la que $(I_s)_a$ y $(I_H)_b$, y V y D son como se han definido en el presente documento, y en donde al menos uno de $(I_r)_c$ no es un disulfuro. Se apreciará que los enlazadores bivalentes de esta realización con más de un $(I_r)_c$, es decir, en los que c es mayor que 1, pueden incluir una enlazador liberable de disulfuro además de otro u otros enlazadores liberables.

15 En un aspecto de los diferentes conjugados para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquiloximetiloxilo, en el que el metilo está opcionalmente sustituido por un alquilo o arilo sustituido.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilo, en el que el carbonilo forma una aciláridina con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

20 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 1-alcoxícicloalquilenoxi.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador separador, un enlazador de heteroátomo, y un enlazador liberable tomados juntos para formar alquilenamino carbonil(dicarboxilarileno)carboxilato.

25 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar ditioalquilcarbonilhidrazida, en la que la hidrazida forma una hidrazona con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilhidrazida, en la que la hidrazida forma una hidrazona con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

30 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-tioalquilsulfonilalquil(sililo disustituido)oxilo, en la que el sililo disustituido está sustituido por alquilo o arilo opcionalmente sustituido.

35 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende una pluralidad de enlazadores separadores seleccionados entre el grupo que consiste en los aminoácidos naturales y estereoisómeros de los mismos.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbonato con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

40 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioarilalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbonato con el fármaco, o análogo o derivado del mismo, y el arilo está opcionalmente sustituido.

45 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquiloxialquiloxialquilideno, en el que el alquilideno forma una hidrazona con el fármaco, o análogo o derivado del mismo, cada alquil se ha seleccionado independientemente, y el oxialquiloxi está opcionalmente sustituido por alquilo o arilo opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilhidrazida.

50 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilamino, en el que el amino forma una amida viníloga con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilamino, en el que el amino forma una amida viníloga con el fármaco,

o análogo o derivado del mismo, y el alquilo es etilo.

En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilaminocarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

- 5 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilaminocarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato con el fármaco, o análogo o derivado del mismo, y el alquilo es etilo.

10 En otro aspecto, el enlazador bivalente comprende un enlazador liberable, un enlazador separador, y un enlazador liberable tomados juntos para formar 3-ditioarilalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato o una carbamoilaziridina con el fármaco, o análogo o derivado del mismo.

En un aspecto, los enlazadores, liberables, separadores y de heteroátomos se pueden disponer de forma que tras la escisión de un enlace en el enlazador bivalente, los grupos funcionales liberados ayuden químicamente a la rotura o escisión de otros enlaces, también denominada rotura o escisión con ayuda anquimérica. Una realización a modo de ejemplo de dicho enlazador bivalente o parte del mismo incluye compuestos que tienen la fórmula:



20 en la que X es un heteroátomo, como nitrógeno, oxígeno o azufre, n es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, y 3, R es hidrógeno, o un sustituyente, incluyendo un sustituyente capaz de estabilizar una carga positiva por inducción o resonancia sobre el anillo de arilo, tal como alcoxilo, y el símbolo (*) indica puntos de unión para enlazadores separadores, de heteroátomo, o liberables adicionales, conformando el enlazador bivalente, o

25 alternativamente para unión del fármaco, o análogo o derivado del mismo, o la vitamina, o análogo o derivado de la misma. Se apreciará que pueden estar presentes otros sustituyentes en el anillo de arilo, el carbono bencílico, el ácido alcanoico, o el puente de metileno, incluyendo hidroxilo, alquilo, alcoxilo, alquiltio, y halo. La escisión con ayuda puede incluir mecanismos que implican intermedios de bencilio, intermedios de bencino, ciclación de lactona, intermedios de oxonio, y beta-eliminación. Se apreciará adicionalmente que, además de la fragmentación posterior a la escisión del enlazador liberable, la escisión inicial del enlazador liberable puede verse facilitada por un mecanismo de ayuda anquimérica.

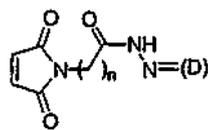
30 Un intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede comprender un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente, que tiene un primer extremo y un segundo extremo, y un grupo de acoplamiento. El resto de unión al receptor de vitamina puede ser una vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, y el grupo de acoplamiento es un nucleófilo, un electrófilo, o un precursor de los mismos. El resto de unión al receptor de vitamina puede estar unido covalentemente al enlazador bivalente en el primer extremo del enlazador bivalente, y el grupo de acoplamiento puede estar unido covalentemente al enlazador bivalente en el

35 orden.

40 Un intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede comprender también un enlazador bivalente, que tiene un primer extremo y un segundo extremo, un fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, y un grupo de acoplamiento. El enlazador bivalente puede comprender uno o más componentes seleccionados entre enlazadores separadores, enlazadores liberables, y enlazadores de heteroátomo, como se ha descrito en el presente documento. El grupo de acoplamiento puede estar unido covalentemente al enlazador bivalente en el primer extremo del enlazador bivalente, y el fármaco o análogo o derivado del mismo puede estar unido covalentemente al enlazador bivalente en el segundo extremo del enlazador bivalente. Además, el grupo de acoplamiento puede ser un nucleófilo, un electrófilo, o un precursor de los mismos, capaz de formar un enlace covalente con un resto de unión al receptor de vitamina, donde el resto de unión al receptor de vitamina es una

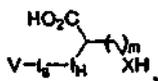
45 vitamina, o un análogo o un derivado de la misma.

50 En otra realización a modo de ejemplo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el grupo de acoplamiento puede ser un aceptor de Michael, y el enlazador bivalente incluye un enlazador liberable que tiene la fórmula $-C(O)NHN=$, $-NHC(O)NHN=$, o $-CH_2C(O)NHN=$. En un aspecto ilustrativo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el grupo de acoplamiento y el enlazador bivalente se toman juntos para formar un compuesto que tiene la fórmula:



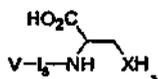
5 o un derivado protegido del mismo, en la que D es el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, capaz de formar una hidrazona como se ilustra en el presente documento; y n es un número entero tal como 1, 2, 3, o 4. En otro aspecto ilustrativo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, la vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, incluye un nucleófilo de alquiltiol.

10 En otra realización a modo de ejemplo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el grupo de acoplamiento es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno, o azufre, y el enlazador bivalente incluye uno o más enlazadores de heteroátomo y uno o más enlazadores separadores que conectan de forma covalente la vitamina o análogo o derivado de la misma con el grupo de acoplamiento. En un aspecto ilustrativo, el intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento incluye un compuesto que tiene la fórmula:



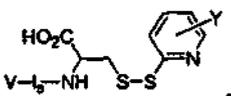
15 o un derivado protegido del mismo, en la que X es oxígeno, nitrógeno o azufre, y m es un número entero tal como 1, 2, o 3, y en la que V, l_s, y l_H son como se han definido en el presente documento.

En otro aspecto ilustrativo, el intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento incluye un compuesto que tiene la fórmula:



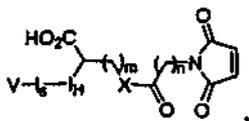
20 o un derivado protegido del mismo, en la que X es nitrógeno o azufre, en la que V y l_s son como se han definido en el presente documento.

En otro aspecto ilustrativo, el intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento incluye un compuesto que tiene la fórmula:



25 o un derivado protegido del mismo, en la que Y es hidrógeno o un sustituyente, a modo de ejemplo un sustituyente electrófilo incluyendo nitro, ciano, halo, alquilsulfonilo, y un derivado de ácido carboxílico, y en la que V y l_s son como se han definido en el presente documento.

30 En otra realización a modo de ejemplo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el grupo de acoplamiento es un aceptor de Michael, y el enlazador bivalente incluye uno o más enlazadores de heteroátomo y uno o más enlazadores separadores que conectan de forma covalente la vitamina o análogo o derivado de la misma al grupo de acoplamiento. En un aspecto ilustrativo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el grupo de acoplamiento y el enlazador bivalente se toman juntos para formar un compuesto que tiene la fórmula:



35 o un derivado protegido del mismo, en la que X es oxígeno, nitrógeno o azufre, y m y n son números enteros seleccionados independientemente, tales como 1, 2, o 3, y en la que V, l_s, y l_H son como se han definido en el presente documento. En otro aspecto ilustrativo del intermedio del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, incluye un nucleófilo de alquiltiol.

40 En otro aspecto ilustrativo del conjugado para administrar fármacos al intermedio del receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el intermedio incluye compuestos con las fórmulas:

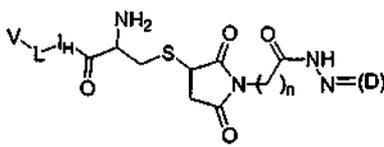


o derivados protegidos del mismo, en la que V es la vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, AA es un aminoácido, seleccionado a modo de ejemplo entre los aminoácidos naturales o estereoisómeros de los mismos, X es nitrógeno, oxígeno, o azufre, Y es hidrógeno o un sustituyente, a modo de ejemplo un sustituyente electrófilo, incluyendo, nitro, ciano, halo, alquilsulfonilo y un derivado de ácido carboxílico, m y n son números enteros seleccionados independientemente, tales como 1, 2, o 3, y p es un número entero tal como 1, 2, 3, 4, o 5. AA puede ser también cualquier otro aminoácido, tal como un aminoácido que tenga la fórmula general:



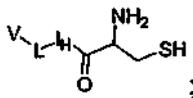
en la que R es hidrógeno, alquilo, acilo, o un grupo protector del nitrógeno adecuado, R' y R'' son hidrógeno o un sustituyente, cada uno de los cuales se ha seleccionado independientemente en cada aparición, y q es un número entero tal como 1, 2, 3, 4, o 5. A modo de ejemplo, R' y/o R'' corresponden independientemente a, hidrógeno o las cadenas secundarias presentes en los aminoácidos naturales, tales como metilo, bencilo, hidroximetilo, tiometilo, carboxilo, carboxilmetilo, guanidinopropilo, y derivados y derivados protegidos de los mismos. Las fórmulas anteriormente descritas incluyen todas las variantes estereoisoméricas. Por ejemplo, el aminoácido se puede seleccionar entre asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, arginina, serina, ornitina, y treonina. En otro aspecto ilustrativo del conjugado para administrar fármacos al intermedio del receptor de unión a vitaminas descrito en el presente documento, el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, incluye un nucleófilo de alquiltiol.

En otra realización a modo de ejemplo, se describe un proceso para preparar un compuesto que tiene la fórmula:

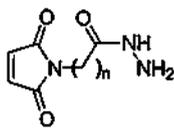


o un derivado protegido del mismo, en la que L es un enlazador que comprende (l_r)_c, (l_s)_a, y (l_H)_b, y combinaciones de los mismos; y D es un fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, capaz de formar una hidrazona, en donde (l_r)_c, (l_s)_a, y (l_H)_b, y V son como se han definido en el presente documento, proceso que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un compuesto que tiene la fórmula:



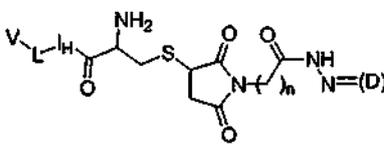
o un derivado protegido del mismo, con un compuesto que tiene la fórmula:



o un derivado protegido del mismo para formar un derivado de tiosuccinimida; y

(b) formar un derivado de hidrazona del fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, con el derivado de tiosuccinimida.

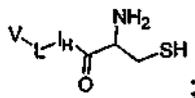
En otra realización a modo de ejemplo, se describe un proceso para preparar un compuesto que tiene la fórmula:



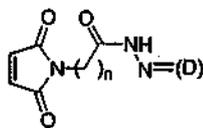
en la que L es un enlazador que comprende (l_r)_c, (l_s)_a, y (l_H)_b, y combinaciones de los mismos; y en donde D es el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, capaz de formar una hidrazona, y (l_r)_c, (l_s)_a, y (l_H)_b, y V son como se

han definido en el presente documento, el proceso comprende la etapa de:

hacer reaccionar un compuesto que tiene la fórmula:



o un derivado protegido del mismo, con un compuesto que tiene la fórmula:



o un derivado protegido del mismo.

En otra realización a modo de ejemplo se describe una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende un conjugado para administrar fármaco, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

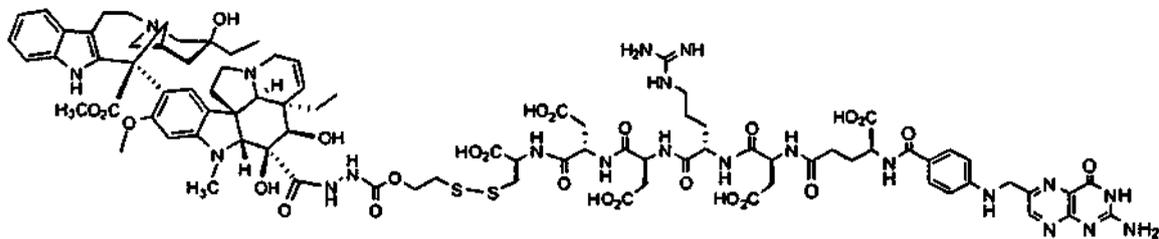
En otra realización a modo de ejemplo se describe un conjugado para administrar fármaco para usar en un procedimiento para eliminar una población de células patógenas en un animal hospedador que alberga la población de células patógenas en donde los miembros de la población de células patógenas tienen un sitio de unión accesible para una vitamina, o un análogo o derivado de la misma, y en donde el sitio de unión está expresado de forma única, expresado en exceso, o preferentemente expresado por las células patógenas.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 muestra la inhibición del crecimiento del tumor M109 mediante EC112 (Ejemplo 9c).
- La Fig. 2 muestra el efecto de EC 112 (Ejemplo 9c) sobre el peso corporal del animal.
- La Fig. 3 muestra la inhibición del crecimiento del tumor M109 mediante EC105 (Ejemplo 10a).
- La Fig. 4 muestra el efecto de EC105 (Ejemplo 10a) sobre los pesos corporales de los animales
- La Fig. 5 muestra la falta de inhibición del crecimiento del tumor 4T1 mediante EC105 (Ejemplo 10a).
- La Fig. 6 muestra la inhibición del crecimiento del tumor M109 mediante EC145 (Ejemplo 16b).
- La Fig. 7 muestra la inhibición del crecimiento del tumor M109 mediante EC140 (Ejemplo 17a).
- La Fig. 8 muestra la inhibición del crecimiento del tumor L1210 mediante EC136 (Ejemplo 10b).
- Figs. 9-16 muestra la inhibición de la síntesis del ADN celular mediante EC135, EC136, EC137, EC138, EC140, EC145, EC158, y EC159 (Ejemplos 17b, 10b, 16a, 10c, 17a, 16b, 14e, y 15, respectivamente).

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un conjugado para administrar fármaco que tiene la fórmula



La invención además se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anterior conjugado para administrar fármaco y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para el mismo.

La invención además se refiere al uso del anterior conjugado para administrar fármaco o la anterior composición en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer en un paciente. En un aspecto relacionado, la invención se refiere al anterior conjugado para administrar fármaco o la anterior composición para usar en un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente.

En algunas realizaciones de la invención el cáncer se ha seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer oral, de tiroides, endocrino, de la piel, gástrico, esofágico, laríngeo, pancreático, de colon, de vejiga, óseo, ovárico, cervical, uterino, de mama, testicular, prostático, rectal, de riñón, de hígado y de pulmón. Un cáncer concreto es el cáncer de ovarios. Otro cáncer concreto es el cáncer de mama.

La invención se refiere a la anterior materia sujeto. Sin embargo, se incluye lo siguiente con el fin de ilustrar adicionalmente y proporcionar información de respaldo relativa a la materia sujeto reivindicada.

Una realización a modo de ejemplo se refiere a un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas que comprende un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), y un fármaco en donde el resto de unión al receptor de vitamina y el fármaco están cada uno unido al enlazador bivalente (L), opcionalmente mediante un enlazador de heteroátomo. El enlazador bivalente (L) comprende uno o más enlazadores separadores, enlazadores de heteroátomo, y enlazadores liberables (es decir, escindibles), y combinaciones de los mismos, en cualquier orden.

El término "enlazador liberable" tal como se usa en el presente documento se refiere a un enlazador que incluye al menos un enlace que se puede romper en condiciones fisiológicas (por ejemplo, un enlace lábil frente al pH, lábil frente a ácidos, lábil frente a la oxidación, o lábil frente a enzimas). Se apreciará que dichas condiciones fisiológicas que dan como resultado la rotura del enlace incluyen las reacciones de hidrólisis química habituales que se producen, por ejemplo, a pH fisiológico, o como resultado de una compartimentación en un orgánulo celular como un endosoma que tenga un pH inferior al pH citosólico.

Se entiende que un enlace escindible puede conectar dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable y/o conectar otros enlazadores o V y/o D, tal como se ha descrito en el presente documento, en cualquiera o ambos extremos del enlazador liberable. En el caso en que un enlace escindible conecte dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable, tras la rotura del enlace, el enlazador liberable se rompe en dos o más fragmentos. Alternativamente, en el caso en que el enlace escindible se encuentre entre el enlazador liberable y otro resto, tal como un enlazador de heteroátomo, un enlazador separador, otro enlazador liberable, el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o la vitamina, o análogo o derivado de la misma, tras la rotura del enlace, el enlazador liberable queda separado del otro resto.

La labilidad del enlace escindible se puede ajustar mediante, por ejemplo, cambios sustitucionales en o cerca del enlace escindible, tal como incluyendo ramificación alfa adyacente a un enlace disulfuro escindible, aumentando la hidrofobia de los sustituyentes del silicio en un resto que tiene un enlace silicio-oxígeno que se puede hidrolizar, de forma análoga a los grupos alcoxilo que forman parte de un cetil o acetal que se puede hidrolizar.

Los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas se pueden usar para tratar estadios de enfermedad caracterizados por la presencia de una población de células patógenas en el hospedador en donde los miembros de la población de células patógenas tienen un sitio de unión accesible para una vitamina, o un análogo o derivado de la misma, en donde el sitio de unión está expresado de forma única, expresado en exceso, o preferentemente expresado por las células patógenas. La eliminación selectiva de las células patógenas está mediada por la unión del resto de vitamina del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas o transportador u otra proteína presentada en la superficie que se une específicamente a la vitamina, o análogo o derivado de la misma, y que está expresado de forma única, expresado en exceso, o preferentemente expresado por las células patógenas. Una proteína presentada en la superficie que está expresada de forma única, expresada en exceso, o preferentemente expresada por las células patógenas es un receptor no presente o presente a bajas concentraciones en las células no patógenas proporcionando un medio para la eliminación selectiva de las células patógenas.

Por ejemplo, los receptores de vitamina expresados en la superficie como el receptor con alta afinidad por el folato, están expresados en exceso en las células cancerosas. Se ha notificado que todos los cánceres epiteliales de ovario, de la glándula mamaria, de colon, de pulmón, de nariz, de garganta y de cerebro expresan elevados niveles del receptor de folato. De hecho, se sabe que más del 90% de todos los tumores de ovario humano expresan grandes cantidades de este receptor. De acuerdo con ello, los conjugados para administración de fármaco se pueden usar para tratar una variedad de tipos de células tumorales, así como otro tipo de células patógenas, tales como agentes infecciosos, que expresen preferentemente receptores de vitamina y, por tanto tengan sitios de unión accesibles en la superficie para vitaminas, o análogos o derivados de vitamina.

Además de las vitaminas descritas en el presente documento, se apreciará que otros ligandos se pueden acoplar a los fármacos y enlazadores descritos y contemplados en el presente documento para formar conjugados de ligando-enlazador-fármaco capaces de facilitar la administración del fármaco a una diana deseada. Estos otros ligandos, además de las vitaminas y sus análogos y derivados descritos, se pueden usar para formar los conjugados para administración de fármaco capaces de unirse a las células diana. En general, cualquier ligando de un receptor de la superficie celular se puede usar ventajosamente como ligando director para el que se puede preparar un conjugado enlazador-fármaco. Otros ligandos a modo de ejemplo contemplados en el presente documento incluyen ligandos peptídicos identificados en selección de bibliotecas, péptidos específicos del crecimiento tumoral, aptámeros específicos de células tumorales, carbohidratos específicos de células tumorales, anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de células tumorales, fragmentos Fab o scFv (es decir, región variable de cadena única) de anticuerpos tales como, un fragmento Fab de un anticuerpo dirigido contra EphA2 u otras proteínas expresadas específicamente o a las que solo se puede acceder en células de cáncer metastásico, moléculas orgánicas pequeñas derivadas de bibliotecas combinatorias, factores de crecimiento tales como EGF, FGF, insulina, y factores de crecimiento análogos a la insulina, y polipéptidos homólogos, somatostatina y sus análogos, transferrina, complejos de lipoproteína, sales biliares, selectinas, hormonas esteroides, péptidos que contienen Arg-Gly-Asp, retinoides, varias galectinas, ligandos del receptor opioide δ , ligandos del receptor de colecistocinina A, ligandos específicos de los receptores de la angiotensina AT1 o AT2, ligandos del receptor λ activados por el proliferador de

5 peroxisomas (antibióticos de tipo 3-lactama como penicilina, moléculas orgánicas pequeñas incluyendo fármacos antimicrobianos y otras moléculas que se unen específicamente a un receptor preferentemente expresado sobre la superficie de células tumorales o de un organismo infeccioso, antimicrobianos y otros fármacos diseñados para encajar en el punto de unión de un receptor concreto basado en la estructura cristalina del receptor o de otra proteína de la superficie celular, ligandos de antígenos tumorales u otras moléculas preferentemente expresadas sobre la superficie de células tumorales, o fragmentos de cualquiera de estas moléculas. Un ejemplo de un antígeno tumoral específico que podría actuar como sitio de unión para conjugados de ligando-inmunógeno incluye epítomos extracelulares de un miembro de la familia de proteínas efrinas, tales como EphA2. La expresión de EphA2 está restringida a las uniones célula-célula en células normales, pero EphA2 está distribuido sobre la totalidad de la superficie celular en las células tumorales metastásicas. Así, EphA2 en células metastásicas sería accesible para unirse a, por ejemplo, un fragmento Fab de un anticuerpo conjugado con un inmunógeno, mientras que la proteína no estaría accesible para unirse al fragmento Fab en células normales, dando como resultado un conjugado ligando-inmunógeno específico para las células de cáncer metastásico.

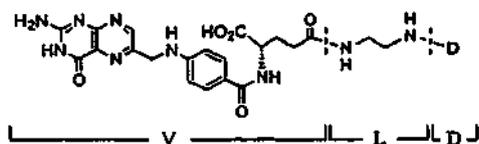
10 Se contempla adicionalmente el uso de combinaciones de conjugados ligando-enlazador-fármaco para maximizar el direccionamiento de las células patógenas para su eliminación.

15 Los conjugados para administración de fármaco a modo de ejemplo son los siguientes:

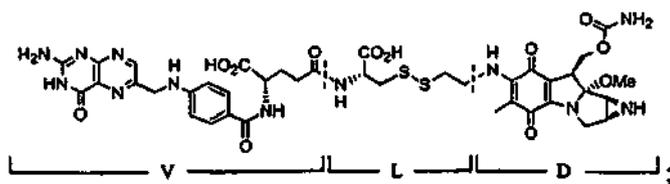
- V-L-D
- V-(I_r)_c-D
- V-(I_s)_a-D
- 20 V-(I_s)_a-(I_r)_c-D
- V-(I_r)_c-(I_s)_a-D
- V-(I_H)_b-(I_r)_d-D
- V-(I_r)_c-(I_H)_b-D
- V-(I_H)_d-(I_r)_c-(I_H)_e-D
- 25 V-(I_s)_a-(I_H)_b-(I_r)_c-D
- V-(I_r)_c-(I_H)_b-(I_s)_a-D
- V-(I_H)_d-(I_s)_a-(I_r)_c-(I_H)_e-D
- V-(I_H)_d-(I_r)_c-(I_s)_a-(I_H)_e-D
- 30 V-(I_H)_d-(I_s)_a-(I_H)_b-(I_r)_c-(I_H)_e-D
- V-(I_s)_a-(I_r)_c-(I_H)_b-D
- V-[(I_s)_a-(I_H)_b]_d-(I_r)_c-(I_H)_e-D

35 en los que a, b, c, d, y e son cada uno independientemente 0, 1, 2, 3, o 4, (I_s) es un enlazador separador, (I_H) es un enlazador de heteroátomo, y (I_r) es un enlazador liberable, V es una vitamina, o análogo o derivado de la misma, y D es un fármaco, o análogo o derivado del mismo, y en los que el L bivalente abarca uno de una variedad de (I_s), (I_H), y (I_r), en cualquier orden y en cualquier combinación. Se entiende que los ejemplos anteriores del enlazador bivalente L están previstos para ilustrar la amplia variedad de montajes de I_H, I_s, y I_r que abarca el enlazador bivalente.

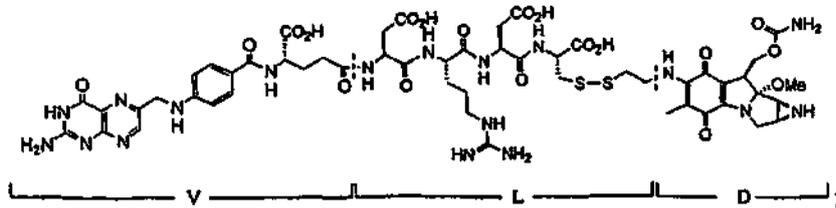
En una realización a modo de ejemplo del conjugado para administrar fármaco V-L-D, en la que V es la vitamina ácido fólico, L no es etilendiamina, de acuerdo con la fórmula:



40 En otra realización a modo de ejemplo del conjugado para administrar fármaco V-L-D, en la que V es la vitamina ácido fólico, y D es el fármaco mitomicina C; L no es L-Cys-(S-tioetilo), de acuerdo con la fórmula:

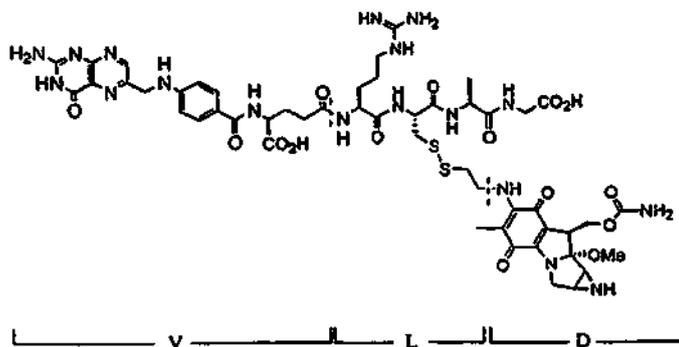


L no es L-Asp-L-Arg-L-Asp- L-Cys-(S-tioetilo), de acuerdo con la fórmula:



y

5 L no es L-Arg-L-Cys-(S-tioetil-L-Ala-L-Gly-OH, de acuerdo con la fórmula:



También se contemplan los conjugados para administración de fármaco en los que la vitamina, o análogo o derivado de la misma, está unida a un enlazador liberable que está unido al fármaco mediante un enlazador separador. Además, tanto el fármaco como la vitamina, o análogo o derivado de la misma, pueden estar cada uno unidos mediante enlazadores separadores, en donde los enlazadores separadores están unidos entre sí mediante un enlazador liberable. Además, tanto el fármaco como la vitamina, o análogo o derivado de la misma, pueden estar cada uno unidos a enlazadores liberables, en donde los enlazadores liberables están unidos entre sí mediante un enlazador separador. El enlazador de heteroátomo puede situarse entre dos enlazadores cualesquiera, o entre cualquier enlazador y la vitamina o análogo o derivado, o entre cualquier enlazador y el fármaco o análogo o derivado. También se contemplan todas las posibles permutaciones y combinaciones.

Una realización a modo de ejemplo proporciona un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas. El conjugado para administrar fármaco consiste en un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), y un fármaco. El resto de unión al receptor de vitamina es una vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, capaz de unirse a receptores de vitamina, y el fármaco incluye análogos o derivados del mismo con actividad farmacológica. La vitamina, o el análogo o el derivado de la misma, está unida covalentemente al enlazador bivalente (L), y el fármaco, o el análogo o el derivado del mismo, también está unido covalentemente al enlazador bivalente (L). El enlazador bivalente (L) comprende uno o más enlazadores separadores, enlazadores liberables, y enlazadores de heteroátomo, y combinaciones de los mismos, en cualquier orden. Por ejemplo, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y el enlazador liberable y el enlazador de heteroátomo se pueden tomar juntos para formar un radical divalente que comprende alquilenziridin-1-ilo, alquilencarbonilaziridin-1-ilo, carbonilalquilaziridin-1-ilo, alquilensulfoxilaziridin-1-ilo, sulfoxilalquilaziridin-1-ilo, sulfonilalquilaziridin-1-ilo, o alquilensulfonilaziridin-1-ilo, en que cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante.

Alternativamente, los enlazadores de heteroátomo pueden ser nitrógeno, oxígeno, azufre, y las fórmulas - (NHR^1NHR^2) -, $-SO-$, $-(SO_2)-$, y $-N(R^3)O-$, en la que R^1 , R^2 , y R^3 se han seleccionado cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, y alcoxilalquilo. En otra realización, el enlazador de heteroátomo puede ser oxígeno, el enlazador separador puede ser 1-alquilensuccinimid-3-ilo, sustituido de forma opcional por un sustituyente X^1 , como se define más adelante, y los enlazadores liberables pueden ser metileno, 1-alcoxilalquilo, 1-alcoxícicloalquilo, 1-alcoxilalquilencarbonilo, 1-alcoxícicloalquilencarbonilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por

un sustituyente X^2 , como se define más adelante, y en donde el enlazador separador y el enlazador liberable están cada uno unidos al enlazador de heteroátomo para formar un acetal o cetal succinimid-1-il-alquilo.

Los enlazadores separadores pueden ser carbonilo, tienocarbonilo, alquileo, cicloalquileo, alquilencicloalquilo, alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-alquilensuccinimid-3-ilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, alquilensulfoxilo, sulfonylalquilo, alquilensulfonylalquilo, carboniltetrahydro-2H-piranilo, carboniltetrahydrofuranilo, 1-(carboniltetrahydro-2H-piranil)succinimid-3-ilo, y 1-(carboniltetrahydrofuranil)succinimid-3-ilo, en donde cada uno de los enlazadores separadores está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^1 , como se define más adelante. En esta realización, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y los enlazadores separadores pueden ser alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en donde cada uno de los enlazadores separadores está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^1 , como se define más adelante, y el enlazador separador está unido al nitrógeno para formar una amida. Alternativamente, el enlazador de heteroátomo puede ser azufre, y los enlazadores separadores pueden ser alquileo y cicloalquileo, en donde cada uno de los enlazadores separadores está sustituido de forma opcional por carboxilo, y el enlazador separador está unido al azufre para formar un tiol. En otra realización, el enlazador de heteroátomo puede ser azufre, y los enlazadores separadores pueden ser 1-alquilensuccinimid-3-ilo y 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, y el enlazador separador está unido al azufre para formar un succinimid-3-iltiol.

Como alternativa a las realizaciones anteriormente descritas, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y el enlazador liberable y el enlazador de heteroátomo se pueden tomar juntos para formar un radical divalente que comprende alquilenaziridin-1-ilo, carbonilalquilaziridin-1-ilo, sulfoxilalquilaziridin-1-ilo, o sulfonylalquilaziridin-1-ilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante. En esta realización alternativa, los enlazadores separadores pueden ser carbonilo, tienocarbonilo, alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en donde cada uno de los enlazadores separadores está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^1 , como se define más adelante, y en donde el enlazador separador está unido a el enlazador liberable para formar una aziridinamida.

Los sustituyentes X^1 pueden ser alquilo, alcoxilo, alcoxialquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, halo, haloalquilo, sulfidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, carboxilo, carboxialquilo, carboxilato de alquilo, alcanoato de alquilo, guanidinalquilo, R^4 -carbonilo, R^5 -carbonilalquilo, R^6 -acilamino, y R^7 -acilaminoalquilo, en las que R^4 y R^5 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos, y péptidos, y en las que R^6 y R^7 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos, y péptidos. En esta realización el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y el sustituyente X^1 y el enlazador de heteroátomo se pueden tomar junto con el enlazador separador al que están unidos para formar un heterociclo.

Los enlazadores liberables pueden ser metileno, 1-alcoxialquileo, 1-alcoxícicloalquileo, 1-alcoxialquilencarbonilo, 1-alcoxícicloalquilencarbonilo, carbonilarilcarbonilo, carbonil(carboxiaril)carbonilo, carbonil(biscarboxiaril)carbonilo, haloalquilencarbonilo, alquilen(dialquilsilil), alquilen(alquilarilsilil), alquilen(diarilsilil), (dialquilsilil)arilo, (alquilarilsilil)arilo, (diarilsilil)arilo, oxicarboniloxilo, oxicarboniloxialquilo, sulfonyloxilo, oxisulfonylalquilo, iminoalquilidenilo, carbonilalquilideniminilo, iminocicloalquilidenilo, carbonilcicloalquilideniminilo, alquilentio, alquilenariltio, y carbonilalquiltio, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante.

En la anterior realización, el enlazador de heteroátomo puede ser oxígeno, y los enlazadores liberables pueden ser metileno, 1-alcoxialquileo, 1-alcoxícicloalquileo, 1-alcoxialquilencarbonilo, y 1-alcoxícicloalquilencarbonilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante, y el enlazador liberable está unido al oxígeno para formar un acetal o cetal. Alternativamente, el enlazador de heteroátomo puede ser oxígeno, y el enlazador liberable puede ser metileno, en donde el metileno está sustituido por un arilo opcionalmente sustituido, y el enlazador liberable está unido al oxígeno para formar un acetal o cetal. Además, el enlazador de heteroátomo puede ser oxígeno, y el enlazador liberable puede ser sulfonylalquilo, y el enlazador liberable está unido al oxígeno para formar un alquilsulfonato.

En otra realización de la anterior realización del enlazador liberable, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y los enlazadores liberables pueden ser iminoalquilidenilo, carbonilalquilideniminilo, iminocicloalquilidenilo, y carbonilcicloalquilideniminilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante, y el enlazador liberable está unido al nitrógeno para formar una hidrazona. En una configuración alternativa, la hidrazona se puede acilar con un derivado de ácido carboxílico, un derivado de ortoformiato o un derivado de carbamoilo para formar varios enlazadores liberables de acilhidrazona.

Alternativamente, el enlazador de heteroátomo puede ser oxígeno, y los enlazadores liberables pueden ser alquilen(dialquilsilil), alquilen(alquilarilsilil), alquilen(diarilsilil), (dialquilsilil)arilo, (alquilarilsilil)arilo, y (diarilsilil)arilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , como se define más adelante, y el enlazador liberable está unido al oxígeno para formar un silanol.

En la realización del enlazador liberable anterior, el fármaco puede incluir un átomo de nitrógeno, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y los enlazadores liberables pueden ser carbonilarilcarbonilo, carbonil(carboxiaril)carbonilo, carbonil(biscarboxiaril)carbonilo, y el enlazador liberable puede estar unido al nitrógeno del heteroátomo para formar una amida, y también unirse al nitrógeno del fármaco para formar una amida.

5 En la realización del enlazador liberable anterior, el fármaco puede incluir un átomo de oxígeno, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y los enlazadores liberables pueden ser carbonilarilcarbonilo, carbonil(carboxiaril)carbonilo, carbonil(biscarboxiaril)carbonilo, y el enlazador liberable puede estar unido al enlazador nitrógeno del heteroátomo para formar para formar una amida, y también unirse al oxígeno del fármaco para formar un éster.

10 Los sustituyentes X^2 pueden ser alquilo, alcoxilo, alcoxialquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, halo, haloalquilo, sulfidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, carboxilo, carboxialquilo, carboxilato de alquilo, alcanoato de alquilo, guanidinalquilo, R^4 -carbonilo, R^5 -carbonilalquilo, R^6 -acilamino, y R^7 -acilamino alquilo, en las que R^4 y R^5 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y en las que R^6 y R^7 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos. En esta realización, el enlazador de heteroátomo puede ser nitrógeno y el sustituyente X^2 y el enlazador de heteroátomo se pueden tomar junto con el enlazador liberable al que están unidos para formar un heterociclo.

20 Los heterociclos pueden ser pirrolidinas, piperidinas, oxazolidinas, isoxazolidinas, tiazolidinas, isotiazolidinas, pirrolidinonas, piperidinonas, oxazolidinonas, isoxazolidinonas, tiazolidinonas, isotiazolidinonas, y succinimidias.

25 El fármaco puede ser mitomicina, un derivado de mitomicina o un análogo de mitomicina y, en esta realización, los enlazadores liberables pueden ser carbonilalquiltio, carboniltetrahydro-2H-pirano, carboniltetrahydrofuranilo, 1-(carboniltetrahydro-2H-pirano)succinimid-3-ilo, y 1-(carboniltetrahydrofuranilo)succinimid-3-ilo, en donde cada uno de los enlazadores liberables está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , y en donde la aziridina de la mitomicina está unida al enlazador liberable para formar una acilaziridina.

El fármaco puede incluir un átomo de nitrógeno y el enlazador liberable puede ser haloalquilencarbonilo, sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , y el enlazador liberable está unido al nitrógeno del fármaco para formar una amida.

30 El fármaco puede incluir un átomo de oxígeno, y el enlazador liberable puede ser haloalquilencarbonilo, sustituido de forma opcional por un sustituyente X^2 , y el enlazador liberable está unido al oxígeno del fármaco para formar un éster.

El fármaco puede incluir un átomo de nitrógeno con un doble enlace y, en esta realización, los enlazadores liberables pueden ser alquilencarbonilamino y 1-(alquilencarbonilamino)succinimid-3-ilo, y el enlazador liberable puede estar unido al nitrógeno del fármaco para formar una hidrazona.

35 El fármaco puede incluir un átomo de azufre y, en esta realización, los enlazadores liberables pueden ser alquiltio y carbonilalquiltio, y el enlazador liberable puede estar unido al azufre del fármaco para formar un disulfuro.

40 La vitamina puede ser folato, que incluye un nitrógeno y, en esta realización, los enlazadores separadores pueden ser alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-alquilensuccinimid-3-ilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en donde cada uno de los enlazadores separadores está sustituido de forma opcional por un sustituyente X^1 , y el enlazador separador está unido al nitrógeno del folato para formar una imida o una alquilamida.

45 En esta realización, los sustituyentes X^1 pueden ser alquilo, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, sulfidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, carboxilo, carboxialquilo, guanidinalquilo, R^4 -carbonilo, R^5 -carbonilalquilo, R^6 -acilamino, y R^7 -acilaminoalquilo, en las que R^4 y R^5 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y en las que R^6 y R^7 se han seleccionado cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos.

El término "alquilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena lineal monovalente de átomos de carbono que puede estar ramificada de forma opcional, tal como metilo, etilo, propilo, y 3-metilpentilo.

50 El término "cicloalquilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena monovalente de átomos de carbono, una parte de la cual forma un anillo, tal como ciclopropilo, ciclohexilo, y 3-etilciclohexilo.

El término "alquilen" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena bivalente lineal de átomos de carbono que puede estar ramificada de forma opcional, tal como metileno, etileno, propileno, y 3-metilpentileno.

El término "cicloalquilen" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena bivalente de átomos

de carbono, una parte de la cual forma un anillo, tal como cicloprop-1,1-diilo, cicloprop-1,2-diilo, ciclohex-1,4-diilo, 3-etilciclopent-1,2-diilo, y 1-metileneciclohex-4-ilo.

5 El término "heterociclo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cadena monovalente de átomos de carbono y heteroátomos, en donde los heteroátomos se han seleccionado entre nitrógeno oxígeno, y azufre, una parte de la cual, incluyendo al menos un átomo heteroátomo, forma un anillo tal como aziridina, pirrolidina, oxazolidina, 3-metoxipirrolidina, y 3-metilpiperazina.

El término "alcoxilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a alquilo como se ha definido en el presente documento combinado con un oxígeno final, tal como metoxilo, etoxilo, propoxilo, y 3-metilpentoxilo.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a fluoro, cloro, bromo, y yodo.

10 El término "arilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anillo aromático mono o policíclico de átomos de carbono tales como fenilo y naftilo.

El término "heteroarilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anillo aromático mono o policíclico de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno oxígeno, y azufre, tal como piridinilo, pirimidinilo, indolilo, y benzoxazolilo.

15 El término "arilo sustituido" o "heteroarilo sustituido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un arilo o heteroarilo sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados como halo, hidroxilo, amino, alquilo o dialquilamino, alcoxilo, alquilsulfonilo, ciano, y nitro .

20 El término "iminoalquilidenilo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un radical divalente que contiene alquileo como se ha definido en el presente documento y un átomo de nitrógeno, en el que el carbono del extremo del alquileo está unido por un doble enlace al átomo de nitrógeno, como en las fórmulas $-(CH)=N-$, $-(CH_2)_2(CH)=N-$, y $-CH_2C(Me)=N-$.

25 El término "aminoácido" tal como se usa en el presente documento se refiere en general a aminoalquilcarboxilatos, en donde el radical alquilo está sustituido de forma opcional por alquilo, hidroxialquilo, sulfidrialquilo, aminoalquilo, carboxialquilo, y similares, incluyendo grupos correspondiente a los aminoácidos naturales tales como serina, cisteína, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico.

El término "arilalquilo" se refiere a arilo como se ha definido en el presente documento sustituido por un grupo alquileo, como se ha definido en el presente documento, tal como bencilo, fenetilo, y α -metilbencilo.

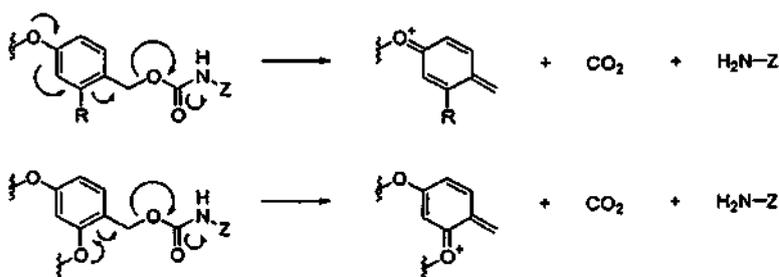
30 Deberá entenderse que los términos anteriormente descritos se pueden combinar para generar grupos químicamente relevantes, tales como "alcoxialquilo" en referencia a metiloximetilo, y etiloxietilo, y "haloalcoxialquilo" en referencia a trifluorometiloxietilo, y 1,2-difluoro-2-cloroet-1-iloxipropilo.

35 El término "derivado de aminoácido" tal como se usa en el presente documento se refiere en general a aminoalquilcarboxilato, en donde el radical amino o el radical carboxilato están cada uno sustituidos de manera opcional por alquilo, carboxialquilo, o alquilamino, o protegidos de manera opcional; y el fragmento de alquilo divalente intermedio está sustituido de forma opcional por alquilo, hidroxialquilo, sulfidrialquilo, aminoalquilo, o carboxialquilo, incluyendo grupos correspondientes a las cadenas secundarias de los aminoácidos naturales, como las que se encuentran en serina, cisteína, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico.

El término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere en general a series de aminoácidos y análogos y derivados de aminoácidos unidos covalentemente entre sí por enlaces amida.

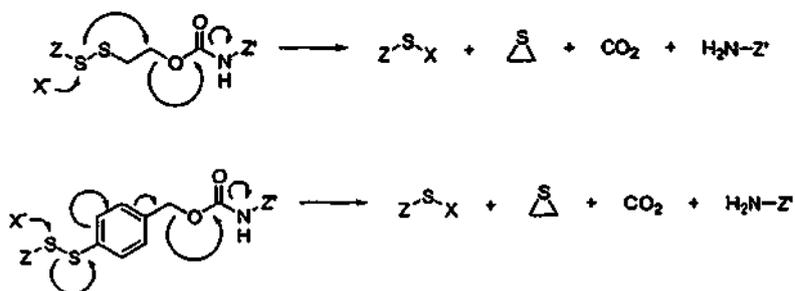
40 El enlazador liberable incluye al menos un enlace que se puede romper o escindir en condiciones fisiológicas (por ejemplo, un enlace lábil frente al pH, lábil frente a ácidos, lábil frente a la oxidación, o lábil frente a enzimas). El enlace o enlaces escindibles pueden estar presentes en el interior de un enlazador que se puede escindir y/o en uno o ambos extremos de un enlazador que se puede escindir. Se apreciará la labilidad del enlace que se puede escindir se puede ajustar incluyendo grupos o fragmentos funcionales dentro del enlazador bivalente L que pueden ayudar o facilitar dicha rotura del enlace, también denominada ayuda anquimérica. Además, se apreciará que se pueden
45 incluir grupos o fragmentos funcionales adicionales dentro del enlazador bivalente L que pueden ayudar o facilitar la rotura del enlace del enlazador liberable.

Los mecanismos ilustrativos de escisión del enlace del enlazador liberable incluyen escisión asistida por oxonio de la siguiente forma:



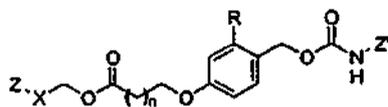
5 en las que Z es la vitamina, o análogo o derivado de la misma, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o cada uno es un resto vitamina, o fármaco junto a otras partes del enlazador bivalente, tal como un resto vitamina o fármaco que incluye uno o más enlazadores separadores, enlazadores de heteroátomo, y/u otros enlazadores liberables. En esta realización, la eliminación catalizada por ácido del carbamato conduce a la liberación de CO₂ y del resto que contiene nitrógeno unido a Z, y la formación de un catión bencilo, que puede quedar atrapado por agua o por otra base de Lewis.

10 Otro mecanismo ilustrativo para escindir enlaces conectados o contenidos entre enlazadores liberables, que pueden formar parte del enlazador bivalente L, incluye los siguientes mecanismos de beta-eliminación y beta-eliminación viníloga:



15 en las que X es un nucleófilo, GSH, glutatión, o un agente bioreductor, y cualquiera de Z o Z' es la vitamina, o análogo o derivado de la misma, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, un resto vitamina, o fármaco junto a otras partes del enlazador bivalente. Se apreciará que la escisión del enlace también se puede producir mediante eliminación catalizada por ácido del resto carbamato que puede estar ayudada anquiméricamente gracias a la estabilización proporcionada tanto por el grupo arilo del azufre en beta, o por el disulfuro mostrado en los ejemplos anteriores. En dichas variaciones de esta realización, el enlazador liberable es el resto carbamato.

20 Otro mecanismo ilustrativo implica una reordenación de los enlazadores liberables, separadores y de heteroátomo de manera que posteriormente a la escisión de un enlace en el enlazador bivalente, la liberación de los grupos funcionales ayude químicamente a la rotura o escisión de enlaces adicionales, denominado también escisión o rotura con ayuda anquimérica. Una realización a modo de ejemplo de dicho enlazador bivalente o parte del mismo incluye compuestos que tienen la fórmula:



25 en la que X es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno, o azufre, n es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, y 3, R es hidrógeno, o un sustituyente, incluyendo un sustituyente capaz de estabilidad una carga positiva inductivamente o por resonancia del anillo de arilo, tal como alcoxilo, y cualquiera de Z o Z' es la vitamina, o análogo o derivado de la misma, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o un resto vitamina, o fármaco junto a otras partes del enlazador bivalente. Se apreciará que otros sustituyentes puedan estar presentes en el anillo de arilo, el carbono bencílico, el nitrógeno del carbamato, el ácido alcanoico o el puente de metileno, incluyendo hidroxilo, alquilo, alcoxilo, alquiltio, y holo. La escisión ayudada puede incluir mecanismos que implican intermedios de bencilio, intermedios de bencino, ciclación de lactona, intermedios de oxonio, y beta-eliminación. Se apreciará adicionalmente que, además de la fragmentación posterior a la escisión del enlazador liberable, la escisión inicial del enlazador liberable puede verse facilitada por un mecanismo de ayuda anquimérica.

35 En esta realización, el ácido hidroxialcanoico, que puede ciclar, facilita la escisión del puente metileno, mediante por ejemplo un ion oxonio, y facilita la escisión del enlace o la fragmentación posterior tras la escisión del enlazador liberable. Alternativamente, la escisión catalizada por ácido ayudada por el ion oxonio del puente de metileno puede dar lugar a una cascada de fragmentación de este enlazador bivalente a modo de ejemplo, o fragmento del mismo. Alternativamente, la hidrólisis catalizada por ácido del carbamato puede facilitar la beta-eliminación del ácido

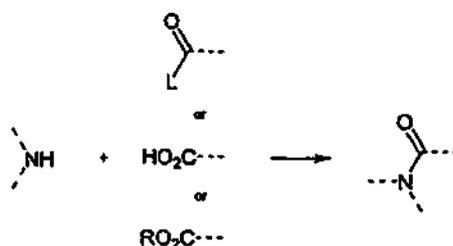
hidroxialcanoico, que puede ciclar, y facilitar la escisión del puente metileno, por ejemplo, mediante un ion oxonio. Se apreciará que otros mecanismos químicos de rotura o escisión del enlace en condiciones metabólicas, fisiológicas o celulares descritos en el presente documento pueden iniciar una cascada de fragmentación de ese tipo. Se apreciará que otros mecanismos químicos de rotura o escisión del enlace en condiciones metabólicas, fisiológicas o celulares descritos en el presente documento pueden iniciar una cascada de fragmentación de ese tipo.

Los conjugados para administración de fármaco descritos en el presente documento se pueden preparar mediante procedimientos sintéticos conocidos en la técnica. Los procedimientos sintéticos se han escogido dependiendo de la selección de los enlazadores de heteroátomo, y los grupos funcionales presentes en los enlazadores separadores y los enlazadores liberables. En general, las reacciones relevantes para formación del enlace se han descrito en Richard C. Larock, "Comprehensive Organic Transformations, a guide to functional group preparations", VCH Publishers, Inc. Nueva York (1989), y en Theodora E. Greene & Peter G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1991).

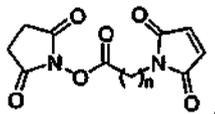
Formación general de ésteres y amidas.

Por ejemplo, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de nitrógeno y el grupo funcional del extremo presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un grupo carbonilo, el grupo amida necesario se puede obtener mediante reacciones de acoplamiento o reacciones de acilación del correspondiente ácido carboxílico o derivado, en la que L es un grupo saliente adecuadamente elegido tal como halo, triflato, pentafluorofenoxilo, trimetilsililoxilo, succinimida-*N*-oxilo, y un amina, como se ilustra en el Esquema 1.

Esquema 1



Los reactivos de acoplamiento incluyen DCC, EDC, RRDQ, CGI, HBTU, TBTU, HOBT/DCC, HOBT/EDC, BOP-Cl, PyBOP, y PyBroP. Alternativamente, el ácido progenitor se puede convertir en un derivado carbonilo activado, como un cloruro de ácido, un éster de *N*-hidroxisuccinimidilo y un éster de pentafluorofenilo. La reacción de formación de amida también se puede llevar a cabo en presencia de una base, tal como trietilamina, diisopropiltilamina, y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina. Los solventes adecuados para formar amidas descritos en el presente documento incluyen CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF. Los solventes adecuados para formar amidas descritos en el presente documento incluyen CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF, DMF, DMSO, acetonitrilo, y EtOAc. A modo de ejemplo, las amidas se pueden preparar a temperaturas en el intervalo entre aproximadamente -15°C a aproximadamente 80°C , o entre aproximadamente 0°C a aproximadamente 45°C . Las amidas se pueden formar a partir de, por ejemplo, anillos de aziridina que contienen nitrógeno, carbohidratos, y ácidos carboxílicos α -halogenados. Los derivados de ácido carboxílico a modo de ejemplo de utilidad para formar amidas incluyen compuestos que tienen la fórmula:



en la que *n* es un número entero tal como 1, 2, 3, o 4.

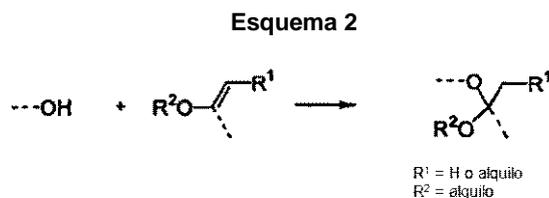
De manera similar, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno y el grupo funcional del extremo presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un grupo carbonilo, el grupo éster requerido se puede obtener mediante reacciones de acoplamiento del correspondiente ácido carboxílico o derivado, y un alcohol.

Los reactivos de acoplamiento incluyen DCC, EDC, CDI, BOP, PyBOP, cloroformiato de isopropenilo, EEDQ, DBAD, y PPh_3 . Los solventes incluyen CH_2Cl_2 , CHCl_3 , THF, DMF, DMSO, acetonitrilo, y EtOAc. Las bases incluyen trietilamina, diisopropiltilamina, y *N,N*-dimetil-4-aminopiridina. Alternativamente, el ácido progenitor se puede convertir en un derivado carbonilo activado, como un cloruro de ácido, un éster de *N*-hidroxisuccinimidilo y un éster de pentafluorofenilo.

Formación general de cetales y acetales.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es 1-alcoxilalquilo, el grupo cetal o acetal necesario se puede formar mediante reacciones de formación de cetales y acetales de los correspondientes alcoholes y un enol éter, como se ilustra en el

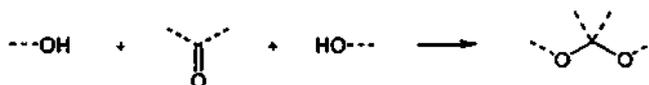
Esquema 2.



Los solventes incluyen alcoholes, CH₂Cl₂, CHCl₃, THF, dietil éter, DMF, DMSO, acetonitrilo, y EtOAc. La formación de dichos cetales y acetales se puede llevar a cabo con catálisis ácida. Si el enlazador de heteroátomo comprende dos átomos de oxígeno, y el enlazador liberable es metileno, sustituido de manera opcional por un grupo X² como se ha descrito en el presente documento, el grupo acetal o cetal simétrico necesario se puede formar a modo de ejemplo mediante reacciones de formación de cetales y acetales a partir de los correspondientes alcoholes y un aldehído o cetona, como se ilustra en el Esquema 3.

5

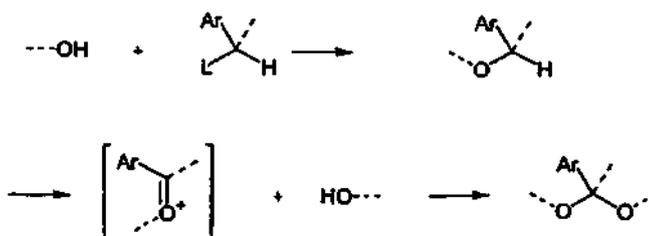
Esquema 3



Alternativamente, si el metileno se ha sustituido por un grupo arilo sustituido de manera opcional, el acetal o cetal necesario se puede preparar por etapas, en la que L es un grupo saliente adecuadamente seleccionado como halo, trifluoroacetoxilo, y triflato, como se ilustra en el Esquema 4. El procedimiento ilustrado en el Esquema 4 es una preparación convencional, y sigue en general el procedimiento revisado por R. R. Schmidt y col., Chem. Rev., 2000, 100, 4423-42.

15

Esquema 4



El arilalquilo resultante se trata con un agente oxidante, como DDQ, para generar un intermedio de oxonio que posteriormente se trata con otro alcohol para generar el acetal o cetal.

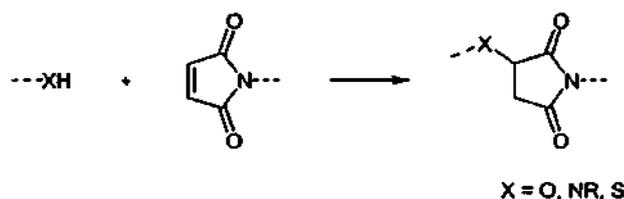
20

Formación general de succinimidas

Además, si el enlazador de heteroátomo es, por ejemplo, un átomo de nitrógeno, oxígeno, o azufre, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un derivado de succinimida, el enlace carbono-heteroátomo resultante se puede formar por una adición de Michael de la correspondiente amina, alcohol, o tiol, y un derivado de maleimida, en la que X es el enlazador de heteroátomo, como se ilustra en el Esquema 5.

25

Esquema 5



Los solventes para llevar a cabo la adición de Michael incluyen TBF, EtOAc, CH₂Cl₂, DMF, DMSO, y H₂O. La formación de estos aductos de Michael se puede llevar a cabo mediante la adición de cantidades equimolares de bases, tales como trietilamina, base de Hünig, o ajustando el pH de las soluciones acuosas a 6,0 – 7,4. Se apreciará que si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno o de nitrógeno, las condiciones de la reacción se pueden ajustar para facilitar la adición de Michael, tal como, por ejemplo, usando temperaturas de reacción más elevadas, añadiendo catalizadores, usando solventes más polares tales como DMF, o DMSO, y activando la maleimida con agentes sililantes.

30

Formación general de sililoxilos.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un derivado de sililo, el grupo sililoxilo necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente derivado de sililo con un alcohol, en la que L es un grupo saliente adecuadamente

5

Esquema 6



Los derivados de sililo incluyen derivados de sililo adecuadamente funcionalizados tales como vinilsulfonoalquil diarilo, o diarilo, o cloruro de alquil aril sililo. En lugar de un grupo vinilsulfonoalquilo, se puede usar un precursor β -cloroetilsulfonoalquilo. Cualquier solvente aprótico anhidro y cualquier base que contenga nitrógeno pueden servir como medio de reacción. El intervalo de temperatura usado en esta transformación puede variar entre -78°C y 80°C .

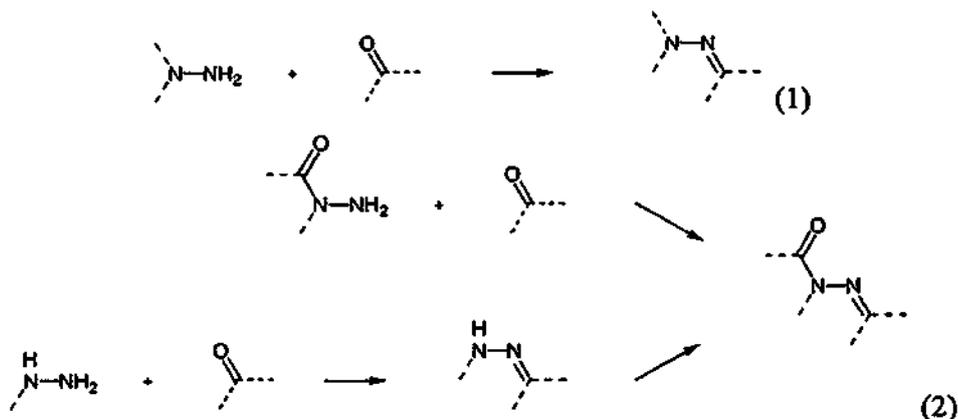
10

Formación general de hidrazonas.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de nitrógeno, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un derivado de iminilo, el grupo hidrazona necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente aldehído o cetona, y una hidrazina o derivado de acilhidrazina, como se ilustra en el Esquema 7, ecuaciones (1) y (2).

15

Esquema 7



Los solventes que se pueden usar incluyen THF, EtOAc, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , DMF, DMSO, y MeOH. El intervalo de temperatura utilizado en esta transformación varía entre 0°C y 80°C . Se puede usar cualquier catalizador ácido tal como ácido mineral, H_3CCOOH , F_3CCOOH , $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, y p -toluensulfonato de piridinio. En el caso de la acilhidrazona de la ecuación (2), la acilhidrazona se puede preparar acilando inicialmente hidrazina con un ácido carboxílico adecuado, o un derivado, como se ha descrito en general anteriormente en el Esquema 1, y posteriormente haciendo reaccionar la acilhidrazida con el correspondiente aldehído o cetona para formar la acilhidrazona. Alternativamente, la funcionalidad hidrazona puede formarse inicialmente haciendo reaccionar hidrazina con el correspondiente aldehído o cetona. La hidrazona resultante se puede acilar a continuación con un ácido carboxílico adecuado, o derivado, como se ha descrito en general adicionalmente en el Esquema 1.

20

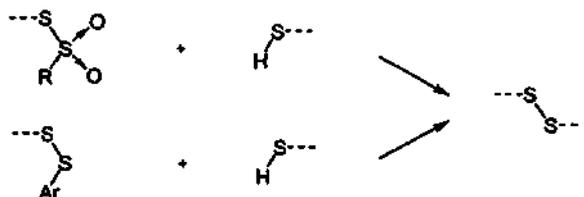
25

Formación general de disulfuros.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de azufre, y el grupo funcional presente en el enlazador liberable es un derivado de alquientiol, el grupo disulfuro necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente derivado de alquilsulfoniltioalquilo o arilsulfoniltioalquilo, o el correspondiente derivado de heteroarilditioalquilo tal como un derivado de piridin-2-ilditioalquilo con un derivado de alquientiol, como se ilustra en el Esquema 8.

30

Esquema 8



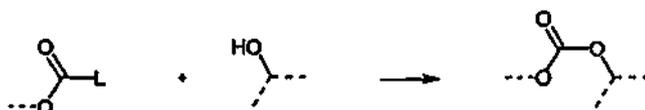
Los solventes que se pueden usar son THF, EtOAc, CH₂Cl₂, CHCl₃, CCl₄, DMF, y DMSO. El intervalo de temperatura empleado en esta transformación puede variar entre 0°C y 80°C. El derivado de alquilsulfonilalquilo o arilsulfonilalquilo necesario se puede preparar usando protocolos conocidos en la técnica, y también de acuerdo con el procedimiento de Ranasinghe y Fuchs, Synth. Commun. 18(3), 227-32 (1988).

Otros procedimientos para preparar disulfuros de dialquilo asimétricos se basan en una transtiolación de disulfuros de heteroarilalquilo asimétricos tales como 2-tiopiridinilo, 3-nitro-2-tiopiridinilo, y disulfuros similares, con alquil tiol, tal como se ha descrito en el documento WO 88/01622, Solicitud de patente europea con N°. 0116208A1, y patente de los Estados Unidos con N°. 4.691.024.

Formación general de carbonatos.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un derivado de alcocarbonilo, el grupo carbonato necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente compuesto hidroxilado con un derivado de alcocarbonilo activado en la que L es un grupo saliente adecuado, como se ilustra en el Esquema 9.

Esquema 9

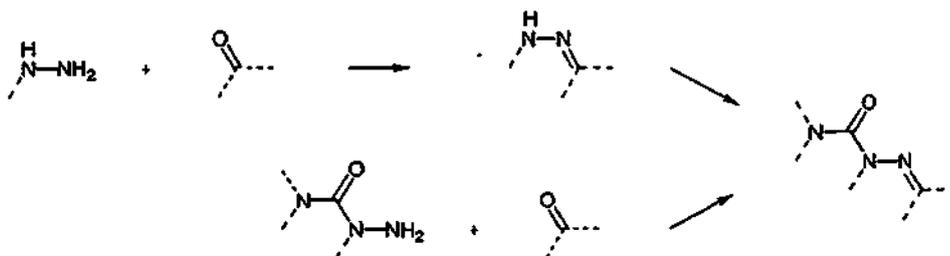


Los solventes que se pueden usar son THF, EtOAc, CH₂Cl₂, CHCl₃, CCl₄, DMF, y DMSO. El intervalo de temperatura utilizado en esta transformación puede variar entre 0°C y 80°C. Para facilitar la reacción, se puede usar cualquier catalizador básico, tal como una base inorgánica, una base aminada, y una base de unión a polímero.

Formación general de semicarbazonas.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de nitrógeno, y el grupo funcional presente en un enlazador separador o el otro enlazador liberable es un derivado de iminilo, y el grupo funcional presente en el otro enlazador separador o el otro enlazador liberable es un derivado de alquilamino o arilaminocarbonilo, el grupo semicarbazona necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente aldehído o cetona, y un derivado de semicarbazida, como se ilustra en el Esquema 10.

Esquema 10

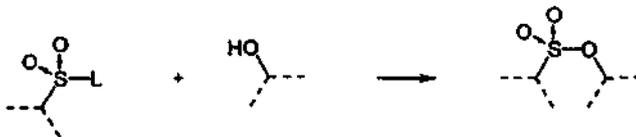


Los solventes que se pueden usar son THF, EtOAc, CH₂Cl₂, CHCl₃, CCl₄, DMF, DMSO, y MeOH. El intervalo de temperatura utilizado en esta transformación puede variar entre 0°C y 80°C. Se puede usar cualquier catalizador ácido tal como ácido mineral, H₃CCOOH, F₃CCOOH, *p*-TsOH·H₂O, y *p*-toluensulfonato de piridinio. Además, para formar la semicarbazona, la funcionalidad hidrazona se puede formar inicialmente haciendo reaccionar hidrazina con el correspondiente aldehído o cetona. La hidrazona resultante se puede acilar a continuación con un isocianato o un derivado de carbamoilo tal como un haluro de carbamoilo, para formar la semicarbazona. Alternativamente, la correspondiente semicarbazida se puede formar haciendo reaccionar hidrazina con un derivado de isocianato o de carbamoilo, tal como un haluro de carbamoilo para formar una semicarbazida. Posteriormente, la semicarbazida se puede hacer reaccionar con el correspondiente aldehído o cetona para formar la semicarbazona.

Formación general de sulfonatos.

Además, si el enlazador de heteroátomo es un átomo de oxígeno, y el grupo funcional presente en el enlazador separador o el enlazador liberable es un derivado de sulfonilo, el grupo sulfonato necesario se puede formar haciendo reaccionar el correspondiente compuesto hidroxisustituido con un derivado de sulfonilo activado en el que L es un grupo saliente adecuado tal como halo, como se ilustra en el Esquema 11.

Esquema 11



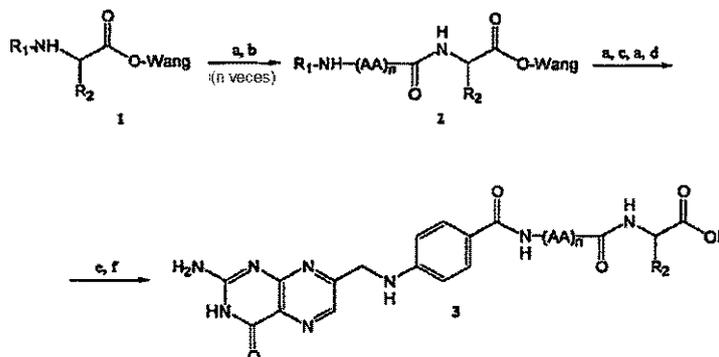
Los solventes que se pueden usar son THF, EtOAc, CH₂Cl₂, CHCl₃, y CCl₄.

El intervalo de temperatura utilizado en esta transformación puede variar entre 0°C y 80°C. Se puede usar cualquier catalizador básico, como una base inorgánica, una base aminada y una base de unión a polímero para facilitar la reacción.

Formación general de péptidos de folato.

El fragmento de peptídico que contiene folato Pte-Glu-(AA)_n-NH(CHR₂)CO₂H (1) se prepara mediante un enfoque secuencial soportado por polímero usando procedimientos convencionales, tal como la estrategia Fmoc sobre resinas Fmoc-AA-Wang (2), sensibles a ácidos, como se muestra en el Esquema 12.

Esquema 12



(a) piperidina/DMF al 20%; (b) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF;

(c) Fmoc- Glu(O- t-Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (d) 1. N¹⁰(TFA)-Pte-OH; PyBop, DIPEA, DMSO; (e) TFAA, (CH₂SH)₂, *i*-Pr₃SiH; (f) NH₄OH, pH 10,3.

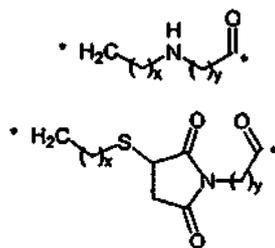
En esta realización a modo de ejemplo de los procedimientos descritos en el presente documento, R₁ es Fmoc, R₂ es la cadena secundaria adecuadamente protegida del aminoácido deseado, y DIPEA es diisopropilietilamina. Se usan procedimientos de acoplamiento normalizados, tales como PyBOP y otros descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, en donde el agente de acoplamiento se aplica a modo de ejemplo como reactivo activante para garantizar un acoplamiento suficiente. El Fmoc que protege los grupos se elimina después de cada etapa de acoplamiento en condiciones normalizadas, tales como mediante tratamiento con piperidina, y fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF),

.Se usan bloques de construcción de aminoácidos adecuadamente protegidos, tales como Fmoc-Glu-OtBu, y N¹⁰-TFA-Pte-OH, tal como se ha descrito en el Esquema 12, y se ha representado en la etapa (b) mediante Fmoc-AA-OH. Así, AA se refiere a cualquier material de partida de aminoácido que esté adecuadamente protegido. Se entenderá que está previsto que el término aminoácido tal como se usa en el presente documento se refiera a cualquier reactivo que tenga un grupo funcional de amina y ácido carboxílico separado por uno o más carbonos, e incluye los alfa y beta aminoácidos naturales, así como derivados y análogos de dichos aminoácidos. En particular, los aminoácidos que tienen cadenas secundarias que están protegidos, tales como serina, treonina, cisteína y aspartato, también se pueden usar en la síntesis de los péptidos de folato descrita en el presente documento. Además, también se pueden incluir aminoácidos homólogos gamma, delta, o más largos como materiales de partidas en la síntesis de los péptidos de folato descrita en el presente documento. Además, los análogos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias homólogas, o estructuras ramificadas alternativas, tales como norleucina, isovalina, β-metil treonina, β-metil cisteína, y β,β-dimetil cisteína también se puede incluir como

materiales de partida en la síntesis de los péptidos de folato descrita en el presente documento.

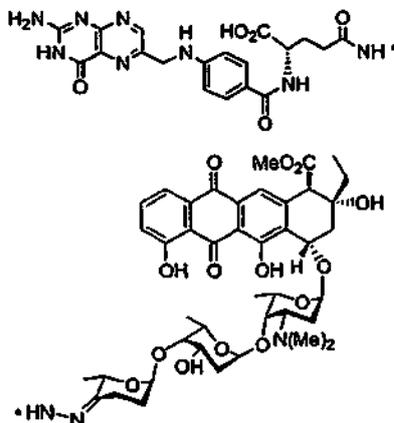
La secuencia de acoplamiento (etapas (a) y (b)) que implica Fmoc-AA-OH se realiza "n" veces para preparar el péptido 2 en soporte sólido, en donde n es un número entero y puede ser igual a 0 a aproximadamente 100. Tras la última etapa de acoplamiento, el grupo Fmoc remanente se elimina (etapa (a)), y el péptido se acopla secuencialmente con un derivado de glutamato (etapa (c)), se desprotege y se acopla a ácido pterico protegido con TFA (etapa (d)). Posteriormente, el péptido se escinde del soporte polimérico después de un tratamiento con ácido trifluoroacético, etanodiol y triisopropilsilano (etapa (e)). Estas condiciones de reacción dan como resultado la eliminación simultánea de los grupos protectores t-Bu, t-Boc, y Trt que pueden formar parte de la cadena secundaria del aminoácido adecuadamente protegida. El grupo protector TFA se elimina mediante el tratamiento con base (etapa (f)) para dar el fragmento 3 de peptidilo que contiene folato.

Los enlazadores separadores y liberables, y los enlazadores de heteroátomo se pueden combinar de diferentes formas. A modo de ejemplo, los enlazadores están unidos entre sí de manera diferente a un enlazador de heteroátomo, tal como alquilen-amino-alquilencarbonilo, y alquilen-tio-carbonilalquilsuccinimid-3-ilo, como se ilustra adicionalmente por las siguientes fórmulas, en las que los números enteros x e y son 1, 2, 3, 4, o 5:



Otra realización a modo de ejemplo de los enlazadores descritos en el presente documento, incluye enlazadores liberables que se escinden en las condiciones descritas en el presente documento mediante un mecanismo químico que implica la beta eliminación. En un aspecto, dichos enlazadores liberables incluyen ácidos carboxílicos sustituidos en beta-tio, beta-hidroxilo, y beta-amino y derivados de los mismos, tales como ésteres, amidas, carbonatos, carbamatos, y ureas. En otro aspecto, dichos enlazadores liberables incluyen ésteres de 2-tio-arilo y 4-tio-arilo, carbamatos, y carbonatos.

Además, la unión de la vitamina o el fármaco al fármaco enlazador de heteroátomo se puede llevar a cabo mediante un grupo funcional reactivo presente en el fármaco o vitamina que se ha convertido en un enlazador de heteroátomo, tal como mediante conversión de la aclamicincetona en la correspondiente hidrazona, y la conversión del ácido fólico en la correspondiente amida, como se muestra en la siguiente fórmula:



El enlazador bivalente (L) comprende uno o más componentes seleccionados entre enlazadores separadores, enlazadores liberables, enlazadores de heteroátomo, y combinaciones de los mismos en cualquier orden. Por ejemplo, se contemplan los enlazadores separadores, enlazadores liberables, y enlazadores de heteroátomo, y combinaciones de los mismos, mostrados en las Tablas 1 y 2.

Los asteriscos presentes en las siguientes estructuras, así como los mostrados en las Tablas 1 y 2, identifican puntos de unión a modo de ejemplo para enlazadores separadores, liberables o de heteroátomo adicionales, o para el componente de fármaco o de vitamina del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas. Se entenderá que el enlazador bivalente L comprende uno o más enlazadores separadores, enlazadores liberables, y enlazadores de heteroátomo, incluyendo los mostrados en las Tablas 1 y 2, y dichos enlazadores separadores, enlazadores liberables, y enlazadores de heteroátomo se pueden combinar en cualquier orden para formar el enlazador bivalente L.

Tabla 1. Enlazadores contemplados a modo de ejemplo, y combinaciones de algunos enlazadores separadores y de heteroátomo.

(continuación)

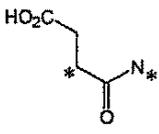
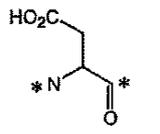
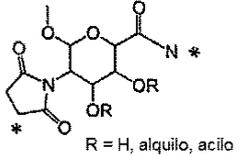
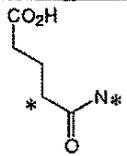
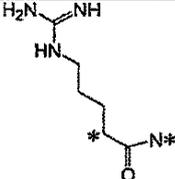
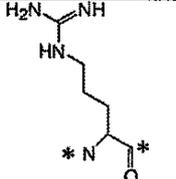
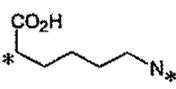
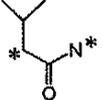
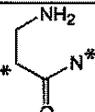
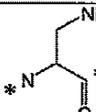
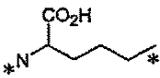
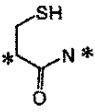
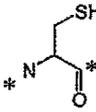
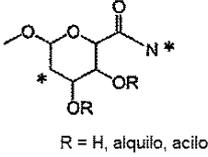
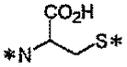
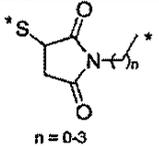
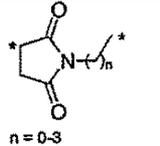
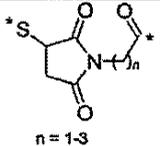
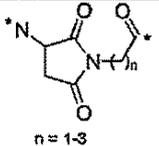
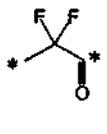
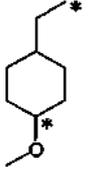
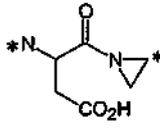
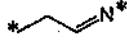
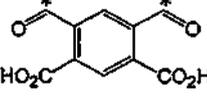
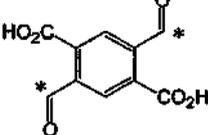
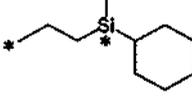
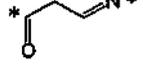
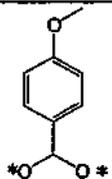
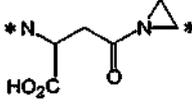
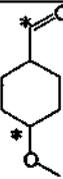
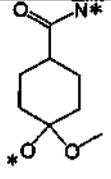
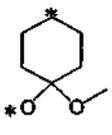
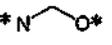
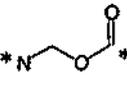
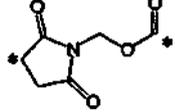
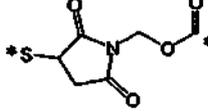
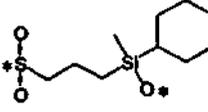
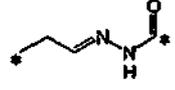
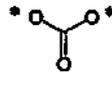
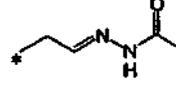
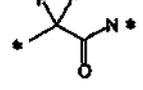
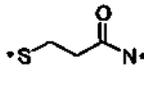
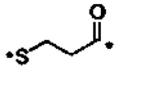
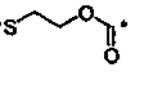
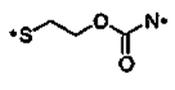
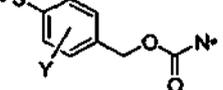
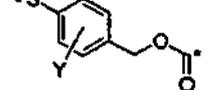
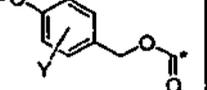
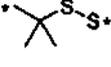
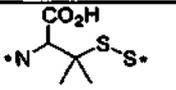
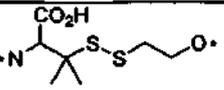
			
			
			
			
			

Tabla 2. Enlazadores contemplados a modo de ejemplo, y combinaciones de algunos enlazadores liberables y de heteroátomo.

- 5 Los conjugados para administración de fármaco también se pueden preparar a partir de intermedios. En una realización a modo de ejemplo, se puede preparar un compuesto de la fórmula:



en la que Z^1 es un electrófilo, nucleófilo o un precursor, adecuado para facilitar la unión del fármaco, o análogo o derivado del mismo.

- 10 En un aspecto, Z^1 puede ser un grupo saliente que permite la unión del fármaco mediante un resto nucleófilo presente en el fármaco, o análogo o derivado del mismo, tal como un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno.

En otro aspecto, Z^1 puede ser un nucleófilo tal como un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno capaz de desplazar un grupo saliente presente en el fármaco, o análogo o derivado del mismo, tal como un derivado de ácido carboxílico,

por ejemplo, un cloruro de ácido.

En otro aspecto, Z^1 puede ser un precursor, tal como un grupo nitro capaz de transformarse en un nitrógeno nucleófilo mediante una reacción de reducción, o bien un éster capaz de transformarse en un cloruro de ácido electrófilo mediante hidrólisis y cloración secuencial. Se apreciará que Z^1 puede ser un enlazador de heteroátomo.

- 5 En otra realización a modo de ejemplo, los conjugados para administración de fármaco se pueden preparar a partir de intermedios como los siguientes:



en la que Z^1 es un electrófilo, nucleófilo o un precursor, adecuado para facilitar la unión de la vitamina, o análogo o derivado de la misma.

- 10 En un aspecto, Z^1 puede ser un grupo saliente que permite la unión de la vitamina mediante un resto nucleófilo presente en la vitamina, o análogo o derivado de la misma, tal como un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno.

En otro aspecto, Z^1 puede ser un nucleófilo tal como un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno capaz de desplazar un grupo saliente presente en la vitamina, o análogo o derivado de la misma, tal como un derivado de ácido carboxílico, por ejemplo, un cloruro de ácido.

- 15 En otro aspecto, Z^1 puede ser un precursor, tal como un grupo nitro capaz de transformarse en un nitrógeno nucleófilo mediante una reacción de reducción, o bien un éster capaz de transformarse en un cloruro de ácido electrófilo mediante hidrólisis y cloración secuencial. Se apreciará que Z^1 puede ser un enlazador de heteroátomo.

- 20 En otra realización a modo de ejemplo, el enlazador bivalente (L) se puede sintetizar de forma independiente, y posteriormente unirse a la vitamina y el fármaco en etapas posteriores, tal como preparando como intermedio un compuesto de la fórmula:



en la que Z^1 y Z^2 se han seleccionado cada uno independientemente y son como se ha definido anteriormente.

- 25 Los conjugados para administración de fármaco se pueden usar tanto en medicina clínica humana como en aplicaciones veterinarias. Así, el animal hospedador que alberga la población de células patógenas y que se trata con los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas puede ser un ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o salvaje. Los conjugados se pueden aplicar a animales hospedadores incluyendo seres humanos, animales de laboratorio tales como roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, etc.), conejos, monos, chimpancés, animales domésticos tales como perros, gatos, y conejos, animales agrícolas tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras y animales salvajes en cautividad tales como osos, pandas, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines y ballenas.

Lo anterior incluye la aplicación a poblaciones de células patógenas que pueden causar diferentes patologías en dichos animales hospedadores.

- 35 "Células patógenas" significa células cancerosas, agentes infecciosos como bacterias y virus, células infectadas con bacterias y virus, macrófagos activos capaces de causar un estado patológico, y cualquier otro tipo de células patógenas que expresen de forma única, preferentemente expresen o expresen en exceso receptores de vitamina o receptores que se unen a análogos o derivados de vitaminas. Las células patógenas también pueden incluir cualquier célula que cause un estado patológico para el que el tratamiento con los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas dé como resultado una reducción en los síntomas de la dolencia. Por ejemplo, las células patógenas pueden ser células hospedadoras que sean patógenas en determinadas circunstancias tales como las células del sistema inmune que son responsables de la enfermedad injerto contra hospedador, pero que no sean patógenas en otras circunstancias.

- 45 De esta manera, la población de células patógenas puede ser una población de células cancerosas que sea tumorigénica, incluyendo tumores benignos y tumores malignos, o que sea no tumorigénica. La población de células cancerosas puede surgir de forma espontánea o debido a procesos como mutaciones presentes en la línea germinal del animal hospedador o bien mutaciones somáticas, o se puede inducir, químicamente, viralmente o por radiación. Los conjugados se pueden utilizar para tratar cánceres tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, enfermedad de Hodgkin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos, leucemias y mielomas. La población de células cancerosas puede incluir cáncer oral, de tiroides, endocrino, de la piel, gástrico, esofágico, laríngeo, pancreático, de colon, de vejiga, óseo, ovárico, cervical, uterino, de mama, testicular, prostático, rectal, de riñón, de hígado y de pulmón.

En realizaciones en las que la población de células patógenas es una población de células cancerosas, el efecto de la administración del conjugado es una respuesta terapéutica medida por la reducción o eliminación de la masa tumoral, o la inhibición de la proliferación de células tumorales. En el caso de un tumor, la eliminación puede ser una

eliminación de las células del tumor primario o de células que hayan sufrido metástasis o estén en proceso de separarse del tumor primario. También se contempla el uso profiláctico del conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas para evitar el regreso del tumor tras su eliminación por cualquier enfoque terapéutico incluyendo eliminación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia o tratamiento con agentes biológicos. El uso
 5 profiláctico puede ser el uso inicial del conjugado para administrar fármaco, tal como un uso en una pauta terapéutica multidosis diaria, y/o puede ser un uso o serie de usos adicional tras un intervalo de días o meses tras el tratamiento o tratamientos iniciales. De acuerdo con esto, la eliminación de cualquiera de las poblaciones de células patógenas en respuesta al uso de acuerdo con la presente invención incluye la reducción en el número de células patógenas, inhibición de la proliferación de células patógenas, un tratamiento profiláctico que evite el regreso de
 10 células patógenas, o una respuesta al uso en células patógenas que de como resultado una reducción en los síntomas de la dolencia.

En los casos en que se van a eliminar células cancerosas, los conjugados se pueden usar junto con la eliminación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia o tratamiento con agentes biológicos tales como otras inmunoterapias incluyendo tratamiento con anticuerpos monoclonales, tratamiento con agentes inmunomoduladores,
 15 transferencia adoptiva de células efectoras inmunes, tratamiento con factores del crecimiento hematopoyético, citocinas y vacunación.

Los conjugados también se pueden aplicar a poblaciones de células patógenas que causan una variedad de dolencias infecciosas. Por ejemplo, los conjugados se pueden aplicar a este tipo de poblaciones de células patógenas tales como bacterias, hongos, incluyendo levaduras, virus, células infectadas con virus, micoplasma, y
 20 parásitos. Los organismos infecciosos que se pueden tratar con los conjugados para administración de fármaco son cualesquiera organismos infecciosos conocidos en la técnica por causar patogénesis en un animal, incluyendo organismos tales como bacterias que sean cocos o bacilos gram-negativos o gram-positivos. Por ejemplo, especies de Proteus, especies de Klebsiella, especies de Providencia, especies de Yersinia, especies de Erwinia, especies de Enterobacter, especies de Salmonella, especies de Serratia, especies de Aerobacter, especies de Escherichia, especies de Pseudomonas, especies de Shigella, especies de Vibrio, especies de Aeromonas, especies de Campilobacter, especies de Streptococcus, especies de Staphylococcus, especies de Lactobacillus, especies de Micrococcus, especies de Moraxella, especies de Bacillus, especies de Clostridium, especies de Corynebacterium, especies de Eberthella, especies de Micrococcus, especies de Mycobacterium, especies de Neisseria, especies de Haemophilus, especies de Bacteroides, especies de Listeria, especies de Erysipelothrix, especies de Acinetobacter,
 25 especies de Brucella, especies de Pasteurella, especies de Vibrio, especies de Flavobacterium, especies de Fusobacterium, especies de Streptobacillus, especies de Calymmatobacterium, especies de Legionella, especies de Treponema, especies de Borrelia, especies de Leptospira, especies de Actinomyces, especies de Nocardia, especies de Rickettsia, y cualquier otra especie bacteriana que produzca una dolencia en un hospedador que se puede tratar con los conjugados para administración de fármaco.

De particular interés son las bacterias que son resistentes a antibióticos como las especies de Streptococcus y las especies de Staphylococcus resistentes a antibióticos, o las bacterias que sean susceptibles a antibióticos pero que causen infecciones recurrentes tratadas con antibióticos de forma que los organismos puedan eventualmente desarrollar resistencia. Las bacterias que son susceptibles a antibióticos pero que causan infecciones recurrentes tratadas con antibióticos de forma que los organismos puedan eventualmente desarrollar resistencia se pueden
 35 tratar con los conjugados para administración de fármaco en ausencia de antibióticos, o combinados con dosis inferiores de antibióticos de las que se administrarían normalmente a un paciente, para evitar el desarrollo de estas cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

También se pueden tratar virus, tales como virus de ADN y ARN. Estos virus incluyen virus de ADN tales como virus del papiloma, parvovirus, adenovirus, herpesvirus y virus vaccinia, y virus de ARN tales como arena-virus, coronavirus, rinovirus, virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, picornavirus, paramixovirus, reovirus, retrovirus,
 45 lentivirus, y rhabdovirus.

Los conjugados también se pueden aplicar a cualquier hongo, incluyendo levaduras, especies de micoplasma, parásitos, u otros organismos infecciosos que puedan causar una dolencia en animales. Ejemplos de hongos que se pueden tratar con la metodología y composiciones incluyen hongos que crecen como mohos o son de tipo levadura,
 50 incluyendo, por ejemplo, hongos que producen dolencias tales como dermatofitosis, histoplasmosis, blastomicosis, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, mucormicosis, cromoblastomicosis, dermatofitosis, prototecosis, fusariosis, pitiriasis, micetoma, paracoccidioidomicosis, feohifomicosis, pseudallesqueriasis, esporotricosis, tricosporosis, infección por neumocistos, y candidiasis.

Los conjugados también se pueden utilizar para tratar infecciones parasíticas incluyendo infecciones causadas por cestodos, tales como especies de Taenia, Hymenolepsis, Diphyllbothrium, y Echinococcus, trematodos, tales como especies de Fasciolopsis, Heterophyes, Metagonimus, Clonorchis, Fasciola, Paragonimus, y Schistosoma, nematodos, tales como especies de Enterobius, Trichuris, Ascaris, Ancilostoma, Necator, Strongiloides, Trichinella, Wuchereria, Brugia, Loa Onchocerca, y Dracunculus, amebas tales como especies de Naegleria y Acanthamoeba, y protozoos, tales como especies de Plasmodium, Trypanosoma, Leishmania, Toxoplasma, Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, y Enterocytozoon.
 60

Las células patógenas a las que se dirigen los conjugados para administración de fármaco también pueden ser células que albergan patógenos endógenos, tales como células infectadas con virus, micoplasma, parásitos, o bacterias, si estas células expresan preferentemente receptores de vitaminas.

5 En una realización, los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas se pueden internalizar en las células patógenas diana tras la unión del resto vitamina a un receptor de vitamina, transportador de vitamina, u otras proteínas presentadas en la superficie que se unan específicamente a la vitamina y que se expresen preferentemente en células patógenas. Dicha internalización se puede producir, por ejemplo, mediante endocitosis mediada por receptor. Si el conjugado para administrar fármaco contiene un enlazador liberable, el resto vitamina y el fármaco se pueden disociar intracelularmente y el fármaco puede actuar sobre su diana intracelular.

10 En una realización alternativa, el resto vitamina del conjugado para administrar fármaco se puede unir a la célula patógena poniendo el fármaco en asociación estrecha con la superficie de la célula patógena. A continuación, el fármaco se puede liberar por escisión del enlazador liberable. Por ejemplo, el fármaco se puede liberar mediante una proteína disulfuro isomerasa si el enlazador liberable es un grupo disulfuro. A continuación, el fármaco se puede captar por la célula patógena a la que está unida el conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a
15 vitaminas, o el fármaco se puede captar por otra célula patógena en estrecha proximidad a la misma. Alternativamente, el fármaco se puede liberar mediante una proteína disulfuro isomerasa en el interior de la célula si el enlazador liberable es un grupo disulfuro. El fármaco también se puede liberar mediante un mecanismo hidrolítico, tal como una hidrólisis catalizada por ácidos, como se ha descrito anteriormente para algunos mecanismos de la beta-eliminación, o mediante una escisión ayudada anquiméricamente mediante un mecanismo productor de ion
20 oxonio o ion lactonio. La selección del enlazador o enlazadores liberables determinará el mecanismo por el cual el fármaco se liberará desde el conjugado. Se apreciará que dicha selección se puede predefinir mediante las condiciones en las que se va a usar el conjugado del fármaco.

25 En otra realización, si el enlazador no comprende un enlazador liberable, el resto vitamina del conjugado para administrar fármaco se puede unir a la célula patógena colocando el fármaco sobre la superficie de la célula patógena para marcar la célula patógena como diana para el ataque de otras moléculas capaces de unirse al fármaco.

Alternativamente, en esta realización, los conjugados para administración de fármaco se pueden internalizar en las células dianas tras el enlace y el resto vitamina y fármaco pueden permanecer asociados intracelularmente, mostrando el fármaco sus efectos sin disociarse del resto vitamina.

30 En otra realización adicional a modo de ejemplo, o combinada con las realizaciones anteriormente descritas, el conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas puede actuar mediante un mecanismo independiente de los receptores celulares de vitamina. Por ejemplo, los conjugados para administración de fármaco se pueden unir a receptores de vitamina solubles presentes en el suero o dirigirse a las proteínas séricas tal como albúmina, dando como resultado una circulación prolongada de los conjugados respecto al fármaco no conjugado, y
35 un aumento en la actividad de los conjugados con respecto a la población de células patógenas en relación al fármaco no conjugado.

En otra realización ilustrativas, se proporciona un conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas con la fórmula general V-L-D. L se ha seleccionado de $(I_s)_a$ y $(I_H)_b$, y combinaciones de los mismos, en la que $(I_s)_a$, $(I_H)_b$, y V son como se han definido en el presente documento, y D es un fármaco tal como un inmunógeno.
40 El inmunógeno puede ser un hapteno, por ejemplo, fluoresceína o dinitrofenilo. En esta realización, el conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas se une a la superficie de las células patógenas y "marca" las células con el inmunógeno, despertando de esta forma una respuesta inmune dirigida hacia la población marcada de células patógenas. Los anticuerpos administrados al hospedador en una inmunización o anticuerpos pasivos existentes en el sistema hospedador procedentes de una inmunidad ya existente, innata o adquirida, se unen al inmunógeno y despiertan respuestas inmunes endógenas. Los anticuerpos que se unen al conjugado
45 vitamina-inmunógeno unido a células dan como resultado citotoxicidad mediada por el complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, opsonización y fagocitosis de anticuerpos, muerte o quiescencia de células señaladoras por agrupación de receptores inducida por anticuerpos, o cualquier otra respuesta inmune humoral o celular estimulada por un anticuerpo que se une a los conjugados ligando-inmunógeno unidos a células.
50 En los casos en que un inmunógeno puede ser reconocido directamente por las células inmunes sin una opsonización previa del anticuerpo, se puede conseguir la muerte directa de las células patógenas. Esta realización se ha descrito con más detalle en la solicitud de patente de los Estados Unidos con N.º de serie 09/822.379. Se apreciará que en determinadas variaciones de esta realización en las que el fármaco es un inmunógeno, el enlazador bivalente puede incluir también enlazadores liberables, como se ha descrito anteriormente, tal como un
55 conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas de la fórmula general V-L-D en la que L se ha seleccionado de $(I_s)_a$, $(I_H)_b$, $(I_r)_c$, y combinaciones de los mismos en la que (I_s) es un enlazador separador, (I_H) es un enlazador de heteroátomo, (I_r) es un enlazador liberable, V es una vitamina, o un análogo o un derivado de la misma, y a, b, y c son números enteros.

60 Los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas descritos en el presente documento comprenden un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), un fármaco, y, de forma opcional,

enlazadores de heteroátomo para unir el resto de unión al receptor de vitamina y el fármaco a el enlazador bivalente (L). El enlazador bivalente (L) puede comprender un enlazador separador, un enlazador liberable (es decir, que se puede escindir), y un enlazador de heteroátomo, o combinaciones de los mismos.

5 Los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas descritos en el presente documento se pueden formar con una amplia variedad de vitaminas o análogos/derivados de vitaminas que se unen a un receptor de vitaminas, enlazadores, y fármacos. Los conjugados para administración de fármaco son capaces de dirigirse selectivamente a una población de células patógenas en un animal hospedador debido a la expresión preferente de un receptor para la vitamina, accesible para unión con una vitamina, sobre las células patógenas. Restos de vitamina a modo de ejemplo incluyen carnitina, inositol, ácido lipoico, piridoxal, ácido ascórbico, niacina, ácido pantoténico, 10 ácido fólico, riboflavina, tiamina, biotina, vitamina B₁₂, y las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Estas vitaminas, y sus análogos y derivados que se unen a un receptor, constituyen la entidad de direccionamiento que se puede acoplar al fármaco mediante el enlazador bivalente (L) para formar los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas descritos en el presente documento. Así, el término "vitamina" incluye análogos y/o 15 derivados de vitamina (por ejemplo, ácido pterico que es un derivado del folato, análogos de biotina tales como biocitina, sulfóxido de biotina, oxibiotina y otros compuestos que se unen al receptor de biotina). Se apreciará que los análogos o derivados de vitamina puedan significar una vitamina que incorpora un heteroátomo mediante el cual el análogo o derivado de vitamina se une covalentemente al enlazador bivalente (L).

Restos de vitamina a modo de ejemplo incluyen ácido fólico, biotina, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂, y análogos y 20 derivados que se unen a un receptor de estas moléculas de vitaminas, y otras moléculas que se unen al receptor relacionadas con las vitaminas. Realizaciones a modo de ejemplo de análogos y/o derivados de vitamina incluyen análogos y derivados de folato tal como ácido folínico, ácido pteropoliglutámico, y pteridinas que se unen al receptor folato, tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos, y sus deaza y dideaza análogos. Los términos de análogos "deaza" y "dideaza" se refieren a los análogos conocidos en la técnica que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de carbono en la estructura del ácido fólico natural, o análogo o derivado del mismo. 25 Por ejemplo, los análogos de deaza incluyen los análogos del folato 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza, y 10-deaza. Los análogos dideaza incluyen, por ejemplo, los análogos del folato 1,5-dideaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza, y 5,8-dideaza. Otros folatos útiles como ligandos formadores de complejos son los análogos que se unen al receptor folato aminopterina, ametopterina (metotrexato), N¹⁰-metilfolato, 2-deamino-hidroxi folato, análogos tales como 1-deazametopterina o 3-deazametopterina, y ácido 3',5'-dicloro-4-amino-4-deoxi-N¹⁰-metilpterilglutámico (diclorometotrexato). Los anteriores análogos y derivados del ácido fólico se denominan convencionalmente "folatos", reflejando su capacidad de unirse a los receptores de folato, y dichos ligandos, cuando se conjugan con moléculas exógenas, son eficaces para potenciar el transporte transmembrana, tal como mediante endocitosis mediada por folato, como se ha descrito en el presente documento. Otros ligandos adecuados capaces de unirse a 30 receptores de folato para iniciar el transporte endocitótico mediado por el receptor de folato incluye anticuerpos anti-idiotípicos del receptor de folato. Se usa una molécula exógena en un complejo con un anticuerpo anti-idiotípico del receptor de folato para desencadenar el transporte transmembrana del complejo.

Las realizaciones a modo de ejemplo de análogos y derivados de vitamina también incluyen análogos y derivados de biotina tales como biocitina, sulfóxido de biotina, oxibiotina y otros compuestos que se unen al receptor de la biotina. Se apreciará que también se contemplan en el presente documento otros análogos y derivados de otras vitaminas 40 descritas en el presente documento. En una realización, las vitaminas que se pueden usar en los conjugados para administración de fármaco descrito en el presente documento incluyen aquellos que se unen a los receptores de vitamina expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato, que une el folato, o un análogo o derivado del mismo, como se ha descrito en el presente documento.

El sitio de unión de la vitamina puede incluir receptores para cualquier molécula de vitamina o un derivado o análogo 45 de la misma, capaz de unirse específicamente a un receptor en el que el receptor o la otra proteína está expresada de forma única, expresada en exceso o expresada preferentemente por una población de células patógenas. Una proteína expresada en la superficie expresada de forma única, expresada en exceso o expresada preferentemente por las células patógenas es típicamente un receptor que bien no está presente, o presente en cantidades inferiores en las células no patógenas constituyendo un medio para eliminar de forma selectiva las células patógenas. Los 50 conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas pueden ser capaces de unirse con elevada afinidad a los receptores de células cancerosas u otros tipos de células patógenas. Esta elevada afinidad de enlace puede ser inherente del resto vitamina, o la afinidad de enlace puede verse potenciada por el uso de una vitamina químicamente modificada, (es decir, un análogo o un derivado).

El fármaco puede ser cualquier molécula capaz de modular o modificar de otra forma la función celular, incluyendo 55 compuestos farmacéuticamente activos. Las moléculas adecuadas pueden incluir: péptidos, oligopéptidos, oligopéptidos retroinversos, proteínas, análogos de proteína en que al menos un enlace no peptídico sustituye un enlace peptídico, apoproteínas, glicoproteínas, enzimas, coenzimas, inhibidores de enzimas, aminoácidos y sus derivados, receptores y otras proteínas de membrana; antígenos y anticuerpos contra los anteriores; haptenos y anticuerpos contra los anteriores; hormonas, lípidos, fosfolípidos, liposomas; toxinas; antibióticos; analgésicos; broncodilatadores; beta-bloqueantes; agentes antimicrobianos, agentes antihipertensivos, agentes cardiovasculares incluyendo antiarrítmicos, glicósidos cardíacos, antianginales y vasodilatadores; agentes del sistema nervioso central 60 incluyendo estimulantes, psicotrópicos, antimaníacos, y depresores; agentes antiviricos; antihistaminas; fármacos

contra el cáncer incluyendo agentes quimioterapéuticos; tranquilizantes, antidepresivos, antagonistas de H-2; anticonvulsivos; antieméticos; prostaglandinas y análogos de prostaglandina; relajantes musculares; sustancias antiinflamatorias; estimulantes, descongestivos; antieméticos; diuréticos; antiespasmódicos; antiasmáticos; agentes contra el Parkinson; expectorantes; supresores de la tos; mucolíticos; y aditivos minerales nutritivos.

5 Además, el fármaco puede ser cualquier fármaco conocido en la técnica que sea citotóxico, potencie la permeabilidad tumoral, inhiba la proliferación de células tumorales, estimule la apoptosis, disminuya la actividad antiapoptótica en las células diana, se use para tratar dolencias causadas por agentes infecciosos, potencie una respuesta inmune endógena dirigida a las células patógenas, o que sea de utilidad para tratar un estado patológico producido por cualquier tipo de célula patógena. Los fármacos adecuados para uso incluyen adrenocorticoides y
10 corticosteroides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos tales como citosina arabinósido, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfan, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, paclitaxel, derivados de paclitaxel, Taxotere[®], ciclofosfamida, daunomicina, rizoxina, toxina T2, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, mitomicinas, discodermólidos, inhibidores de microtúbulos, epotilonas,
15 tubulisina, ciclopropil benc[e]indolona, seco-ciclo-propilbenc[e]indolona, O-Ac-seco-ciclopropil benc[e]indolona, bleomicina y otros antibióticos, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, y análogos y derivados de los mismos tales como deacetilvinblastina monohidrazida, colchicina, derivados de colchicina, alocolchicina, tiocolchicina, tritil cisteína, Halicondrina B, dolastatinas tales como dolastatina 10, amanitinas tales como α -amanitina, camptotecina, irinotecano, y otros derivados de camptotecina de los anteriores, geldanamicina y
20 derivados de geldanamicina, estramustina, nocodazol, MAP4, colcemida, agentes inflamatorios y proinflamatorios, péptidos y peptidomiméticos inhibidores de la transducción de la señal y cualquier otro fármaco o toxina conocida en la técnica. Otros fármacos que se pueden usar incluyen penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, eritromicina, clindamicina, rifampin, cloranfenicol, antibióticos de aminoglicósido, gentamicina, anfotericina B, aciclovir, trifluridina, ganciclovir, zidovudina, amantadina, ribavirina, y cualquier otro compuesto antimicrobiano conocido en la técnica.

25 En una realización, los fármacos para uso permanecen estables en suero durante al menos 4 horas. En otra realización, los fármacos tienen una CI_{50} en el rango nanomolar, y, en otra realización, los fármacos son solubles en agua. Si el fármaco no es soluble en agua, el enlazador bivalente (L) se puede derivatizar para potenciar la solubilidad en agua. El término "fármaco" también significa cualquier análogo o derivado de fármaco descrito en el presente documento anterior, incluyendo dolastatinas tales como dolastatina 10, las amanitinas tales como α -
30 amanitina, camptotecinas e irinotecanos, y otros derivados de camptotecinas e irinotecanos de los anteriores. Se apreciará que el análogo o derivado de fármaco puede significar un fármaco que incorpore un heteroátomo a través del cual el análogo o derivado de fármaco se une covalentemente al enlazador bivalente (L).

Los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas pueden comprender un resto de unión al receptor de vitamina, un enlazador bivalente (L), un fármaco, y, de forma opcional, enlazadores de heteroátomo para
35 unir el resto de unión al receptor de vitamina y el fármaco al enlazador bivalente (L). Se apreciará que un análogo o derivado de vitamina puede significar una vitamina que incorpora un heteroátomo mediante el cual el análogo o derivado de vitamina se une covalentemente al enlazador bivalente (L). Así, la vitamina se puede unir covalentemente al enlazador bivalente (L) mediante un enlazador de heteroátomo, o un análogo o derivado de
40 vitamina (es decir, que incorpora un heteroátomo) se puede unir directamente al enlazador bivalente (L). De manera similar, un análogo o derivado de fármaco puede significar un fármaco que incorpora un heteroátomo mediante el cual el análogo o derivado de fármaco se une covalentemente al enlazador bivalente (L). Así, el fármaco se puede unir covalentemente al enlazador bivalente (L) mediante un enlazador de heteroátomo, o un análogo o derivado de
45 fármaco (es decir, que incorpora un heteroátomo) se puede unir directamente al enlazador bivalente (L). El enlazador bivalente (L) puede comprender un enlazador separador, un enlazador liberable (es decir, que se puede escindir) enlazador, y un enlazador de heteroátomo para unir el enlazador separador al enlazador liberable en los conjugados que contienen ambos tipos de enlazadores.

Así, el enlazador bivalente (L) puede comprender un elemento para asociar la vitamina con el fármaco, tal como mediante la conexión con enlazadores de heteroátomo (es decir, brazos separadores o moléculas puente), o mediante enlace covalente directo entre el enlazador bivalente (L) y el análogo o derivado de vitamina o fármaco.
50 Cualquier elemento de asociación no debería evitar la unión de la vitamina, o derivado o análogo de unión al receptor de vitamina, al receptor de vitamina sobre la membrana celular para que actúe el procedimiento de la presente invención.

En general, se puede utilizar cualquier manera de formar un conjugado entre el enlazador bivalente (L) y la vitamina, o análogo o derivado de la misma, entre el enlazador bivalente (L) y el fármaco, o análogo o derivado del mismo,
55 incluyendo cualesquiera enlazadores de heteroátomo que intervengan. Igualmente, se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para formar un conjugado entre el enlazador separador, el enlazador liberable, y el enlazador de heteroátomo para formar el enlazador bivalente (L). El conjugado se puede formar por conjugación directa de cualquiera de estas moléculas, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno, iónicos, o covalentes. El enlace covalente se puede producir, por ejemplo, por la formación de enlaces amida, éster, disulfuro, o imino entre
60 grupos ácidos, aldehído, hidroxilo, amino, sulfhidrilo, o hidrazo.

El enlazador separador y/o liberable (es decir, enlazador que se puede escindir) puede ser cualquier enlazador

biocompatible. El enlazador que se puede escindir puede ser, por ejemplo, un enlazador susceptible a la escisión en condiciones reductoras u oxidantes presentes en las células, un enlazador sensible al pH que puede ser un enlazador lábil frente a ácidos o lábil frente a bases, o un enlazador que se pueda escindir mediante procesos bioquímicos o metabólicos, tal como un enlazador lábil frente a enzimas.

- 5 Típicamente, el enlazador separador y/o liberable comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 átomos de carbono, de forma más típica de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Los enlazadores de bajo peso molecular (es decir, aquellos que tienen un peso molecular aproximado de aproximadamente 30 a aproximadamente 300) se emplean de forma típica. Los precursores de dichos enlazadores se seleccionan de forma típica para tener grupos funcionales nucleófilos o electrófilos, o ambos, de forma opcional
10 en forma protegida con un grupo protector que se escinda con facilidad para facilitar su uso en la síntesis de la especie intermedia.

- Se contemplan también composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de conjugado para administrar fármacos al receptor de unión a vitaminas eficaz para eliminar una población de células patógenas en un animal hospedador cuando se administra en una o más dosis. El conjugado para administrar fármaco se administra preferiblemente al animal hospedador parenteralmente, por ejemplo, intradermalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, o intratecalmente. Alternativamente, el conjugado para administrar fármaco se puede administrar al animal hospedador mediante otros procesos médicamente útiles, tal como oralmente, y se puede usar cualquier dosis eficaz y forma de dosificación adecuada, incluyendo formas de dosificación de liberación prolongada.

- 20 Ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen soluciones acuosas del principio activo, en solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos, tales como alcoholes, glicoles, ésteres y amidas líquidas. La forma de dosificación parenteral puede estar en forma de un liofilizado para reconstituir que comprende la dosis del conjugado para administrar fármaco. En un aspecto de la presente realización, se puede administrar cualquier número de formas de dosificación de liberación prolongada
25 conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, las matrices de carbohidrato biodegradable descritas en las Patentes de los Estados Unidos con números 4.713.249; 5.266.333; y 5.417.982 o, alternativamente, se puede usar una bomba lenta (por ejemplo, una bomba osmótica).

- Se puede administrar al hospedador al menos una composición adicional que comprende un factor terapéutico o un auxiliar de los procedimientos anteriormente detallados para potenciar la eliminación de la población de células patógenas mediada por el conjugado para administrar fármaco, o se pueden administrar más de un factor terapéutico adicional. El factor terapéutico se puede seleccionar de un compuesto capaz de estimular una respuesta inmune endógena, un agente quimioterapéutico, u otro factor terapéutico capaz de complementar la eficacia del conjugado para administrar fármaco administrado. El uso puede implicar administrar al paciente, además de los conjugados anteriormente descritos, compuestos o composiciones capaces de estimular una respuesta inmune endógena (por ejemplo, una citoquina), incluyendo citoquinas o factores de crecimiento de células inmunes tales como interleucinas 1-18, factores de células madres, FGF básico, EGF, G-CSF, GM-CSF, ligando FLK-2, HILDA, MIP-1 α , TGF- α , TGF- β , M-CSF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , CD23 soluble, LIF, y combinaciones de los mismos.

- Se pueden usar combinaciones terapéuticamente eficaces de estos factores. En una realización, se pueden usar por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces de IL-2, por ejemplo, en cantidades comprendidas entre aproximadamente 0,1 MIU/m²/dosis/día y aproximadamente 15 MIU/m²/dosis/día en una pauta diaria de dosis múltiples, e IFN- α , por ejemplo, en cantidades comprendidas entre aproximadamente 0,1 MIU/m²/dosis/día a aproximadamente 7,5 MIU/m²/dosis/día en una pauta diaria de dosis múltiples junto con la administración de conjugados del fármaco para eliminar, reducir o neutralizar células patógenas en un animal hospedador que alberga las células patógenas (MIU = millón de unidades internacionales; m² = área corporal superficial aproximada de un ser humano promedio). En otra realización IL-12 e IFN- α se usan en las cantidades terapéuticamente eficaces anteriormente descritas para interleucinas e interferones, y en otra realización adicional, IL-15 e IFN- α se usan en las cantidades terapéuticamente eficaces anteriormente descritas para interleucinas e interferones. En una realización alternativa, IL-2, IFN- α o IFN- γ , y GM-CSF se usan en combinación con las cantidades terapéuticamente eficaces anteriormente descritas. También se contempla el uso de cualquier otra combinación eficaz de citoquinas
50 incluyendo combinaciones con otras interleucinas e interferones y factores estimulantes de colonias.

- Los agentes quimioterapéuticos que son, por ejemplo, citotóxicos por sí mismos, o que pueden actuar para potenciar la permeabilidad del tumor, son también adecuados para combinar con el uso de los conjugados para administración de fármaco. Dichos agentes quimioterapéuticos adrenocorticoides y corticosteroides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos tales como citosina arabinósido, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfan, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, paclitaxel, derivados de paclitaxel, Taxotere[®], ciclofosfamida, daunomicina, rizoxina, toxina T2, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, mitomicinas, discodermólidos, inhibidores de microtúbulos, epotilonas, , tubulisina, ciclopropil benc[e]indolona, seco-ciclo-propilbenc[e]indolona, O-Ac-seco-ciclopropil benc[e]indolona, bleomicina y otros antibióticos, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, y análogos y derivados de los mismos tales como deacetilvinblastina monohidrazida, colchicina, derivados de colchicina, alocolchicina, tiocolchicina, tritil

cisteína, Halicondrina B, dolastatinas tales como dolastatina 10, amanitinas tales como α -amanitina, camptotecina, irinotecano, y otros derivados de camptotecina de los anteriores, geldanamicina y derivados de geldanamicina, estramustina, nocodazol, MAP4, colcemida, agentes inflamatorios y proinflamatorios, péptidos y peptidomiméticos inhibidores de la transducción de la señal y cualquier otro fármaco o toxina conocida en la técnica. Otros fármacos que se pueden usar incluyen penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, eritromicina, clindamicina, rifampin, cloranfenicol, antibióticos de aminoglicósido, gentamicina, anfotericina B, aciclovir, trifluridina, ganciclovir, zidovudina, amantadina, ribavirina, y cualquier otro compuesto antimicrobiano conocido en la técnica.

El factor terapéutico se puede administrar al animal hospedador antes de, después de o a la vez que los conjugados para administrar fármaco al receptor de unión a vitaminas y el factor terapéutico se puede administrar como parte de la misma composición que contiene el conjugado para administrar fármaco o como parte de una composición diferente a la del conjugado para administrar fármaco. Se puede usar cualquier composición terapéutica de este tipo que contiene el factor terapéutico a una dosis terapéuticamente eficaz.

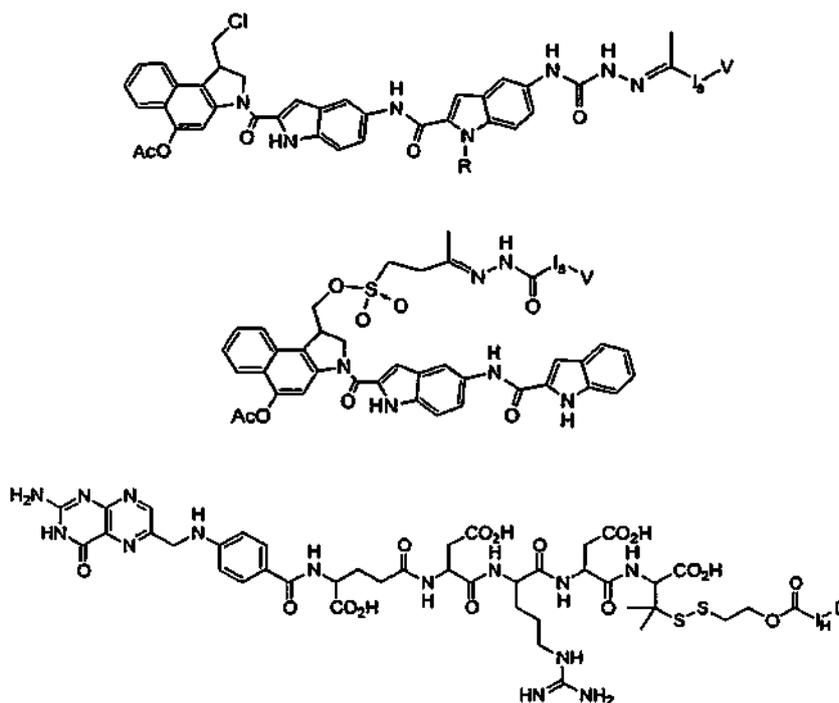
Adicionalmente, se puede usar más de un tipo de conjugado para administrar fármaco. Por ejemplo, el animal hospedador se puede tratar con conjugados de diferentes vitaminas, pero el mismo, fármaco (por ejemplo, conjugados folato-mitomicina y conjugados vitamina B₁₂-mitomicina) con un protocolo de dosificación simultánea. En otras realizaciones, el animal hospedador se puede tratar con conjugados que comprenden las mismas vitaminas unidas a diferentes fármacos, o a diferentes vitaminas unidas a diferentes fármacos. Por ejemplo, el animal hospedador se puede tratar con un conjugado folato-mitomicina y un conjugado folato-cisplatino, o con un conjugado folato-mitomicina y un conjugado vitamina B₁₂-cisplatino. Además, se podrían usar conjugados para administración de fármaco con las mismas o diferentes vitaminas, y el mismo o diferentes fármacos que comprende varias vitaminas y varios fármacos como parte del mismo conjugado para administrar fármaco.

La dosis unitaria diaria del conjugado para administrar fármaco puede variar significativamente dependiendo del estado del hospedador, el estado patológico que está siendo tratado, el peso molecular del conjugado, su ruta de administración y la distribución de tejido, y el posible uso simultáneo de otros tratamientos terapéuticos tales como radioterapia. La cantidad eficaz a administrar a un paciente se basa en el área de la superficie corporal, peso del paciente y evaluación médica del estado del paciente. Las dosis eficaces pueden estar comprendidas, por ejemplo, entre aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 500 μ g/kg, y entre aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 100 μ g/kg.

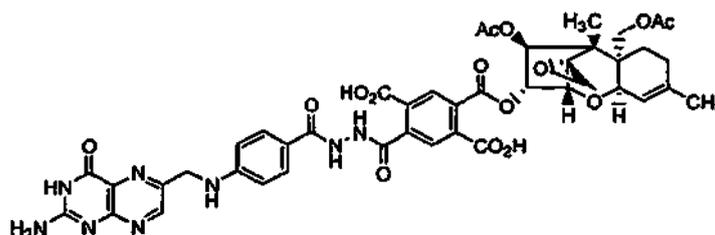
Se puede utilizar cualquier pauta eficaz para usar los conjugados para administración de fármaco. Por ejemplo, los conjugados para administración de fármaco se pueden usar en monodosis, o se pueden dividir y administrar en una pauta de varias dosis diarias. Además, se puede usar una pauta estadificada, por ejemplo, de uno a tres días a la semana como alternativa al tratamiento diario, y dicha pauta diaria intermitente o estadificada se considera equivalente al tratamiento diario. En una realización, el hospedador se trata con varias inyecciones del conjugado para administrar fármaco para eliminar la población de células patógenas. En una realización, el hospedador recibe varias inyecciones (preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces) con el conjugado para administrar fármaco, por ejemplo, en intervalos de 12-72 horas o de 48-72 horas. Se pueden administrar inyecciones adicionales del conjugado para administrar fármaco al paciente en un intervalo de días o meses tras la inyección o inyecciones iniciales, y las inyecciones iniciales evitan la recurrencia del estado patológico causado por las células.

En una realización, las vitaminas, o análogos o derivados de las mismas que se pueden usar en los conjugados para administración de fármaco incluyen aquellas que se unen a los receptores expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato que se une al folato, o un análogo o derivado del mismo. Los conjugados unidos a folato, por ejemplo, se pueden usar para matar o suprimir la actividad de macrófagos activados que ocasionan estados patológicos en un hospedador. Dichos conjugados dirigidos a macrófagos, cuando se administran a un paciente que padece un estado patológico mediado por macrófagos activados, actúan para concentrar y asociar el fármaco conjugado en la población de macrófagos activados para matar los macrófagos activados o suprimir la función de los macrófagos. La eliminación, reducción o desactivación de la población de macrófagos activados actúa para detener o reducir la patogénesis mediada por macrófagos activados característica de los estados patógenos que se están tratando. Las dolencias a modo de ejemplo conocidas por estar mediadas por macrófagos activados incluyen artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo del órgano trasplantado (GVHD) e inflamaciones crónicas. La administración del conjugado para administrar fármaco se continúa hasta que los síntomas del estado patológico se reducen o se eliminan.

Los conjugados para administración de fármaco administrados para matar macrófagos activados o suprimir la función de macrófagos activados se pueden administrar parenteralmente al animal o paciente que padece el estado patológico, por ejemplo, intradermalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, o intravenosamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, los conjugados para administración de fármaco se pueden administrar al animal o paciente mediante otros procesos médicamente útiles, y las dosis eficaces se pueden administrar en formas de dosificación normales o de liberación prolongada. El procedimiento terapéutico se puede usar solo o combinado con otros procedimientos terapéuticos para el tratamiento de estados patológicos mediados por macrófagos activados.



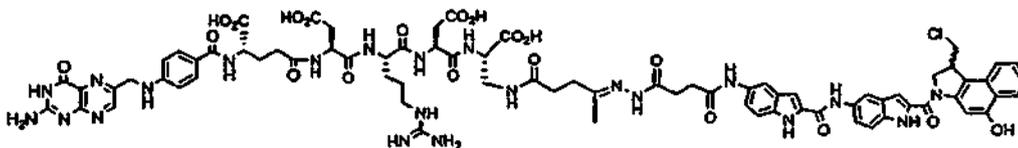
Además, los siguientes conjugados para administración de fármaco son también ilustrativos de los conjugados para administración de fármaco. Los procedimientos sintéticos adjuntos son ilustrativos de los que se pueden utilizar para preparar los conjugados para administración de fármaco descritos en el presente documento.



5

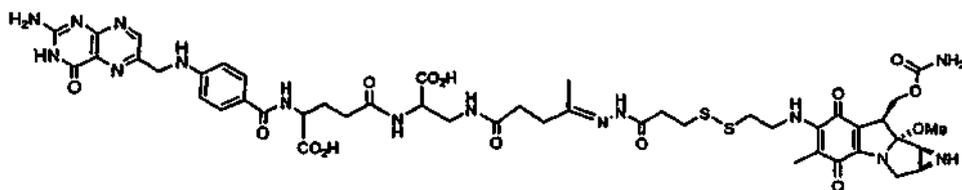
10

A una solución de diacetoxiscirpenol (DAS) en acetonitrilo se añadieron 1,0 eq. de dianhídrido 1,2,4,5-bencenotetracarboxílico seguido por 1 eq. de base de Hünig. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas bajo argón y a temperatura ambiente. Si parte del DAS permanece sin reaccionar, se añaden 0,2 eq. más del dianhídrido y la agitación se continuó durante 1 hora. Se añadió una solución de 1,2 eq. de pteroil hidrazida (preparada de acuerdo con J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 10004) en DMSO anhidro, seguido por 1,0 eq. de base de Hünig. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y precipitó con dietil éter. El precipitado resultante se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa.



15

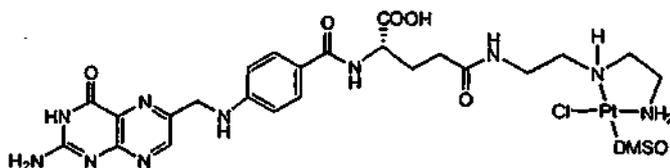
Como se describe generalmente en el Ejemplo 10a, la Boc-hidrazida se hace reaccionar con anhídrido succínico, y el producto resultante se hace reaccionar con 5'-amino-bis-indolil-seco-CBI en presencia de EDC como agente de condensación. La eliminación de Boc y la formación de la hidrazona con ácido levulínico libre proporcionan, tras activación con NHS-éster, un compañero reactivo para el fragmento de péptido Pte- γ -Glu-Asp-Arg-Asp-Dap-OH. Este fragmento de péptido se ha preparado mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando la estrategia con Fmoc partiendo de resina Fmoc-Dap(Boc)-Wang como se describe generalmente en el Esquema 12.



Fmoc-hidrazida se hace reaccionar con ácido 3-(2-piridilditio)propiónico para dar Fmoc-hidrazido-[3-(2-piridilditio) propionato]. La reacción con un derivado de mitomicina C (mitomicina C, $N-(CH_2)_2SH$) da como resultado un derivado de mitomicina C que contiene un disulfuro. La eliminación de Fmoc mediante protocolos normalizados y la formación de la hidrazona con ácido levulínico libre proporcionan, tras activación con NHS-éster, un compañero reactivo para el fragmento de péptido Pte- γ -Glu-Dap-OH, que se puede preparar como se describe generalmente en el Esquema 12.

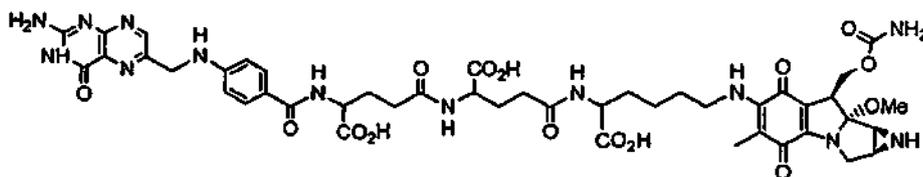
En cada compuesto presentado en la presente memoria descriptiva, la estereoquímica de los aminoácidos usados para formar el enlazador se puede seleccionar de forma opcional entre la configuración L natural, o la configuración D no natural. Cada ejemplo se ha caracterizado mediante RMN, RMN, MS, y/o espectroscopía UV. y/o HPLC según se indican. las señales características seleccionadas se han notificado como apropiadas.

Ejemplo comparativo 1



La γ -amida del ácido dietilentriaminafólico, (DETA-folato) se sintetizó según un procedimiento descrito por P. Fuchs y col., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 10004. Este compuesto (100mg) se disolvió en 2 ml de HCl 0,1 N. La solución resultante se añadió a una solución de K_2PtCl_4 (158 mg) en 1 ml de HCl 0,1 N con agitación. Se añadieron 3 ml de DMSO y se continuó la agitación durante 3 días, la solución se filtró, y el filtrado precipitó en acetonitrilo para dar 170 mg de un polvo amarillo; MS (MALDI) 1249,92, 1286,27; RMN 1H (D_2O) δ 1,05 (t, 1H), 2,3 (t, 2H), 3,1 (t, 2H), 4,45 (m, 1H), 6,65 (d, 2H), 7,5 (d, 2H), 8,65 (s, 1H).

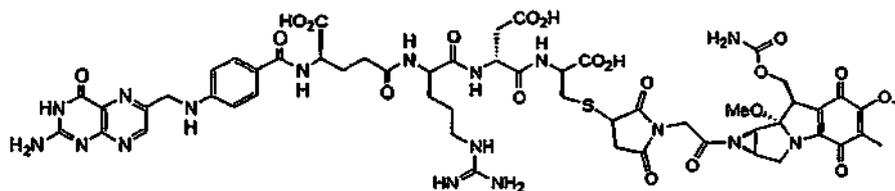
Ejemplo comparativo 2a



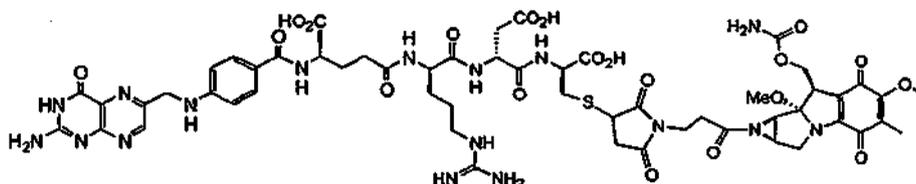
El fragmento de peptidilo N^{10} -TFA-Pte-Glu-Glu-Lys-OH que contiene folato protegido con N^{10} -trifluoroacetilo se preparó mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando la estrategia con Fmoc, como se describe generalmente en el Esquema 12. Se sintetizó en la resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang sensible a ácidos. Se aplicó PyBop como reactivo activante para garantizar suficiente acoplamiento con bajos equivalentes de aminoácidos. Los grupos protectores Fmoc se eliminaron después de cada etapa de acoplamiento en condiciones normalizadas (piperidina al 20% en DMF). Fmoc-Glu-OtBu y N^{10} -TFA-Pte-OH se usaron como bloques de construcción de aminoácido protegido. Tras la última etapa de ensamblado el péptido se escindió del soporte polimérico por tratamiento con ácido trifluoroacético, etanodiol y triisopropilsilano. Esta reacción también consiguió la eliminación simultánea de los grupos protectores t-Bu y t-Boc. El péptido bruto se purificó mediante HPLC preparativa para dar N^{10} -TFA-Pte-YGlu-yGlu-Lys-OH como sal de TFA. Una solución de 81 mg (0,1mmol) del péptido en 2 ml de DMSO se trató con 15 μ l (0,11 mmol) Et_3N y 35 mg (0,1 mmol) de mitomicina A. La mitomicina A se puede preparar a partir de mitomicina C de acuerdo con los procedimientos de M. Matsui, Y. Yamada, K. Uzu, y T. Hirata, J. Antibiot. 21, 189-198 (1968) y D. Vias, D. Benigni, R Partyka, y T. Doile, J. Org. Chem. 51, 4307-4309 (1986)

La mezcla de reacción se agitó durante 48 h a temperatura ambiente y el solvente se eliminó mediante liofilización. Salvo que se indique otra cosa, todas las evaporaciones de solvente se realizaron bajo presión reducida. Finalmente, el grupo protector de trifluoroacetilo se separó en hidróxido de amonio acuoso (pH=10,0) y el producto se precipitó en acetonitrilo para dar 102 mg del conjugado como un sólido amarillo; RMN 1H (D_2O) δ 2,45 (q, 1H), 2,95 (m, 2H), 3,35 (dd, 1H), 3,5 (d, 1H), 6,5 (d, 2H), 7,55 (d, 2H), 8,55 (s, 1H).

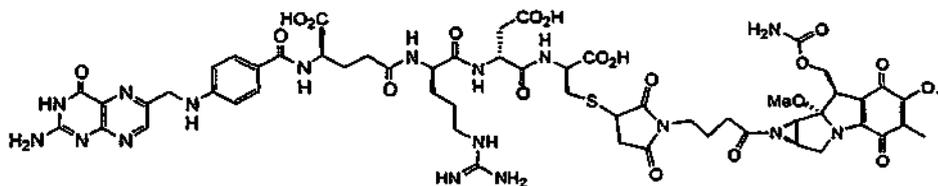
Ejemplo comparativo 4a



Ejemplo comparativo 4b

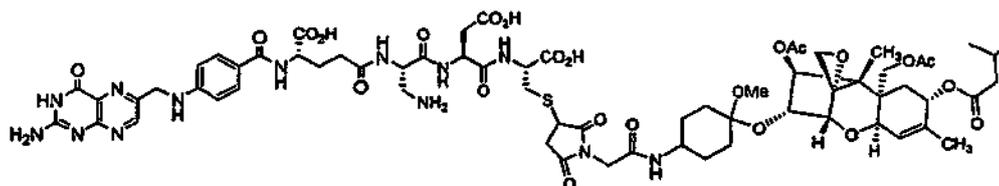


5 Ejemplo comparativo 4c



Los compuestos de los Ejemplos 4a, 4b, y 4c se han preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en general en el Ejemplo 3, excepto en que la acilaziridina se preparó por acilación (véase el Esquema 1) de mitomicina A con la *N*-(ácido alcanico)maleimida apropiada comercialmente disponible.

10 Ejemplo comparativo 5

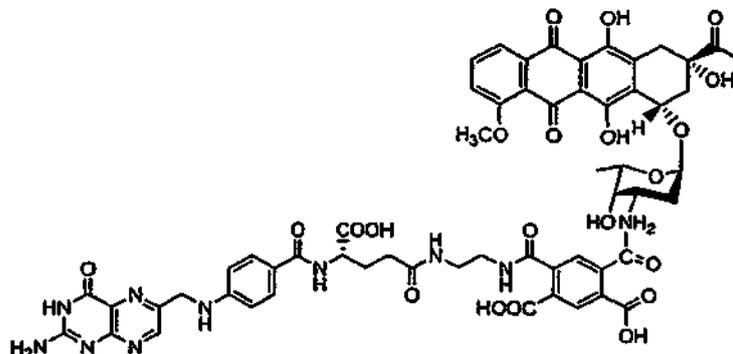


La reacción de clorhidrato de *trans*-4-aminociclohexanol con una cantidad equimolar de Fmoc-OSu en presencia de 2,2 eq. de NaHCO₃ como base, y acetonitrilo/agua (1/1) como solvente dio el aminoalcohol protegido con *N*-Fmoc que se oxidó a la correspondiente aminocetona protegida con *N*-Fmoc aplicando condiciones de Swern (Synthesis, 1981, 165). La cetalización con 4 eq. de ortoformiato de metilo y una cantidad catalítica de ácido trifluoroacético dio un aminocetal protegido con *N*-Fmoc con rendimiento cuantitativo. El tratamiento de este cetal con cantidades equimolares de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo y 2,4,6-tri-*t*-butil-piridina dio como resultado el 4-Fmoc-aminociclohexil enol éter como producto. En la siguiente etapa, el fármaco, toxina T-2, se trató con un exceso de cuatro veces del enol éter en presencia de tamices moleculares (3 A) y cantidades catalíticas de ácido trifluoroacético. El cetal mixto asimétrico resultante se purificó sobre gel de sílice. El grupo protector Fmoc se eliminó por tratamiento con piperidina unida a resina en DMF. El grupo amino liberado se hizo reaccionar con 1,1 eq. de ácido maleimidoacético-NHS-éster en presencia de 1,1 eq. de base de Hünig. El cetal que contiene maleimido de la toxina T-2 se purificó sobre gel de sílice.

El fragmento de péptido que contiene folato, Pte- γ -Glu- β -Dap-Asp-Cys-OH, se preparó mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando la estrategia con Fmoc, como se describe de manera general en el Esquema 12. Se sintetizó en la resina Wang sensible a ácido cargada con Fmoc-L-Cys(Trt)-OH. Se aplicó PyBop como reactivo activante para garantizar suficiente acoplamiento con bajos equivalentes de aminoácidos. Los grupos protectores Fmoc se eliminaron después de cada etapa de acoplamiento en condiciones normalizadas (piperidina al 20% en DMF). Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Boc-Dap(Fmoc)-OH, Fmoc-Glu-OtBu, y *N*¹⁰-TFA-Pte-OH se usaron como bloques de construcción de aminoácido protegido. Tras la última etapa de ensamblado el péptido se escindió del soporte polimérico por tratamiento con ácido trifluoroacético, etanodiol y triisopropilsilano. Esta reacción también consiguió la eliminación simultánea de los grupos protectores *t*-Bu, *t*-Boc, y tritilo. Finalmente, el resto trifluoroacetilo se separó en hidróxido de amonio acuoso para dar el péptido deseado que contiene tiol. El péptido bruto se purificó mediante HPLC preparativa.

Finalmente, el conjugado de fármaco con cetil-unido a folato diana se preparó mezclando bajo argón una solución acuosa tamponada (pH=7,0) del péptido con una solución equimolar en acetonitrilo del acetal que contiene maleimido de la toxina T-2. Tras agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, el conjugado final se sometió a HPLC preparativa, y dio un polvo amarillo tras la liofilización de la fracción recogida; ES MS (m-H)⁻ 1474,5, (m+H)⁺ 1476,2, (m+Na)⁺ 1498,3.

Ejemplo comparativo 6

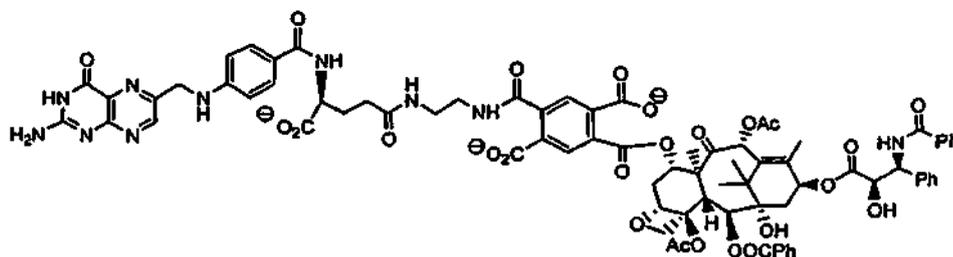


La γ -amida del ácido etilendiaminofólico (EDA-folato) se sintetizó según un procedimiento descrito por P. Fuchs y col. (J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 10004; véase por ejemplo la síntesis del compuesto 52 descrita en dicho documento.

El EDA-folato (600 mg) se suspendió en 5 ml de DMSO anhidro. Tras agitar durante 4 horas a 60°C la solución resultante se enfrió a 20°C y se añadieron 4 eq. de dianhídrido 1,2,4,5-bencenotetracarboxílico (anhídrido BTCA). Después de 5 min la mezcla de reacción se vertió sobre acetonitrilo anhidro bien agitado. El precipitado resultante se aisló por centrifugación para dar 657 mg de BTCA(monoanhídrido)-EDA-folato.

A una solución bien agitada de daunomicina en DMSO seco se agregó BTCA(monoanhídrido)-EDA-folato sólido (1,5 eq.). Tras agitar durante 14 horas más, el 50% de la daunomicina permanecía sin reaccionar (HPLC), entonces se añadieron a continuación 1,5 eq. de BTCA (monoanhídrido)-EDA-folato. Tras agitar durante cuatro horas más, toda la daunomicina se había consumido. En el perfil de HPLC se observaron dos picos nuevos con tiempos de retención cercanos que representaban los dos regioisómeros del conjugado final. El producto bruto se aisló tras precipitación en acetonitrilo y se purificó adicionalmente mediante HPLC de fase inversa. La estructura del producto estuvo de acuerdo con el ES MS (m-H)⁻ 1227,1.

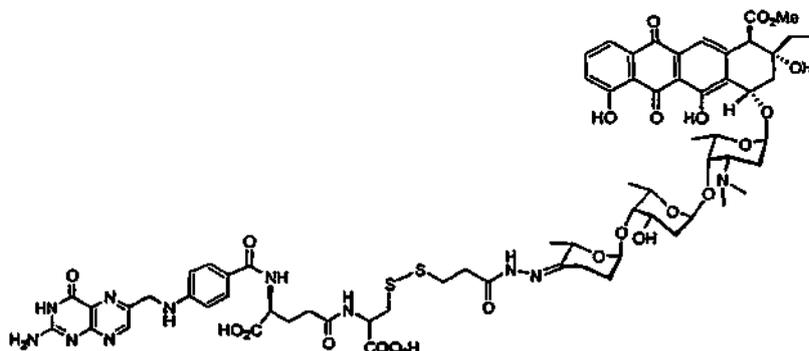
Ejemplo comparativo 7



Bajo argón y a 0°C, se agregó lentamente a una solución bien agitada de 250 mg (0,25 mmol) de paclitaxel y 130 μ l (0,73 mmol) de base de Hünig en 4 ml de diclorometano anhidro, 85 μ l (0,8 mmol) de Alloc-Cl. Se continuó la agitación durante 12 horas más, y el producto se aisló mediante técnicas de extracción convencionales. Este polvo blanco, 2'-alloc-paclitaxel, se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

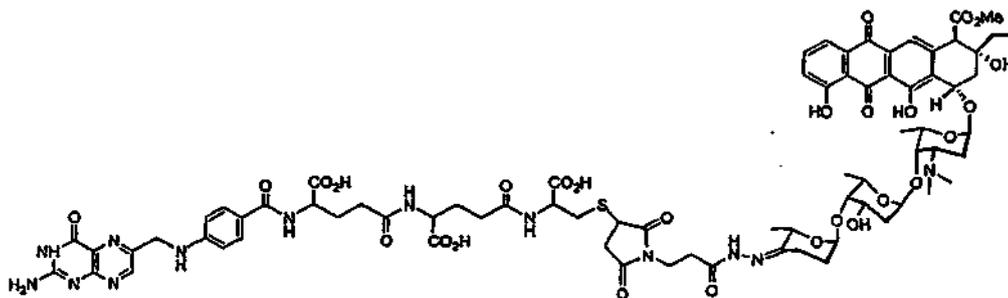
En esta etapa, 108 mg (0,117 mmol) de 2'-alloc-paclitaxel se disolvieron en 1,0 ml de acetonitrilo anhidro. Bajo argón con agitación, se añadieron 25 mg (0,117 mmol) de dianhídrido 1,2,4,5-bencenotetracarboxílico (anhídrido BTCA) y 21 μ l (0,120 mmol) de base de Hünig a esta solución. Se continuó la agitación durante 2,5 horas más. En un matraz de reacción separado, 52 mg de EDA-folato se agitaron a 60°C hasta que todo el material se disolvió (ca. 60 min). Tras enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción anterior se agregó a esta solución y se continuó la agitación durante 2 horas más. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una mezcla bien agitada de acetonitrilo/dietil éter (20: 80). El precipitado amarillo se separó por centrifugación y se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa. La estructura del producto estuvo de acuerdo con los espectros de RMN ¹H 1D y 2D (COSY); ES MS (m+H)⁺ 1555,5.

Ejemplo comparativo 8



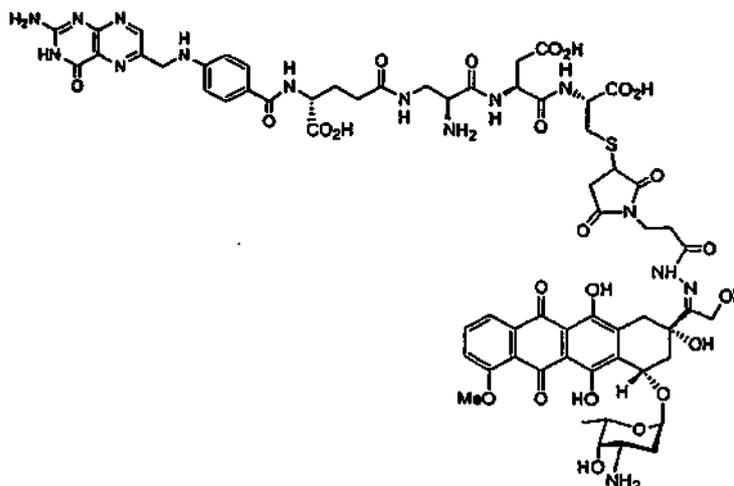
Una mezcla de 1,0 eq. de aclamicina, 2,0 eq. de hidrazido-[3-(2-piridilditio)propionato] (SPDP-hidrazona) y unos pocos cristales de p-toluensulfonato de piridinio se disolvieron bajo argón con agitación en metanol anhidro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. El solvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice pretratada con trietilamina al 1,5 % en cloroformo/metanol (90:10). La aclamicina acil hidrazona obtenida se disolvió en una cantidad mínima de acetonitrilo. A la solución resultante se añadió lentamente y bajo argón una cantidad equimolar de Pte- γ -Glu-Cys-OH (disuelto en agua y ajustado a pH=6,8). La preparación de Pte- γ -Glu-Cys-OH es análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 2a, y descrita de manera general en el Esquema 12. La reacción de intercambio de disulfuro tuvo lugar en 10 min. La mezcla de reacción se añadió lentamente a un exceso de acetonitrilo y el precipitado resultante se aisló tras centrifugación. El precipitado se resuspendió una vez más en acetonitrilo y tras agitar durante 15 min se separó por centrifugación. Tras secar con alto vacío durante la noche, el conjugado final fue suficientemente puro (HPLC); ES MS ($m+H^+$) 1474,1.

Ejemplo comparativo 9

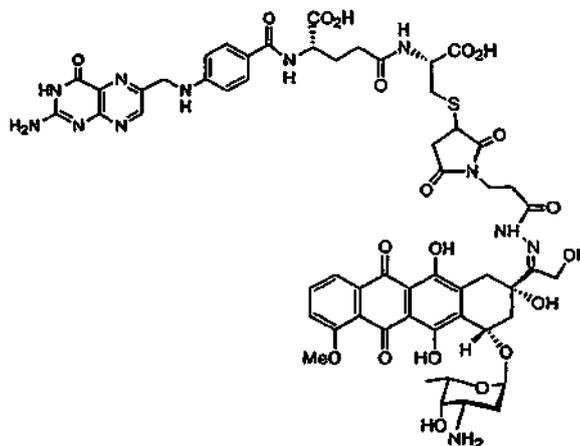


Una mezcla de 1,0 eq. de aclamicina y 1,2 eq. de ácido β -maleimidopropiónico TFA se disolvió bajo argón con agitación en metanol anhidro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se evaporó a sequedad. El residuo se hizo pasar por una columna corta de gel de sílice pretratada con trietilamina al 15 % en cloroformo/metanol (90:10). En un matraz separado, el fragmento de péptido Pte- γ -Glu- γ -Glu-Cys-OH se disolvió en agua bajo argón ajustando el pH a 6,8. La preparación de Pte- γ -Glu- γ -Glu-Cys-OH es análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 2a, y descrita de manera general en el Esquema 12. A la solución amarillenta resultante se añadió lentamente la maleimidohidrazona de aclamicina disuelta en una cantidad mínima de metanol. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora bajo argón. El metanol se eliminó y el residuo se purificó mediante HPLC en una columna preparativa, seguido por liofilización; ES MS ($m+H^+$)⁺ 1722,3.

Ejemplo comparativo 9b

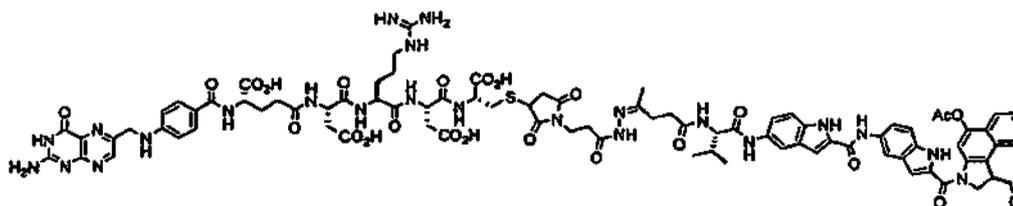


Ejemplo comparativo 9c



- 5 Los compuestos de los Ejemplos 9b y 9c se prepararon a partir de derivados de doxorubicina (14-hidroxi-daunomicina) de acuerdo con el procedimiento descrito en general en el Ejemplo 9a.

Ejemplo comparativo 10a



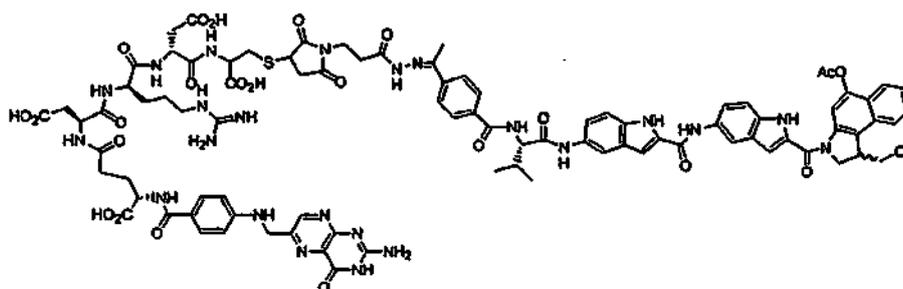
- 10 El análogo 5''-(*N*-Boc)amino del potente fármaco citotóxico bis-indolil-seco-1,2,9,9a-tetrahidrociclopropa [c]benz[e]indol-4-ona (bis-indolil-seco-CBI) se preparó de acuerdo con a una ligera modificación del procedimiento descrito por primera vez por D. Boger y col., J. Org. Chem., 1992, 57, 2873

- El fragmento de péptido, Pte- γ -Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-OH, se preparó mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando la estrategia con Fmoc sobre la resina H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-resina sensible a ácidos, como se describe de manera general en el Esquema 12. Se aplicó PyBop como reactivo activante para garantizar suficiente acoplamiento con bajos equivalentes de aminoácidos. Se usaron Fmoc-Asp(O \i Bu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu-OtBu, y *N*¹⁰-TFA-Pte-OH como bloques de construcción de aminoácido protegido. Los grupos protectores Fmoc se eliminaron después de cada etapa de acoplamiento en condiciones normalizadas (piperidina al 20% en DMF). Tras la última etapa de ensamblado el péptido se escindió del soporte polimérico por tratamiento con ácido trifluoroacético, etanodiol y triisopropilsilano. Esta reacción también consiguió la eliminación simultánea de los grupos protectores *t*-Bu y *t*-Boc. El péptido bruto se purificó mediante HPLC preparativa para dar *N*¹⁰-TFA-Pte- γ -Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-OH. El grupo protector de trifluoroacetilo se separó en hidróxido de amonio acuoso (pH=10,0).

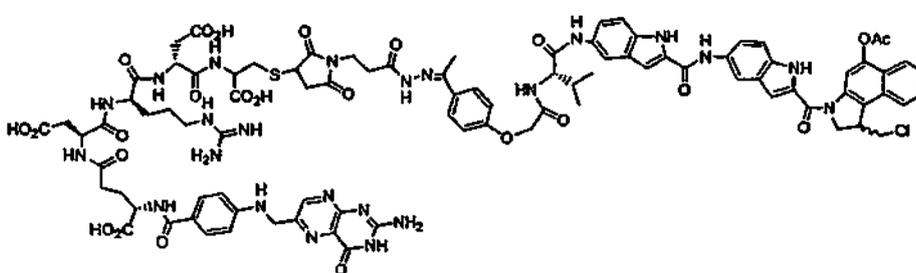
Se sintetizó Lev-Val-OH mediante un protocolo normalizado que incluía la condensación del clorhidrato del éster metílico de valina con ácido levulínico en presencia de EDC y base de Hünig seguido por hidrólisis del éster metílico con hidróxido de litio y agua.

- 5 El ensamblaje final del conjugado complejo se inició con la eliminación del grupo *N*-Boc del 5''-(*N*-Boc) amino-bis-indolil-seco-CBI y acoplamiento del grupo amino liberado con la funcionalidad carboxilo del Lev-Val-OH en presencia de EDC. La formación de la acil hidrazona se llevó a cabo mediante la reacción de la funcionalidad cetona del resto levulínico con 1,2 eq. de ácido β -maleimidopropiónico TFA en tetrahidrofurano. Tras purificación mediante cromatografía (gel de sílice, THF/hexano=1/1) el producto de la reacción anterior se disolvió en DMSO. A esta solución, bajo argón, se añadieron 0,9 eq. de Pte- γ -Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-OH y la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas. El solvente se eliminó por liofilización y el residuo se purificó mediante HPLC.

Ejemplo comparativo 10b

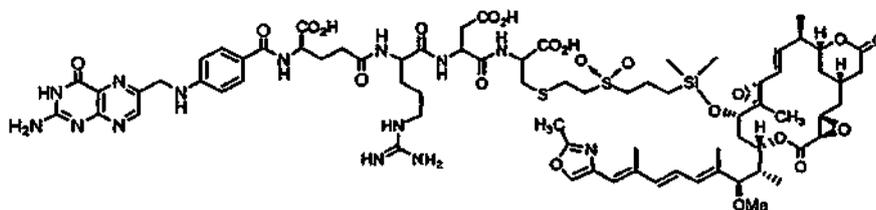


Ejemplo comparativo 10c



- 15 Los compuestos de los Ejemplos 10c y 10c se prepararon a partir de derivados de 5''-(*N*-Boc)amino-bis-indolil-seco-CBI de acuerdo con el procedimiento descrito en general en el Ejemplo 10a.

Ejemplo comparativo 11



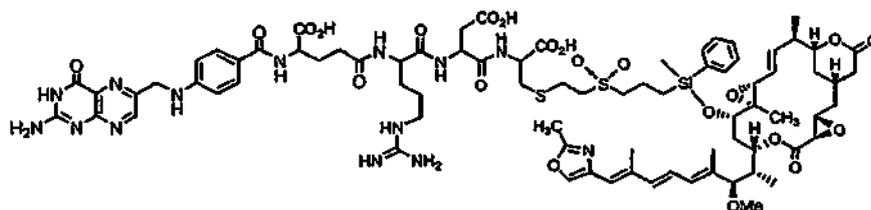
- 20 En presencia de carbonato de potasio, se llevó a cabo la *S*-alquilación del 2-mercaptoetanol con bromuro de alilo. El grupo hidroxilo del sulfuro de alil β -hidroxietilo resultante se intercambió por cloruro mediante cloruro de tionilo. La oxidación de este producto con peróxido de hidrógeno en presencia de anhídrido acético (J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 59) dio como resultado una alil β -cloroetil sulfona. La reacción de este producto con clorodimetilsilano en presencia de una cantidad catalítica de hidrogenohexafluoroplatinato (IV) y temperatura elevada dio el cloruro de 3-(β -cloroetil sulfonil)propildimetilsililo tras la destilación. Este clorosilano sililó el grupo hidroxilo de compuesto fuertemente citotóxico rizoxina usando 1 eq. de piridina como base. El tratamiento del resto β -cloroetil sulfona de esta molécula con un exceso de trietilamina dio como resultado una β -eliminación suave de cloruro de hidrógeno con formación de la respectiva vinil sulfona.

- 30 El otro compañero de reacción, el fragmento de péptido Pte- γ -Glu-Arg-Asp-Cys-OH, se preparó mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando un protocolo con Fmoc, como se describe de manera general en el Ejemplo 2a y en el Esquema 12.

El ensamblaje final del conjugado complejo se consiguió mediante una adición de Michael del grupo del fragmento de péptido al resto vinil sulfona del enlazador de silicio unido a rizoxina. El medio de reacción para esta

transformación fue acetonitrilo/agua 50:50 (pH=7,2). Tras agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, el conjugado final se aisló tras HPLC en una columna preparativa; ES MS (m+H)⁺ 1631,6; (m-H)⁻ 1629,6.

Ejemplo comparativo 12

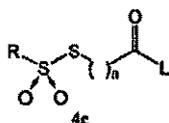
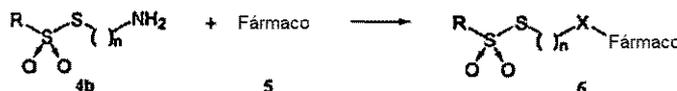
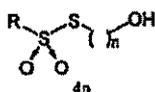


- 5 Este conjugado de rizoxina unida a silicio se sintetizó mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 11, excepto en que se usó clorometilfenilsilano comercial en lugar de clorodimetilsilano.

Ejemplo comparativo 13

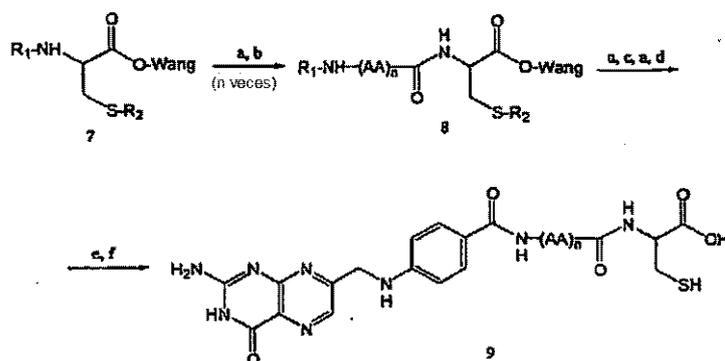
Preparación general de compuestos que contienen un enlace disulfuro procedente de cys.

- 10 Los tiosulfonatos 4 (1 eq.), preparados de acuerdo con el procedimiento de Ranasinghe y Fuchs, Synth. Commun. 18(3), 227-32 (1988) se hicieron reaccionar con fármacos, análogos de fármaco o derivados de fármaco 5 (1 eq.) para preparar los tiosulfonatos de fármaco 6 como solución en metanol, como se muestra en el Esquema 13. R es alquilo o arilo, L es un grupo saliente adecuado, tal como halógeno y pentafluorofenilo, n es un número entero entre 1 y 4, y X es -O-, -NH-, -C(O) son O-, o -C(O)NH-. La conversión se siguió adecuadamente observando la desaparición de cada material de partida mediante TLC (gel de sílice; CHCl₃/MeOH = 9/1). Esquema 13



- 15 El fragmento de peptidilo que contiene folato Pte-Glu-(AA)_n-Cys-OH (9) se preparó mediante un enfoque secuencial soportado en polímero usando la estrategia con Fmoc sobre la resina (7) Fmoc-Cys(Trt)-Wang sensible a ácidos, como se muestra en el Esquema 14. R₁ es Fmoc, R₂ es tritilo, y DIPEA es diisopropiletilamina. Se aplicó PyBop como agente activante para garantizar un acoplamiento suficiente, Los grupos protectores Fmoc se eliminaron después de cada etapa de acoplamiento en condiciones estándar. Se usaron bloques de construcción de aminoácido adecuadamente protegidos, tales como Fmoc-Glu-OtBu, y N¹⁰-TFA-Pte-OH, como se describe en el Esquema 14, y se representa en la etapa (b) por Fmoc-AA-OH. Así, AA se refiere a cualquier material de partida de aminoácido que esté adecuadamente protegido. La secuencia de acoplamiento (etapas (a) y (b)) que implican Fmoc-AA-OH se realizan "n" veces para preparar el péptido 8 sobre soporte sólido, donde n es un número entero y puede ser igual a 0 a aproximadamente 100. Tras la última etapa de acoplamiento, el grupo Fmoc restante se retira, y el péptido se acopla secuencialmente a un derivado de glutamato (etapa (c)), se desprotege y se acopla a ácido pterico protegido con TFA (etapa (d)). Posteriormente, el péptido se escinde de su soporte polimérico tras el tratamiento con ácido trifluoroacético, etanodiol, y triisopropilsilano (etapa (e)). Estas condiciones de reacción dan como resultado la eliminación simultánea de los grupos protectores t-Bu, t-Boc, y Trt. El grupo protector TFA se elimina después del tratamiento con base (etapa (f)) para dar el fragmento de peptidilo 9 que contiene Cys y que contiene folato
- 20
- 25
- 30

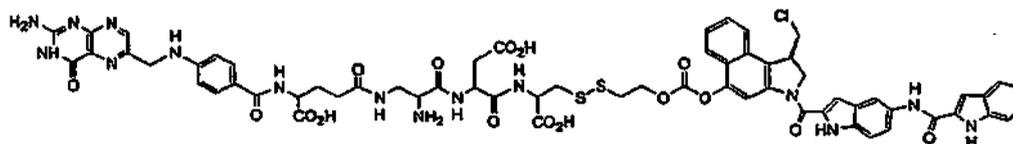
Esquema 14



(a) piperidina DMF al 20%; (b) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (c) Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (d) 1. N^{10} (TFA)-Pte-OH; PyBop, DIPEA, DMSO; (e) TFAA, $(\text{CH}_2\text{SH})_2$, $i\text{-Pr}_3\text{SiH}$; (f) NH_4OH , pH 10,3.

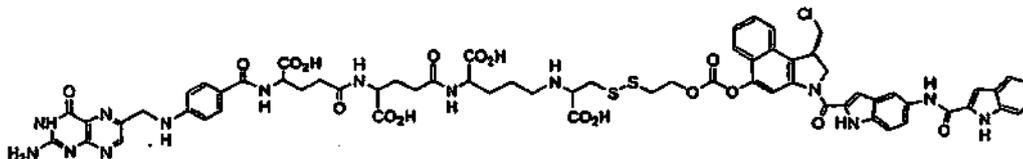
- 5 Los conjugados de fármaco se prepararon haciendo reaccionar el derivado de folato 9 (0,9 - 0,95 eq.) con el tiosulfonato del fármaco 6 en agua desionizada (0,04 M, pH ajustado a 7 con NaHCO_3 0,1 N) bajo argón durante aproximadamente 30 minutos, formando un enlace disulfuro. Tras evaporación del metanol *a vacío*, el conjugado se puede purificar mediante HPLC preparativa (columna Prep Novapak HR C18 19 X 300 mM; fase móvil (A)-1,0 mM tampón fosfato, pH = 6; fase orgánica (B)-acetonitrilo; condiciones del gradiente de 99% A y 1% B a 50% A y 50% B en 30 minutos, caudal = 15 ml/minuto).

Ejemplo comparativo 14a



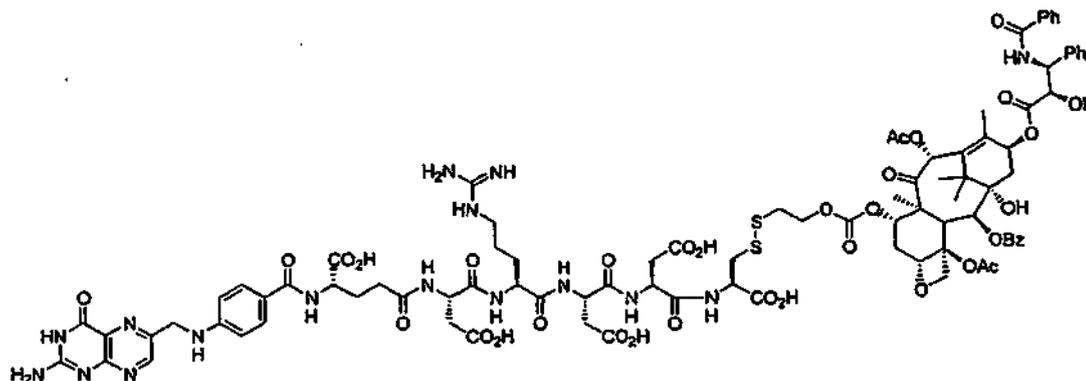
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ 4,7 (d, 1H), 4,95 (t, 1H), 6,7 (d, 4H), 6,9 (t, 1H), 7,95 (d, 2H), 8,1 (d, 2H), 8,2 (m, 1H), 8,3 (s, 1H), 8,4 (s, 1H), 8,7 (s, 1H), 10,2 (s, 1H), 11,8 (d, 2H).

15 Ejemplo comparativo 14b



ES MS (m-H) $^-$ 1436,4, (m+H) $^+$ 1438,3.

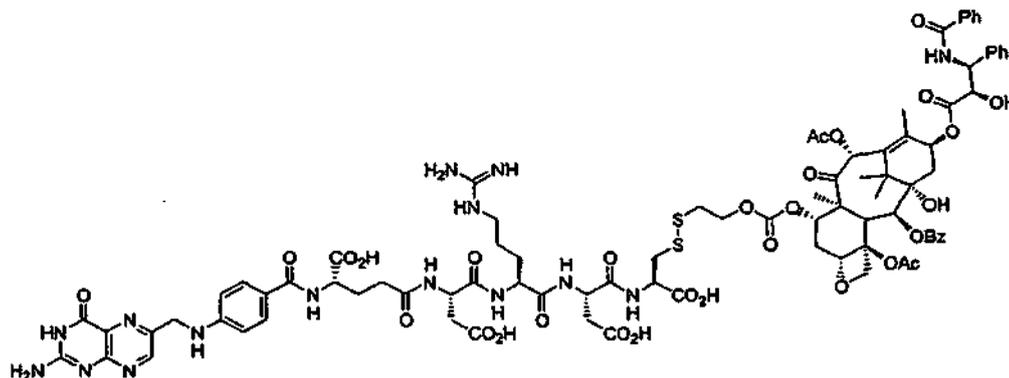
Ejemplo comparativo 14c



- 20 RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$) δ 1,0 (s, 1H), 1,1 (s, 1H), 1,6 (s, 1H), 1,8 (s, 1H), 2,1 (s, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,65 (dd, 2H), 3,7 (d, 1H), 4,4 (t, 1H), 4,55 (q, 2H), 4,6 (d, 2H), 4,95 (d, 1H), 5,9 (t, 1H), 6,15 (s, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,85 (d, 2H), 7,95 (d,

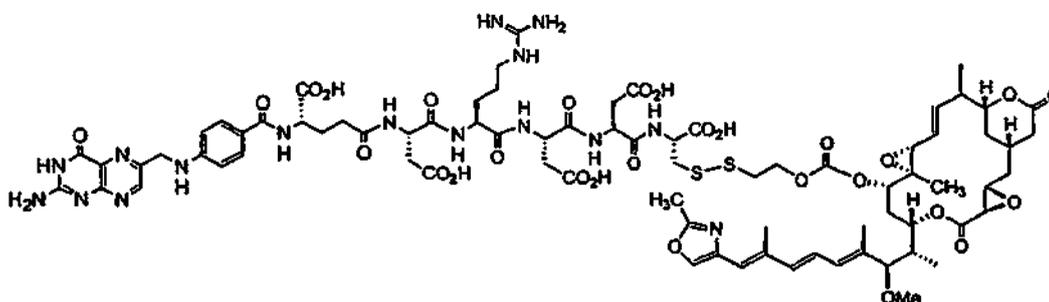
2H), 8,6 (s, 1H), 8,95 (d, 1H).

Ejemplo comparativo 14d



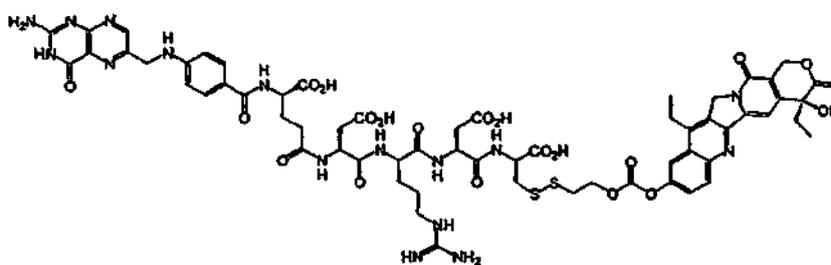
5 RMN ¹H (DMSO-*d*₆/D₂O) δ 1,0 (s, 1H), 1,1 (s, 1H), 1,65 (s, 1H), 2,1 (s, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,6 (dd, 2H), 3,25 (dd, 1H), 3,6 (t, 2H), 3,7 (d, 1H), 4,4 (t, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,95 (d, 1H), 5,9 (t, 1H), 6,2 (s, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,7 (t, 1H), 7,9 (d, 2H), 7,95 (d, 2H), 8,6 (s, 1H), 9,1 (d, 2H).

Ejemplo comparativo 14e



10 RMN ¹H (DMSO-*d*₆/D₂O) δ 10,85 (d, 2H), 1,05 (d, 2H), 1,2 (d, 2H), 1,7 (d, 2H), 3,95 (d, 1H), 4,05 (dd, 1H), 5,4 (dd, 1H), 5,7 (dd, 1H), 6,65 (d, 2H), 7,6 (d, 2H), 7,95 (s, 1H), 8,65 (s, 1H).

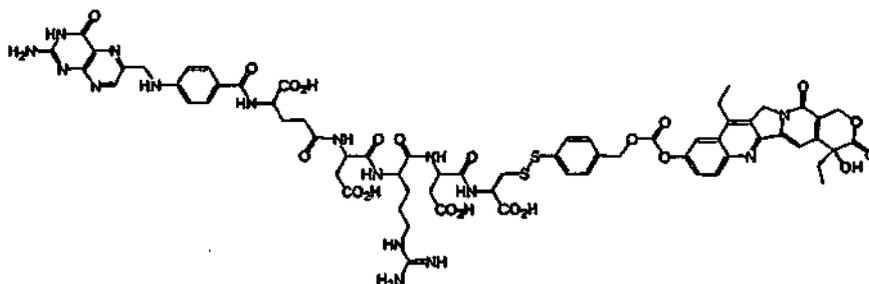
Ejemplo comparativo 14f



ES MS (m+H)⁺ 1487,23; RMN ¹H (DMSO-*d*₆/D₂O) δ 0,9 (t, 2H), 1,3 (t, 2H), 2,15 (t, 2H), 3,2 (dd, 1H), 4,0 (t, 1H), 4,15 (q, 1H), 5,3 (s, 2H), 5,5 (s, 2H), 6,6 (d, 2H), 7,0 (s, 1H), 7,4 (m, 2H), 7,55 (d, 2H), 8,0 (d, 2H), 8,6 (s, 1H).

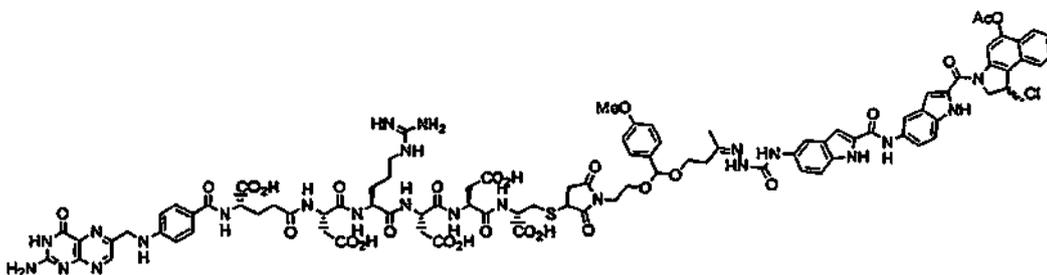
15 Los ejemplos 14a, 14b, 14c, 14d, 14e, y 14f se prepararon mediante el siguiente procedimiento general. A una solución bien agitada del correspondiente fármaco que contiene un grupo -OH (1 eq. en CH₂Cl₂ seco o THF seco) se añadió bajo argón carbonato de 6-(trifluorometil)benzotriazolil 2-(2'-piridilditio)etilo (1,3 eq.) y NN-dimetilaminopiridina (1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h, y el fármaco derivatizado con piridilditio se aisló mediante cromatografía en gel de sílice (> 65% para cada ejemplo). El correspondiente fragmento de peptidilo (0,5 eq.),
 20 preparado de acuerdo con el enfoque general detallado en el Esquema 12, se disolvió en DMSO. A la solución de color amarillo transparente se añadió el fármaco derivatizado con piridilditio. Después de 30 min, se completó la reacción y el conjugado purificado mediante HPLC. En el caso del Ejemplo 14e, el fragmento de peptidilo Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH se disolvió en primer lugar en agua, y el pH de la disolución se ajustó a 2,5 con HCl 0,1 N, provocando la precipitación del fragmento de peptidilo. El fragmento de peptidilo se recogió por centrifugación, se secó y se disolvió en DMSO para reacción posterior con el fármaco derivatizado con piridilditio.
 25

Ejemplo comparativo 15

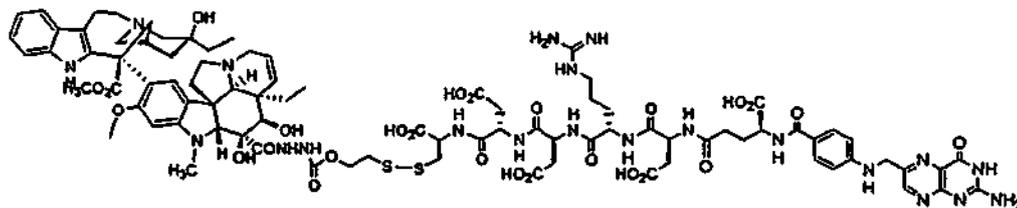


5 El intermedio 4-(2-piridinilditio)benzilcarbonato de SN 38 (10-hidroxi-7-etilcamptotecina) se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito por P. Senter y col., J. Org. Chem. 1990, 55, 2875 El fragmento de peptidilo Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Cys-OH se disolvió en DMSO, y a la solución de color amarillo transparente se añadió fármaco derivatizado con piridilditio. Después de 30 min, la reacción se completó y el conjugado se purificó mediante HPLC; ES MS $(m+H)^+$ 1425,38; RMN 1H (DMSO- d_6 /D $_2$ O) δ 0,9 (t), 1,15 (t), 3,9 (t), 4,0 (t), 4,25 (t), 5,1 (m), 5,2 (s), 5,4 (s), 6,55 (d), 7,25 (d), 7,35 (d), 7,5 (d), 7,9 (d), 8,55 (s).

10 Ejemplo comparativo 16a

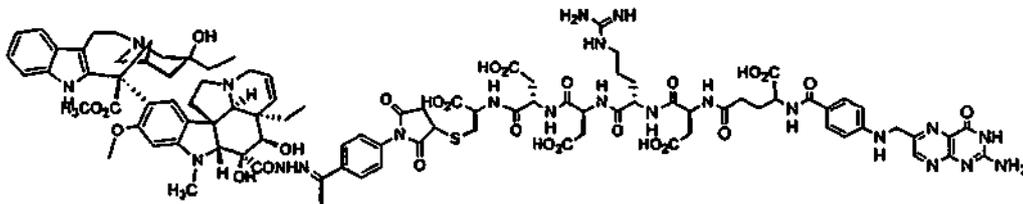


Ejemplo de trabajo 16b



15 Los compuestos de los Ejemplos 16a y 16b se prepararon a partir del fragmento de peptidilo Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH, preparado de acuerdo con el procedimiento general descrito en el Esquema 12. La adición de Michael de este fragmento de peptidilo al derivado maleimido de seco-CBI-bis-indol dio como resultado los conjugados de folato del Ejemplo 16b. El derivado maleimido de seco-CBI-bis-indol, y el tiosulfonato y los intermedios de vinblastina activados con piridilditio se prepararon usando los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva para otros ejemplos.

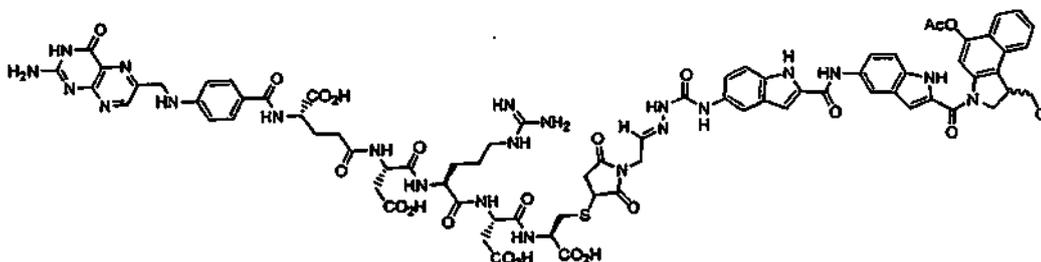
20 Ejemplo comparativo 17a



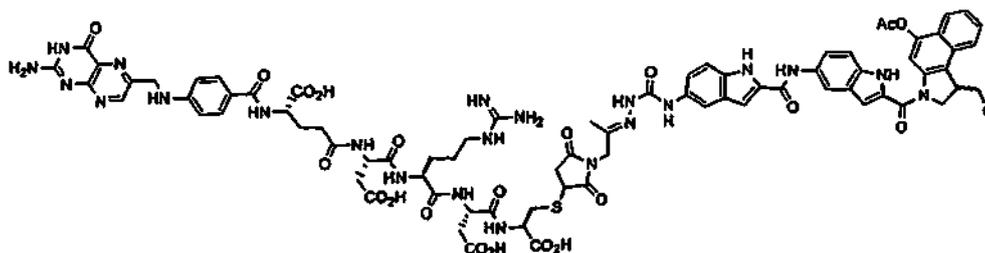
25 La deacetilvinblastina monohidrazida (1 eq.) (véase Barnett y col., J. Med. Chem., 1978, 21, 88) se trató con THF recientemente destilada con 1 eq. de ácido trifluoroacético. Tras agitar durante 10 min la solución se trató con 1,05 eq. de N-(4-acetilfenil)maleimida. La formación de acil hidrazona se completó en 45 min y el solvente se evaporó. El fragmento de peptidilo Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH (0,85 eq.), preparado de acuerdo con el enfoque general

detallado en el Esquema 12, se disolvió en agua, y el pH se ajustó a 2,5 con HCl 0,1 N, ocasionando la precipitación del péptido. El fragmento de peptidilo se recogió mediante centrifugación, se secó y se disolvió en DMSO. A la solución de color amarillo transparente resultante se añadió base de Hünig (15 eq.) y el aducto de Michel de acil hidrazona. Después de 1 h, el conjugado final se purificó mediante HPLC.

5 Ejemplo comparativo 17b



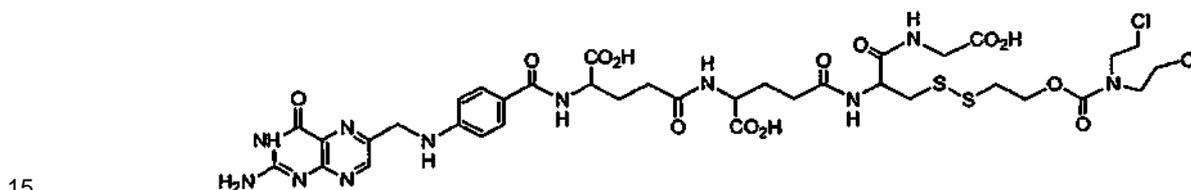
Ejemplo comparativo 17c



10 Los Ejemplos 17b y 17c se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 17a con los correspondientes fragmentos de peptidilo y derivados de monohidrazida de CBI.

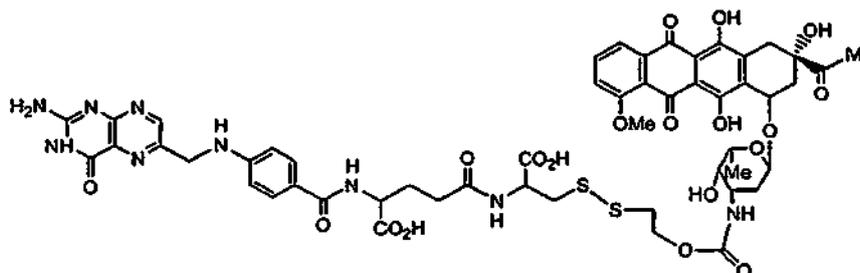
Los compuestos de los Ejemplos 18-41 se han preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en general en el Ejemplo 13. Los Ejemplos 18-41 se caracterizaron mediante espectroscopía de masas con electropulverización (ES MS), y otras técnicas espectroscópicas incluyendo RMN 1D y 2D, y UV.

Ejemplo comparativo 18



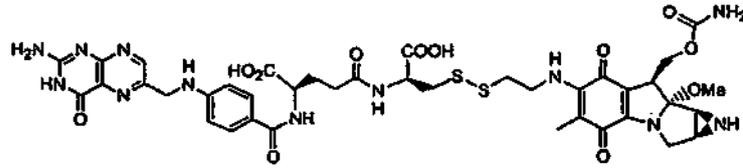
15 ES MS (m+H)⁺ 1071,9, (m+Na)⁺ 1093,9; RMN ¹H (D₂O) δ 2,6 (t, 4H), 2,7 (t, 4H), 4,15 (s, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,75 (d, 2H), 8,15 (d, 2H), 8,9 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 19



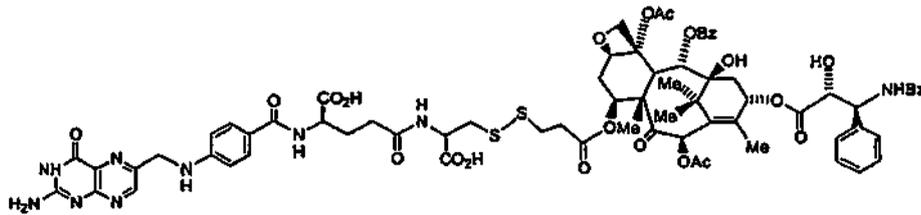
20 UV (nm) 233 (max), 255, 280; RMN ¹H (D₂O, NaOD, CD₃CN) δ 1,15 (d, 3H), 2,3 (s, 3H), 3,6 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 4,9 (s, 1H), 5,3 (s, 1H), 6,5 (d, 2H), 7,3 (m, 1H), 7,5 (d, 2H), 7,65 (d, 2H), 8,4 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 20



ES MS (m-H)⁻ 935,6, (m+H)⁺ 937,4, (m+Na)⁺ 959,5.

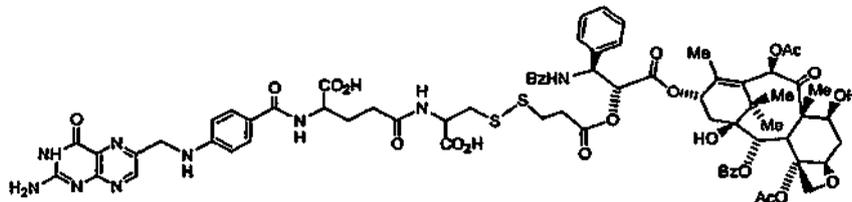
Ejemplo comparativo 21



5

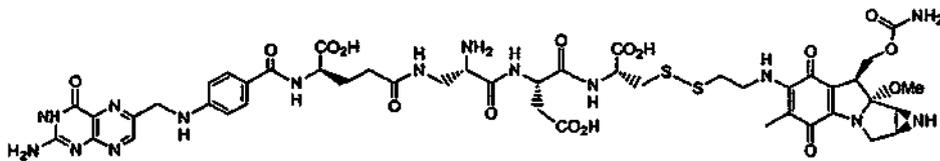
RMN ¹H (D₂O, NaOD, CD₃CN) δ 0,1 (s, 1H), 1,1 (s, 3H), 1,2 (s, 3H), 1,75 (s, 3H), 1,9 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 3,3 (dd, 2H), 3,8 (d, 1H), 4,3 (q, 2H), 4,9 (d, 1H), 5,1 (d, 1H), 5,4 (q, 1H), 5,55 (d, 1H), 5,65 (d, 1H), 6,1 (t, 1H), 6,35 (s, 1H), 6,9 (d, 2H), 7,9 (d, 2H), 8,15 (d, 2H), 8,7 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 22



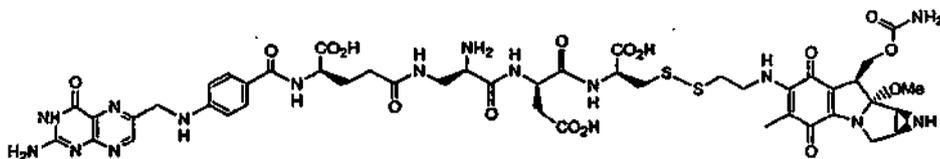
10

Ejemplo comparativo 23



ES MS (m-H)⁻ 1136,5.

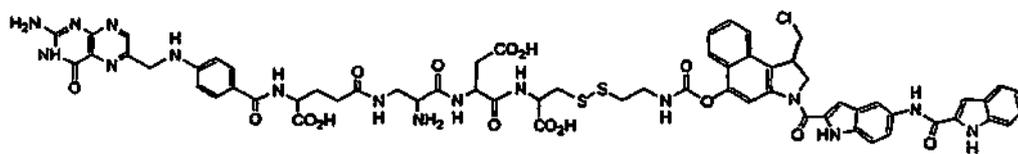
Ejemplo comparativo 24



15

ES MS (m-H)⁻ 1136,3, (m+H)⁺ 1138,0.

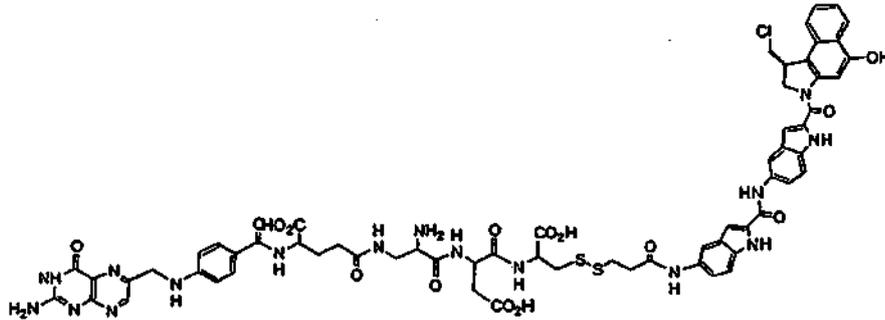
Ejemplo comparativo 25



ES MS (m+H)⁺ 1382,3, (m+Na)⁺ 1405,4.

20

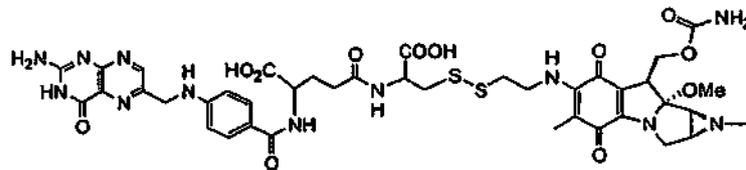
Ejemplo comparativo 26



ES MS (m-H)⁻ 1379,2, (m+H)⁺ 1381,2.

Ejemplo comparativo 27

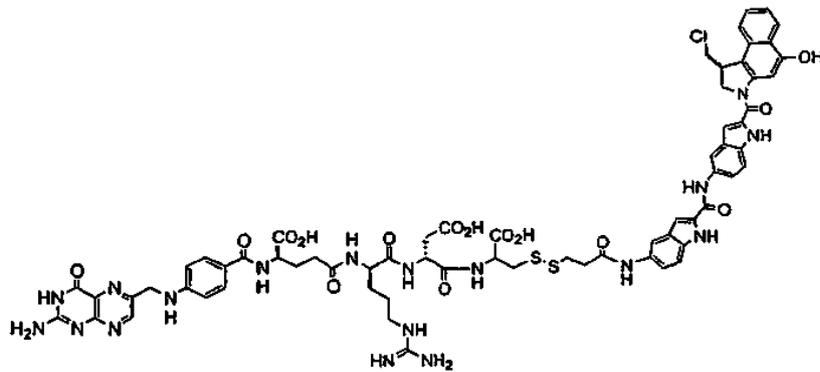
5



ES MS (mH)⁻ 949,2; RMN ¹H (D₂O) δ 1,55 (s, 3H), 1,95 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 2,75 (dd, 2H), 2,95 (dd, 2H), 3,05 (s, 3H), 3,3 (dd, 2H), 3,35 (d, 2H), 3,45 (t, 2H), 4,85 (q, 2H), 6,5 (d, 2H), 7,45 (d, 2H), 8,5 (s, 1H).

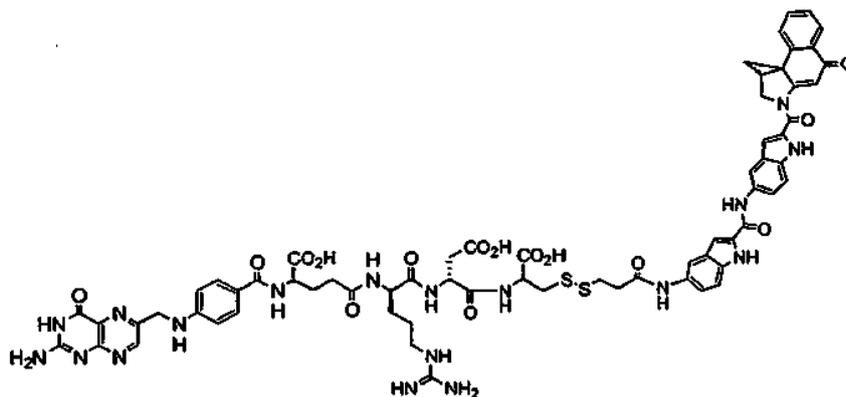
Ejemplo comparativo 28

10



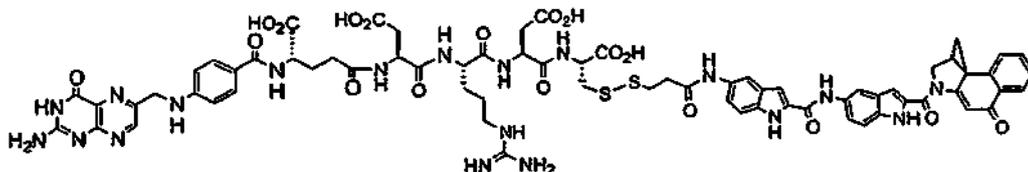
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 1,5 (s), 2,25 (t), 2,75 (m), 3,9 (q), 4,6 (d), 4,85 (t), 6,6 (d), 7,6 (d), 7,9 (d), 8,15 (d), 8,25 (t), 8,65 (s), 8,7 (m), 9,3 (m), 10,2 (t).

Ejemplo comparativo 29



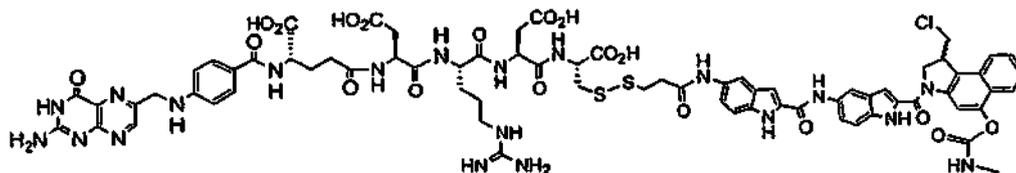
ES MS (m-H)⁻ 1413,5, (m+H)⁺ 1415,3.

Ejemplo comparativo 30



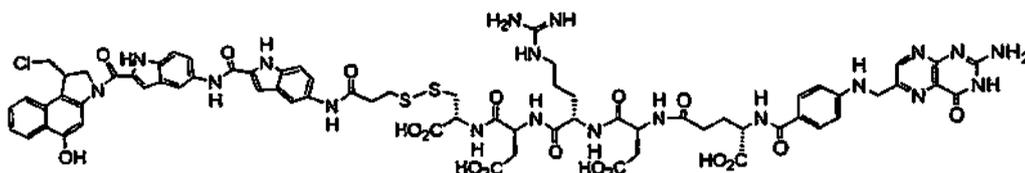
5 ES MS (m+H)⁺ 1530,2; RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O) δ 1,2 (s, 1H), 2,9 (t, 1H), 3,65 (t, 1H), 4,15 (t, 1H), 4,25 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,7 (d, 2H), 7,0 (s, 1H), 8,1 (d, 2H), 8,25 (s, 1H), 8,7 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 31



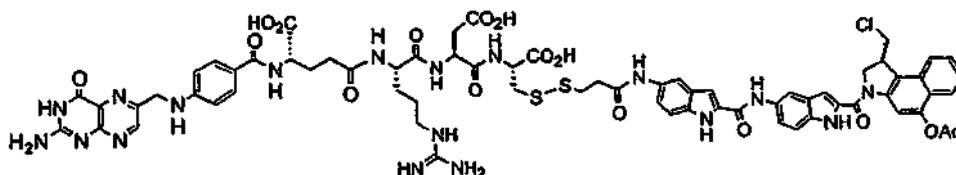
RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 1,75 (s, 1H), 1,85 (s, 1H), 2,1 (t, 2H), 4,3 (t, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,9 (t, 1H), 6,6 (d, 2H), 8,15 (s, 2H), 8,6 (s, 1H).

10 **Ejemplo comparativo 32**



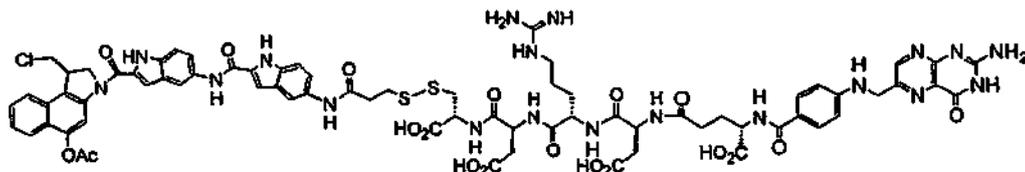
ES MS (m+H)⁺ 1408,4.

Ejemplo comparativo 33



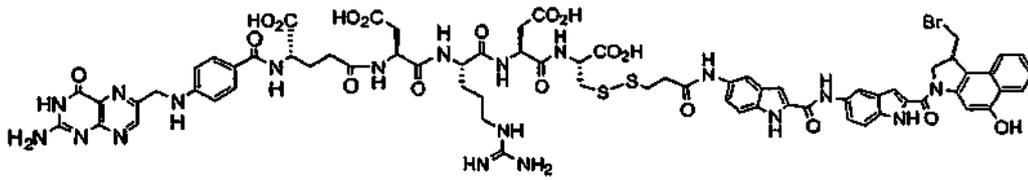
15 ES MS (m-H)⁻ 1491,1, (m+H)⁺ 1493,1; RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O) δ 4,15 (q, 1H), 4,6 (d, 1H), 4,9 (t, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,25 (s, 1H), 7,4 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,95 (d, 2H), 8,15 (d, 2H), 8,6 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 34

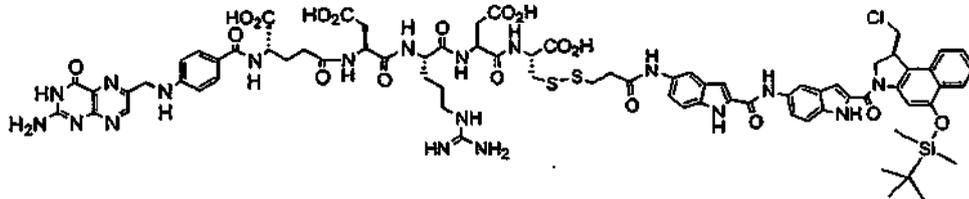


20 RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O) δ 2,1 (t, 2H), 2,75 (q, 2H), 4,3 (t, 1H), 4,65 (d, 1H), 4,9 (t, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,9 (d, 1H), 8,0 (d, 2H), 8,2 (t, 2H), 8,6 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 35

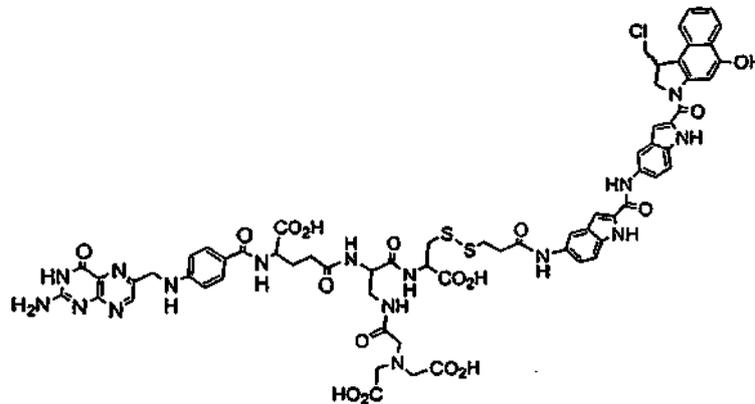


Ejemplo comparativo 36



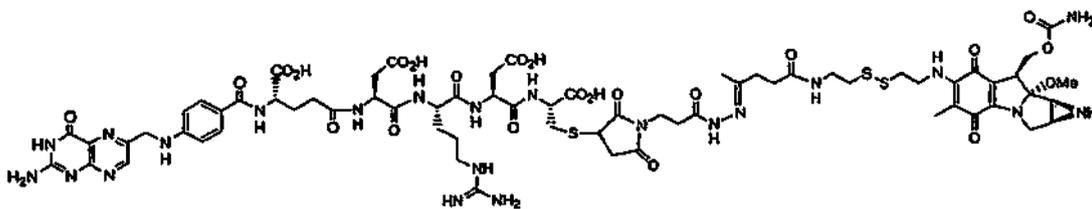
ES MS (m+H)⁺ 1680,4; RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O) δ 0,3 (s, 3H), 0,35 (s, 3H), 1,05 (s, 9H), 2,15 (t, 2H), 4,15 (t, 1H), 4,85 (t, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,55 (t, 4H), 7,9 (d, 1H), 8,0 (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,6 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 37

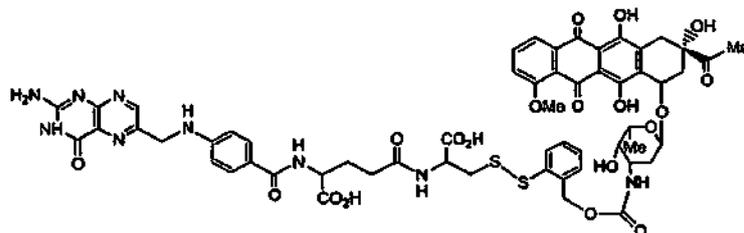


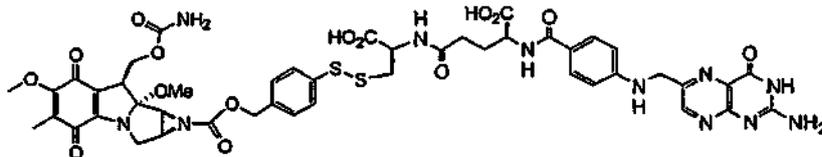
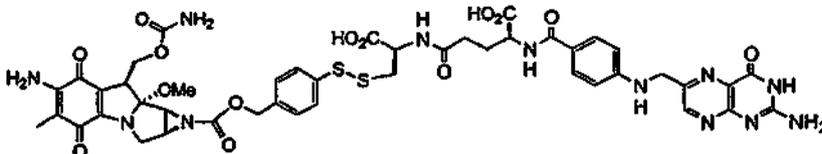
RMN ¹H (DMSO-d₆/D₂O) δ 1,1 (s, 3H), 1,8 (s, 1H), 4,55 (d, 1H), 4,8 (t, 1H), 6,6 (d, 2H), 7,8 (d, 1H), 8,1 (d, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,6 (s, 1H).

Ejemplo comparativo 38



Ejemplo comparativo 39



Ejemplo comparativo 40**Ejemplo comparativo 41****5 Ejemplo comparativo 42****Inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con ec112**

La actividad antitumoral de los compuestos de los Ejemplos 9b (EC111) y 9c (EC 112), en los que el fármaco es daunorubicina, administrados a animales que tenían tumores por vía intravenosa (i.v.) se evaluó en ratones Balb/c con tumores M109 subcutáneos. Cuatro días después de la inoculación del tumor en el tejido subcutáneo de la axila derecha con 1×10^6 células M109, los ratones (5/grupo) se inyectaron i.v. dos veces a la semana durante 4 semanas con 2-10 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto bien del Ejemplo 9b o del Ejemplo 9c o con daunorubicina o PBS no conjugado. Se midió el crecimiento tumoral con calibres en intervalos de 3 días o 4 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la ecuación $V = a \times b^2/2$, en la que "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros. El peso corporal del animal también se determinó en intervalos de 3 días o 4 días.

15 Como se muestra en las Figs. 1 y 2, el tratamiento con el compuesto del Ejemplo 9c fue eficaz para retrasar el crecimiento de los tumores M109 sin toxicidad aparente (basado en el peso corporal de los animales). La doxorubicina no conjugada también proporcionó una respuesta antitumoral, pero con toxicidad concomitante basándose en los pesos corporales.

Ejemplo comparativo 43**20 Inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con ec105**

El protocolo fue como se ha descrito en el Ejemplo 42 excepto que se usó el compuesto del Ejemplo 10a (EC105) en el que el fármaco es bis-indolil-seco-CBI. El compuesto del Ejemplo 10a se inyectó a una dosis de 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. Igualmente, se ensayaron dos modelos de tumor subcutáneo incluyendo el modelo M109 (positivo para el receptor de folato) y el modelo 4T1 (negativo para el receptor de folato), y en algunos animales se inyectó simultáneamente un exceso de folato de 67 veces (20 $\mu\text{mol/kg}$; FA) junto con el conjugado (es decir, el compuesto del Ejemplo 10a).

25 Se observó una respuesta antitumoral sorprendente con el compuesto del Ejemplo 10a sin toxicidad aparente basada en el peso corporal de los animales (véase Figs. 3 y 4). La respuesta antitumoral con el compuesto del Ejemplo 10a se bloqueó con un exceso de folato libre, demostrando la especificidad de la respuesta (véase Fig. 3). Como se muestra en la Fig. 5, no se observó actividad antitumoral en el modelo 4T1 (negativo para el receptor de folato) demostrando de nuevo la especificidad de la respuesta.

Ejemplo de trabajo 44**Inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con ec145**

35 La actividad antitumoral del compuesto del Ejemplo 16b (EC145), cuyo fármaco es deacetilvinblastina monohidrazida, administrada a animales que tenían tumores por vía intravenosa (i.v.) se evaluó en ratones Balb/c con tumores M109 subcutáneos. Aproximadamente 11 días después de la inoculación del tumor en el tejido subcutáneo de la axila derecha con 1×10^6 células M109 (volumen promedio del tumor a $t_0 = 60 \text{ mm}^3$), los ratones (5/grupo) se inyectaron i.v. dos veces a la semana (BIW), durante 3 semanas con 1500 nmol/kg de EC145 o con una dosis de igual volumen de PBS (control). Se midió el crecimiento tumoral con calibres en intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la ecuación $V = a \times b^2/2$, en la que "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

40 Como se muestra en la Fig. 6, el tratamiento con EC 145 fue eficaz para retrasar el crecimiento de los tumores M109 en comparación al crecimiento de los tumores M109 en animales tratados con solución salina.

Ejemplo comparativo 45**Inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con ec140**

La actividad antitumoral del compuesto del Ejemplo 17a (EC140), cuyo fármaco es deacetilvinblastina monohidrazida, administrada a animales que tenían tumores por vía intravenosa (i.v.) se evaluó en ratones Balb/c con tumores M109 subcutáneos. Aproximadamente 11 días después de la inoculación del tumor en el tejido subcutáneo de la axila derecha con 1×10^6 M109 células M109 (volumen promedio del tumor a $t_0 = 60 \text{ mm}^3$), los ratones (5/grupo) se inyectaron i.v. tres veces a la semana (TIW), durante 3 semanas con 1500 nmol/kg de EC140 o con una dosis de igual volumen de PBS (control). Se midió el crecimiento tumoral con calibres en intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la ecuación $V = a \times b^2/2$, en la que "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

Como se muestra en la Fig. 7, el tratamiento con EC 140 fue eficaz para retrasar el crecimiento de los tumores M109 en comparación al crecimiento de los tumores M109 en animales tratados con solución salina.

Ejemplo comparativo 46**Inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con ec136**

La actividad antitumoral del compuesto del Ejemplo 10b (EC136), cuyo fármaco es CBI, administrada a animales que tenían tumores por vía intravenosa (i.v.) se evaluó en ratones DBA con tumores L1210A subcutáneos. Aproximadamente 5 días después de la inoculación de $0,25 \times 10^5$ células L1210A en el tejido subcutáneo de la axila derecha (volumen promedio del tumor a $t_0 \sim 50 \text{ mm}^3$; 5 ratones/grupo) los animales inyectaron i.v. tres veces a la semana (TIW), durante 3 semanas con 400 nmol/kg del EC136 o con una dosis de igual volumen de PBS (control). Se midió el crecimiento tumoral con calibres en intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes del tumor se calcularon mediante la ecuación $V = a \times b^2/2$, en la que "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

Como se muestra en la Fig. 8, el tratamiento con EC136 fue eficaz para retrasar el crecimiento de los tumores L1210A en comparación al crecimiento de los tumores L1210A en animales tratados con solución salina.

Ejemplo comparativo y de trabajo 47**Inhibición de la síntesis del ADN celular mediante varios conjugados -fármaco**

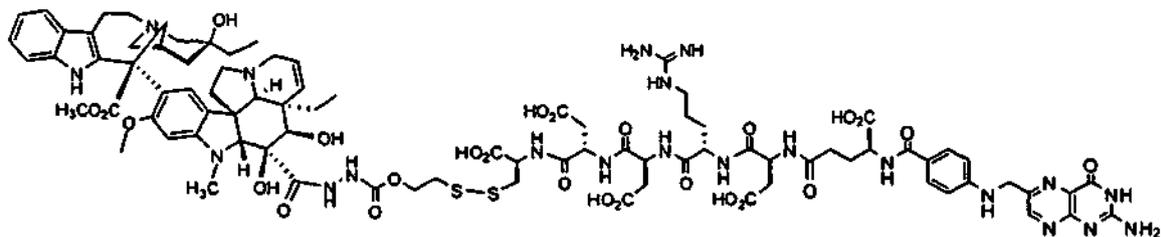
Los compuestos de los Ejemplos 17b, 10b, 16a, 10c, 17a, 16b, 14e, y 15 (EC135, EC136, EC137, EC138, EC140, EC145, EC158, y EC159, respectivamente) se evaluaron usando un ensayo de citotoxicidad *in vitro* que predice la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento de las células KB positivas para el receptor de folato. Los compuestos estaban comprendidos por folato enlazado al respectivo fármaco quimioterapéutico, preparado de acuerdo con los protocolos descritos en la presente memoria descriptiva. Las células KB se expusieron durante hasta 7 h a 37°C a las concentraciones indicadas de conjugado folato-fármaco (véanse los ejes x de los gráficos mostrados en las en Figs. 9-16) en ausencia o presencia de un exceso de al menos 100 veces de ácido fólico. Las células se aclararon a continuación una vez con medio de cultivo reciente, y se incubó en medio de cultivo reciente durante 72 horas a 37 °C. Se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de incorporación de ^3H -timidina.

Como se muestra en las Figs. 9-16, se pudo medir la citotoxicidad dependiente de la dosis y, en la mayoría de los casos, los valores CI_{50} (concentración de conjugado de fármaco necesaria para reducir la incorporación de ^3H -timidina en el ADN recientemente sintetizado en un 50%) estuvieron en el intervalo nanomolar bajo. Además, las citotoxicidades de estos conjugados se redujeron en presencia de exceso de ácido fólico libre, indicando que la muerte celular observada estuvo mediada por la unión al receptor folato.

Se obtuvieron resultados similares en este tipo de ensayo usando EC158 y líneas celulares incluyendo IGROV (línea celular conocida), A549-Clone-4 (células A549 transfectadas con ADNc del receptor de folato humano), New Line-01 (mutante celular Line-01 seleccionado *in vivo* por la expresión del receptor de receptor), M109, 4T1 Clone-2 (células 4T1 transfectadas con ADNc del receptor de folato murino), y células HeLa.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado para administrar fármaco que tiene la fórmula



2. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado para administrar fármaco de la reivindicación 1 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para el mismo.

5 3. Uso del conjugado para administrar fármaco de la reivindicación 1 o de la composición de la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente.

4. El conjugado para administrar fármaco de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 2, para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente.

10 5. El uso de la reivindicación 3 o el conjugado para administrar fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer se ha seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer oral, de tiroides, endocrino, de piel, gástrico, esofágico, laríngeo, pancreático, de colon, de vejiga, óseo, de ovario, cervical, de útero, de mama, testicular, de próstata, rectal, de riñón, de hígado y de pulmón.

6. El uso de la reivindicación 3 o el conjugado para administrar fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de ovario.

15 7. El uso de la reivindicación 3 o el conjugado para administrar fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de mama.

8. El uso de la reivindicación 3 o el conjugado para administrar fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de pulmón.

Efecto de EC111 y EC112 sobre el volumen del tumor

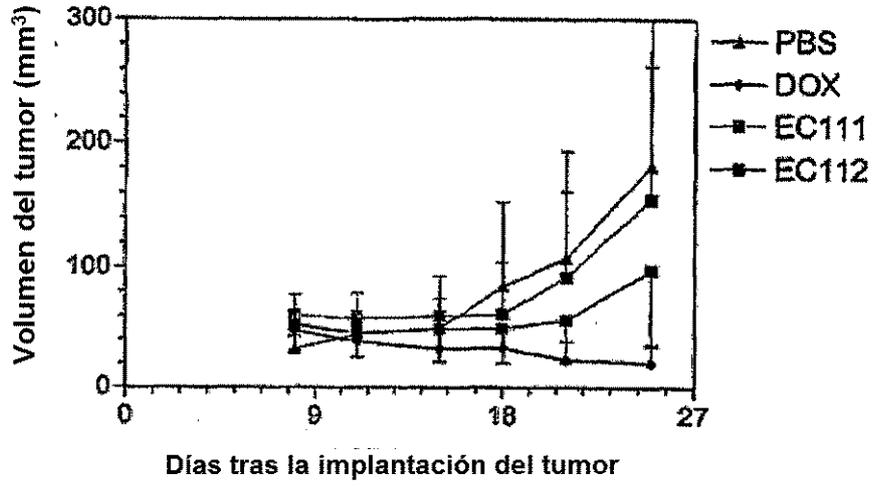


Fig. 1

Efecto de EC111 y EC112 sobre el peso corporal

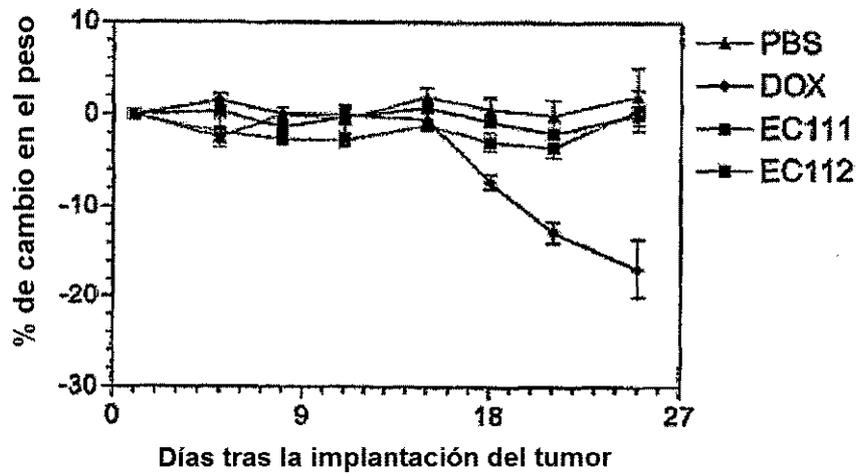


Fig. 2

Efecto de EC105 (300 nmoles/kg) sobre el volumen del tumor M109

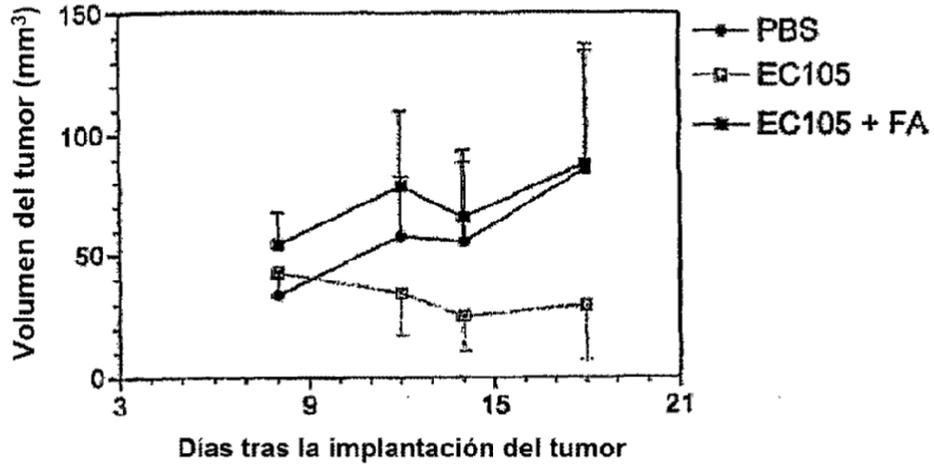


Fig. 3

Efecto de EC105 (300 nmoles/kg) sobre los pesos corporales

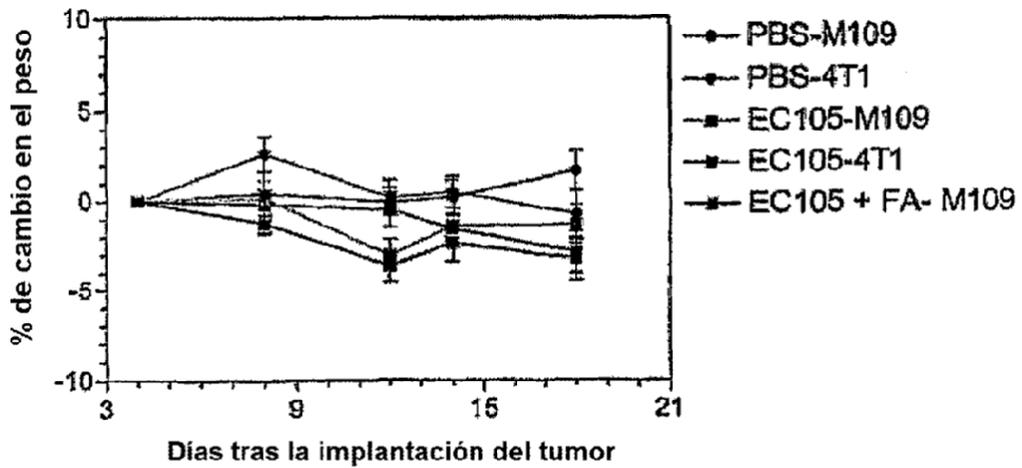


Fig. 4

Efecto de EC105 (300 nmoles/kg) sobre el volumen del tumor 4T1

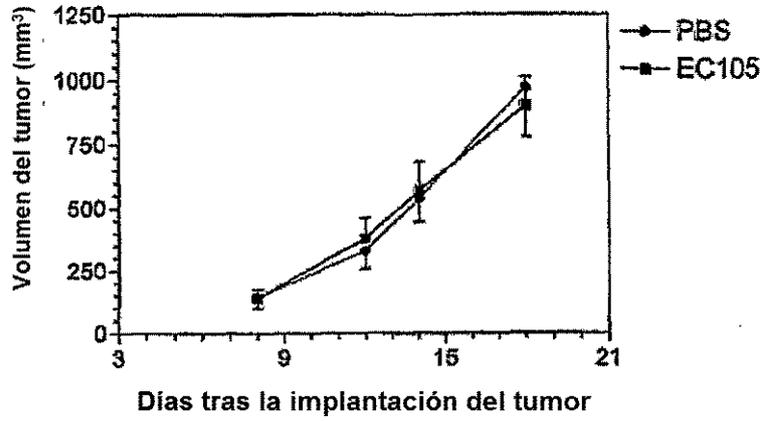


Fig. 5

Volúmenes de tumor

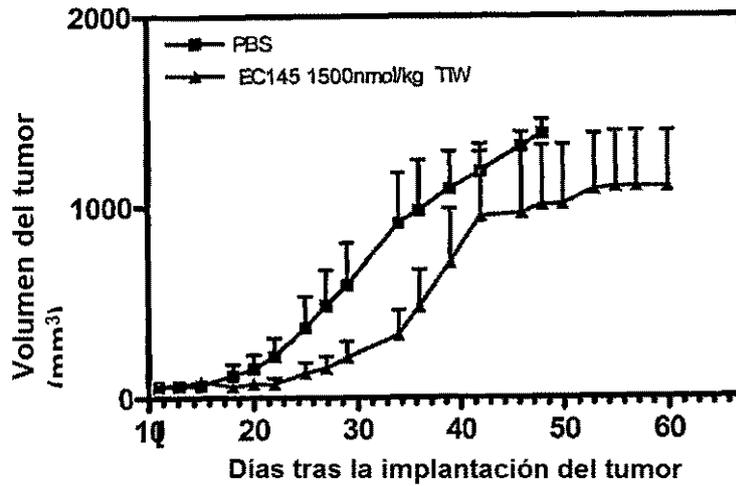


Fig. 6

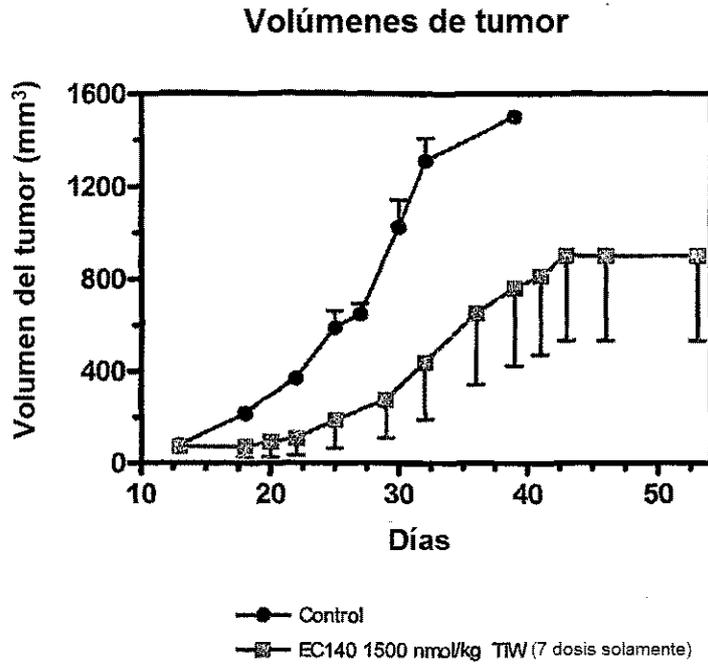


Fig. 7

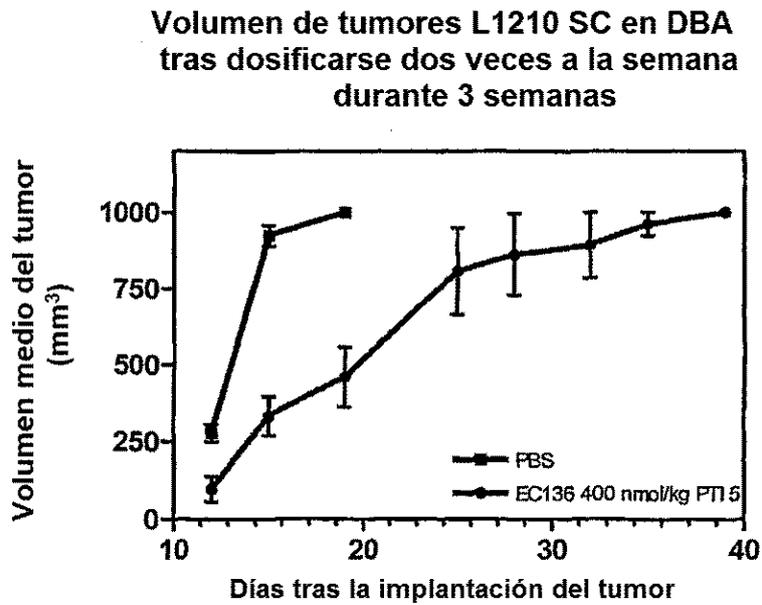


Fig. 8

Actividad de EC 135 contra células KB

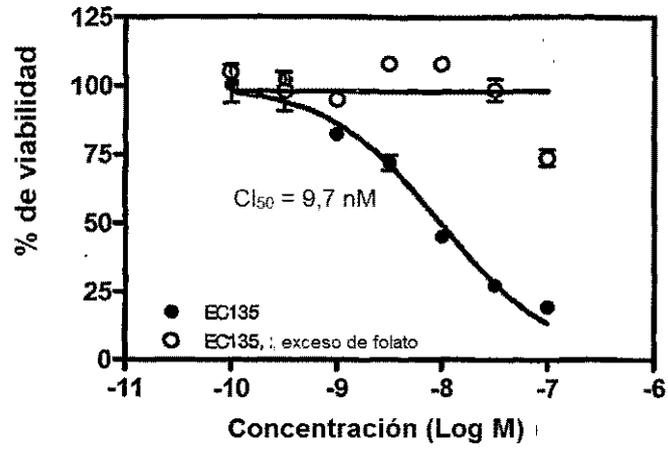


Fig. 9

Actividad de EC136 contra células KB

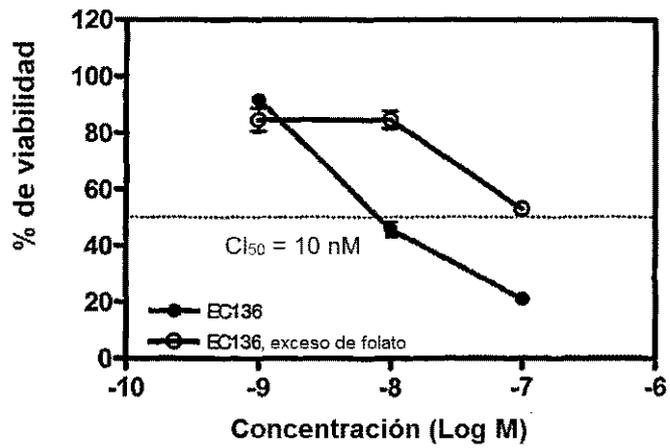


Fig. 10

Actividad de EC137 contra células KB

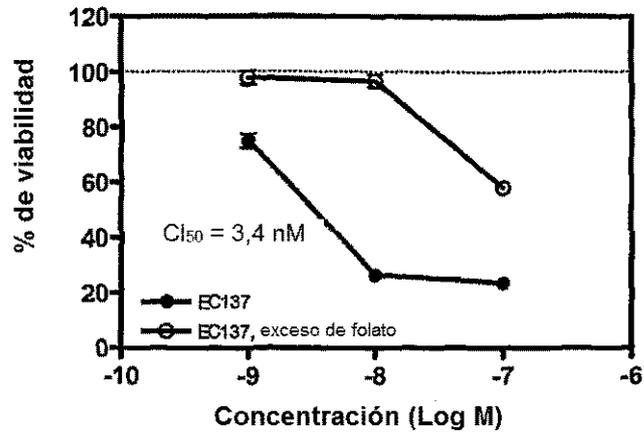


Fig. 11

Actividad de EC138 contra células KB

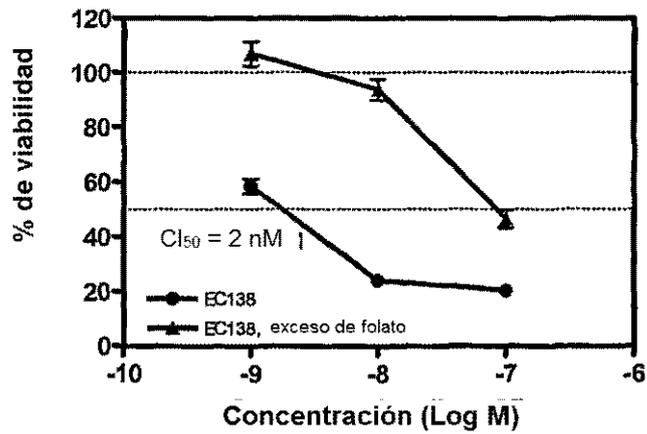


Fig. 12

Actividad de EC140 contra células KB

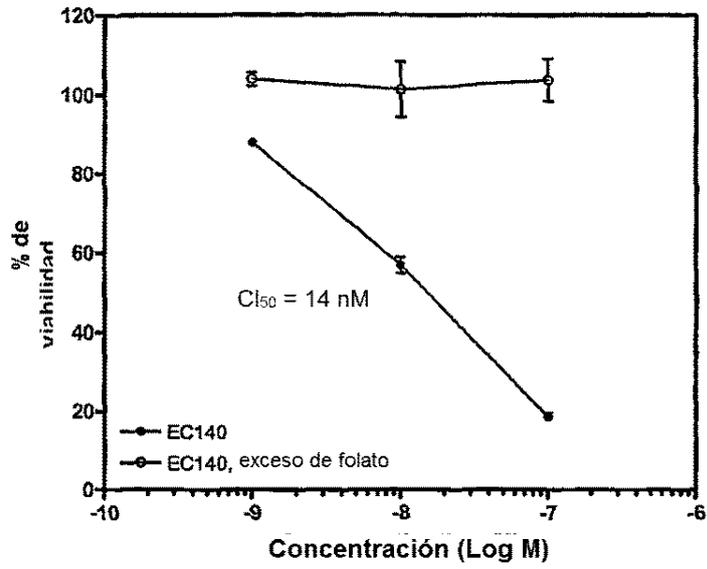


Fig. 13

Actividad de EC145 contra células KB

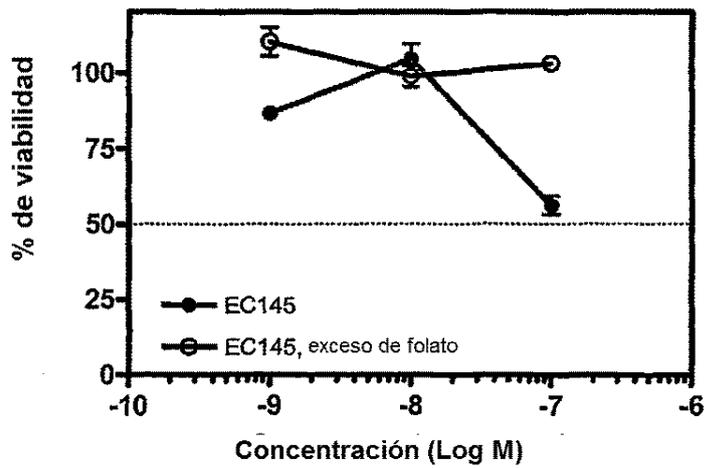


Fig. 14

Actividad de EC158 contra células KB

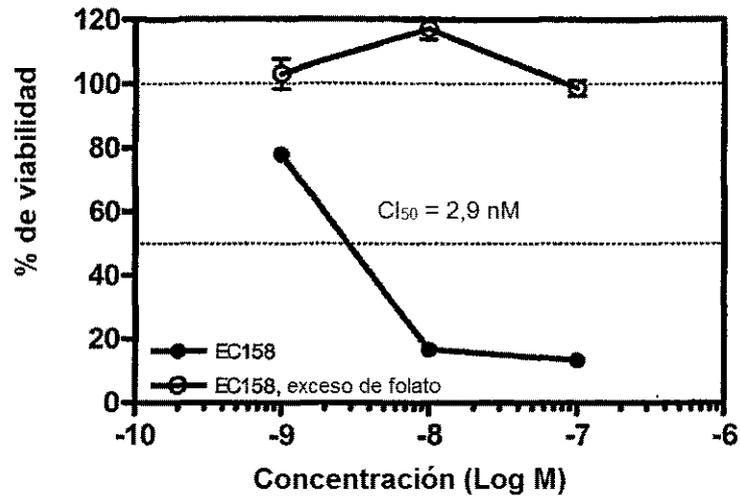


Fig. 15

Actividad de EC159 contra células KB

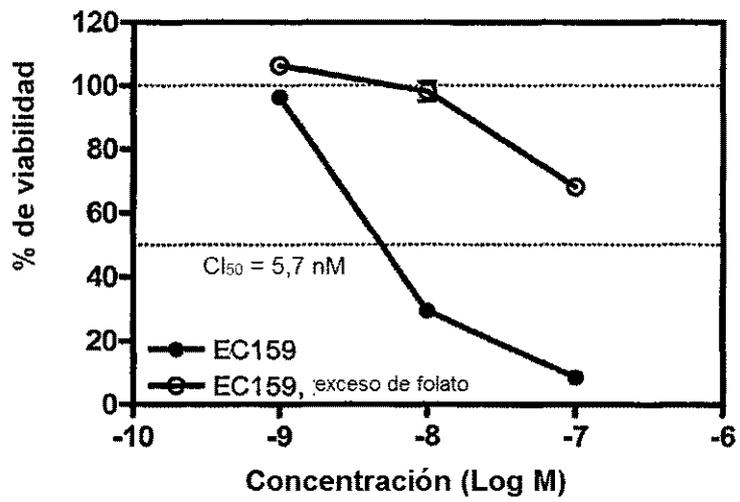


Fig. 16