

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 254**

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: **30.09.2010 E 10012573 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2436398**

54 Título: **Conjugados de amatoxinas con ligadores mejorados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.04.2013**

73 Titular/es:

**HEIDELBERG PHARMA AG (100.0%)  
Schriesheimer Strasse 101  
68526 Ladenburg, DE**

72 Inventor/es:

**ANDERL, JAN;  
SIMON, WERNER y  
MÜLLER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 402 254 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Conjugados de amatoxinas con ligadores mejorados

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a terapia tumoral. En un aspecto, la presente invención se refiere a conjugados de una amatoxina y un resto de unión a una diana, por ejemplo un anticuerpo, conectado por un ligador que comprende un resto urea, que son útiles en el tratamiento de cáncer. En un aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados.

**Antecedentes de la invención**

10 Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos. Pueden aislarse de setas *Amanita phalloides* o prepararse sintéticamente. Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de células de mamíferos, y de ese modo también la transcripción y biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido covalentemente, el complejo entre amanitina y ARN polimerasa II es muy fuerte ( $K_D = 3$  nM). La disociación de la amanitina de la enzima es un proceso muy lento, haciendo por tanto que la recuperación de una célula afectada sea improbable. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado, la célula experimentará muerte celular programada (apoptosis).

El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para terapia tumoral ya se había explorado en 1981 acoplado un anticuerpo anti-Thy 1.2 a  $\alpha$ -amanitina usando un ligador unido al anillo de indol del Trp (aminoácido 4; véase la figura 1) a través de diazotación (Davis & Preston, Science 1981, 213, 1385-1388).

20 La solicitud de patente EP 1 859 811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describe conjugados, en los que el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1 de  $\beta$ -amanitina se acopló directamente, es decir, sin una estructura de ligador, a albúmina o a anticuerpo monoclonal HEA125, OKT3 o PA-1. Además, se mostró el efecto inhibitorio de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7), células de linfoma de Burkitt (Raji), y células de linfoma T (Jurkat). Se sugirió el uso de ligadores, incluyendo ligadores que comprenden elementos tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo y similares, pero no se mostraron realmente tales constructos, y no se proporcionaron más detalles, tales como sitios de unión en las amatoxinas.

El documento WO2007/121326 A2 da a conocer un conjugado que comprende un oligonucleótido formador de triple hélice (TFO) que se une de manera covalente al átomo de C gama de beta-amanitina a través de un enlace que contiene amida.

30 Se sabe que las amatoxinas son relativamente no tóxicas cuando se acoplan a portadores de biomoléculas grandes, tales como moléculas de anticuerpos, y que ejercen su actividad citotóxica sólo después de que se escinda el portador de biomoléculas. En vista de la toxicidad de las amatoxinas, particularmente para células del hígado, es de máxima importancia que los conjugados de amatoxina para terapia tumoral dirigida permanezcan altamente estables tras la administración en plasma, y que la liberación de la amatoxina se produzca tras la internalización en las células diana. En este contexto, mejoras menores de la estabilidad del conjugado pueden tener consecuencias drásticas para la ventana terapéutica y la seguridad de los conjugados de amatoxina para enfoques terapéuticos.

**Objeto de la invención**

Por tanto, había una gran necesidad en la técnica anterior de conjugados de resto de unión a una diana-amatoxina que fueran estables en plasma, de modo que se minimicen los efectos secundarios perjudiciales en células no diana.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un resto de unión a una diana unido a través de un ligador L a una amatoxina, en el que el ligador L está conectado a la amatoxina a través de

(i) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;

45 (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

(iii) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;

en cada caso en el que el ligador L está conectado al resto de unión a una diana a través de un resto urea.

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación con amatoxina que comprende un ligador L conectado a una amatoxina a través de

(i) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;

5 (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

(iii) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;

en cada caso en el que el ligador L comprende un derivado de ácido carbámico -NH-C(O)-X, en el que X es un grupo saliente que puede reemplazarse por una amina primaria de un resto de unión a una diana.

10 Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un conjugado de la presente invención, que comprende la etapa de hacer reaccionar una molécula de conjugación con amatoxina de la presente invención con un resto de unión a una diana que comprende un grupo amino primario.

### Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los números en negrita (1 a 8) designan la numeración convencional de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. También se muestran las designaciones convencionales de los átomos en los aminoácidos 1, 3 y 4 (letras griegas  $\alpha$  a  $\gamma$ , letras griegas  $\alpha$  a  $\delta$  y números desde 1' hasta 7', respectivamente).

La figura 2 muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores sobre células SKOV-3 en un ensayo de BrdU tras incubación durante 72 h.

20 La figura 3 muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores sobre células SK-BR-3 en un ensayo de BrdU tras incubación durante 72 h.

La figura 4 muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores sobre células NCI-N87 en un ensayo de BrdU tras incubación durante 72 h.

25 La figura 5 muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores sobre células MDA-MB231 en un ensayo de BrdU tras incubación durante 72 h.

La figura 6 y la figura 7 muestran la cantidad de amanitina liberada de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores tras incubación en plasma durante hasta 14 días.

30 La figura 8 muestra una comparación de la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina-herceptina usando diferentes restos ligadores sobre células SKOV-3 en un ensayo de BrdU antes y después de la incubación en plasma.

La figura 9 muestra una comparación de la actividad de dos conjugados de amanitina-herceptina diferentes usando diferentes restos ligadores *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de SKOV-3.

### Descripción detallada de la invención

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica.

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

40 Durante toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Se citan varios documentos durante todo el texto de esta memoria descriptiva.

45 La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes pasos, se definen diferentes aspectos de la invención en más detalle. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica que se indica que es preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características que se indica que es/son preferida(s) o ventajosa(s).

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un resto de unión a una diana unido a través de un ligador L a una amatoxina, en el que el ligador L está conectado a la amatoxina a través de

(iv) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;

5 (v) un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

(vi) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;

en cada caso en el que el ligador L está conectado al resto de unión a una diana a través de un resto urea.

10 En el contexto de la presente invención, el término "conjugado" se refiere a una molécula que comprende al menos dos moléculas diferentes unidas por un enlace covalente.

El término "resto de unión a una diana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que puede unirse específicamente a una molécula diana o epítipo diana. Los restos de unión a una diana preferidos en el contexto de la presente solicitud son (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; (ii) proteínas de tipo anticuerpo; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a una diana" 15 adecuados para su uso en la presente invención tienen normalmente una masa molecular de 40000 Da (40 kDa) o más.

Tal como se usa en el presente documento, se considera que un primer compuesto (por ejemplo un anticuerpo) "se une específicamente" a un segundo compuesto (por ejemplo un antígeno, tal como una proteína diana), si tiene una constante de disociación  $K_D$  a dicho segundo compuesto de 100  $\mu$ M o menos, preferiblemente 50  $\mu$ M o menos, 20 preferiblemente 30  $\mu$ M o menos, preferiblemente 20  $\mu$ M o menos, preferiblemente 10  $\mu$ M o menos, preferiblemente 5  $\mu$ M o menos, más preferiblemente 1  $\mu$ M o menos, más preferiblemente 900 nM o menos, más preferiblemente 800 nM o menos, más preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 600 nM o menos, más preferiblemente 500 nM o menos, más preferiblemente 400 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 200 nM o menos, incluso más preferiblemente 100 nM o menos, incluso más preferiblemente 90 nM o menos, 25 incluso más preferiblemente 80 nM o menos, incluso más preferiblemente 70 nM o menos, incluso más preferiblemente 60 nM o menos, incluso más preferiblemente 50 nM o menos, incluso más preferiblemente 40 nM o menos, incluso más preferiblemente 30 nM o menos, incluso más preferiblemente 20 nM o menos, e incluso más preferiblemente 10 nM o menos.

30 En el contexto de la presente solicitud, los términos "molécula diana" y "epítipo diana", respectivamente, se refieren a un antígeno y un epítipo de un antígeno, respectivamente, al que se une específicamente un resto de unión a una diana. Preferiblemente, la molécula diana es un antígeno asociado a tumor, en particular un antígeno o un epítipo que está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales en una concentración aumentada y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de células no tumorales. Preferiblemente, dicho antígeno o epítipo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales, pero no en la 35 superficie de células no tumorales. En realizaciones particulares, el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo de HER-2/neu o molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM). En otras realizaciones, dicho antígeno o epítipo se expresa preferencialmente sobre células implicadas en enfermedades autoinmunitarias. En tales realizaciones particulares, el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo del receptor de IL-6 (IL-6R).

40 El término "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. También están comprendidas proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan a través de técnicas incluyendo, por ejemplo, presentación en fago para unirse específicamente a una molécula diana, por ejemplo a la proteína 45 diana Her-2/neu o EPCAM. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. "Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos" adecuados para su uso en la presente invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multispecíficos, humanos, humanizados (en particular injertados con CDR), desinmunizados o 50 quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. *et al.*, 1993), nanocuerpos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

55 En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de la presente invención e incluyen Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos a disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio o bien VL o bien VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender el/los

dominio(s) variable(s) solo(s) o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región de bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que comprende también cualquier combinación de dominio(s) variable(s) con una región de bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3.

- 5 Los anticuerpos que pueden usarse en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de origen humano, de roedor (por ejemplo ratón, rata, cobaya o conejo), de pollo, de cerdo, de oveja, de cabra, de camello, de vaca, de caballo, de burro, de gato o de perro. Se prefiere particularmente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Tal como se usa en el presente documento, los “anticuerpos humanos” incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una  
10 inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe por ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.939.598 de Kucherlapati & Jakobovits.

El término “proteína de tipo anticuerpo” se refiere a una proteína que se ha modificado por ingeniería genética (por ejemplo mediante mutagénesis de bucles) para unirse específicamente a una molécula diana. Normalmente, una  
15 proteína de tipo anticuerpo de ese tipo comprende al menos un bucle de péptido variable unido en ambos extremos a un armazón proteico. Esta restricción estructural doble aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína de tipo anticuerpo frente a niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle de péptido variable consiste normalmente en de 10 a 20 aminoácidos. La proteína de armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Preferiblemente, la proteína de armazón es una proteína globular pequeña. La  
20 proteínas de tipo anticuerpo incluyen anticuerpos, anticualinas, y proteínas de repetición de anquirina diseñadas (para una revisión véase: Binz *et al.* 2005). La proteínas de tipo anticuerpo puede derivarse de bibliotecas de mutantes grandes, por ejemplo pueden cribarse de bibliotecas de presentación de fago grandes y pueden aislarse en analogía a anticuerpos regulares. Además, pueden obtenerse proteínas de unión de tipo anticuerpo mediante mutagénesis combinatoria de residuos expuestos en la superficie en proteínas globulares.

25 El término “aptámero de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha modificado por ingeniería genética a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para que se unan a una molécula diana (para una revisión véase: Brody y Gold, 2000). El aptámero de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. Los aptámeros pueden contener modificaciones, por ejemplo nucleótidos modificados tales como pirimidinas sustituidas con 2'-flúor.

30 Tal como se usa en el presente documento, un “derivado químico” (o de forma abreviada: un “derivado”) de un compuesto se refiere a una especie que tiene una estructura química que es similar al compuesto, que contiene aún al menos un grupo químico no presente en el compuesto y/o deficiente de al menos un grupo químico que está presente en el compuesto. El compuesto con el que se compara el derivado se conoce como el compuesto “original”. Normalmente, un “derivado” puede producirse a partir de un compuesto original en una o más etapas de reacción  
35 química.

Tal como se usa en el presente documento, un “análogo” de un compuesto está estructuralmente relacionado pero no es idéntico al compuesto y presenta al menos una actividad del compuesto. El compuesto con el que se compara el análogo se conoce como el compuesto “original”. Las actividades mencionadas anteriormente incluyen actividad de unión a otro compuesto; actividad inhibitoria, por ejemplo actividad inhibitoria enzimática; efectos tóxicos; actividad de activación, por ejemplo actividad de activación enzimática. No se requiere que el análogo presente una actividad de ese tipo en el mismo grado que el compuesto original. Se considera que un compuesto es un análogo dentro del contexto de la presente solicitud, si presenta la actividad relevante hasta un grado de al menos el 1% (más preferiblemente al menos el 5%, más preferiblemente al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40% y más preferiblemente al menos el 50%) de la actividad del compuesto original. Por tanto, un “análogo de una amatoxina”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que está estructuralmente relacionado con uno cualquiera de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico tal como se muestra en la figura 1 y que presenta al menos el 1% (más preferiblemente al menos el 5%, más preferiblemente al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40% y más preferiblemente al menos el 50%) de la actividad inhibitoria frente a ARN polimerasa II de mamífero en comparación con al menos uno de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico. Un “análogo de una amatoxina” adecuado para su uso en la presente invención puede presentar incluso una actividad inhibitoria mayor frente a ARN polimerasa II de mamífero que uno cualquiera de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina o ácido amanulínico. La actividad inhibitoria podría medirse determinando la concentración a la cual se produce el 50% de inhibición (valor de  $CI_{50}$ ). La actividad inhibitoria frente a ARN polimerasa II de mamífero puede determinarse indirectamente midiendo la actividad inhibitoria sobre la proliferación celular. Un ensayo adecuado para medir la inhibición de la proliferación celular se describe en los ejemplos.

Un “análogo semisintético” se refiere a un análogo que se ha obtenido mediante síntesis química usando compuestos de fuentes naturales (por ejemplo materiales vegetales, cultivos bacterianos o cultivos celulares) como material de partida. Normalmente, un “análogo semisintético” de la presente invención se ha sintetizado partiendo de

un compuesto aislado de una seta de la familia Amanita. En contraposición, un “análogo sintético” se refiere a un análogo sintetizado mediante la denominada síntesis total de bloques de construcción pequeños (normalmente petroquímicos). Habitualmente, esta síntesis total se lleva a cabo sin la ayuda de procesos biológicos.

5 Tal como se usa en el presente documento, un “conjugado de aptámero” se refiere a un conjugado de resto de unión a una diana-toxina en el que el resto de unión a una diana es un aptámero de ácido nucleico según la alternativa anterior (iii).

Un “ligador” en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula que está conectando dos componentes, estando cada uno unido a un extremo del ligador, y que aumenta la distancia entre dos componentes y alivia la interferencia estérica entre estos componentes, tal como en el presente caso entre el resto de unión a una diana y la amatoxina. En ausencia de un ligador, un enlace directo de amatoxina al resto de unión a una diana puede disminuir la capacidad de la amatoxina interactuar con la ARN polimerasa II. En realizaciones particulares, un ligador tiene cadenas continuas de entre 1 y 30 átomos (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 átomos) en su estructura principal, es decir, la longitud del ligador se define como la conexión más corta tal como se mide por el número de átomos o enlaces entre el resto amatoxina y el resto de unión a una diana, en el que un lado de la estructura principal del ligador se ha hecho reaccionar con la amatoxina y el otro lado con un resto de unión a una diana. En el contexto de la presente invención, un ligador es preferiblemente un alquileo  $C_{1-20}$ , heteroalquileo  $C_{1-20}$ , alquenileno  $C_{2-20}$ , heteroalquenileno  $C_{2-20}$ , alquilileno  $C_{2-20}$ , heteroalquilileno  $C_{2-20}$ , cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o un grupo heteroaralquileo, opcionalmente sustituido. El ligador puede contener uno o más elementos estructurales tales como restos carboxamida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo. El ligador también puede contener combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el ligador más de una vez, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el ligador puede comprender un enlace disulfuro. Debe entenderse que el ligador tiene que unirse o bien en una única etapa o bien en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y el resto de unión a una diana. Para ese fin el ligador llevará dos grupos, preferiblemente en un extremo proximal y distal, que pueden formar (i) un enlace covalente con un grupo presente en uno de los componentes que va a unirse, preferiblemente un grupo activado en una amatoxina o el péptido de unión a la diana o (ii) que está activado o puede activarse para formar un enlace covalente con un grupo en una amatoxina. Por consiguiente, se prefiere que los grupos químicos estén en el extremo distal y proximal del ligador, que son el resultado de una reacción de acoplamiento de ese tipo, por ejemplo un enlace éster, un enlace éter, un enlace uretano, un enlace peptídico etc.

En el contexto de la presente invención, el término “amatoxina” incluye todos los péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos tal como se aíslan del género *Amanita* y se describen en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., CRC Crit Rev Biochem. Diciembre de 1978; 5(3):185-260), e incluye adicionalmente todos los derivados químicos de los mismos; adicionalmente todos los análogos semisintéticos de los mismos; adicionalmente todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques de construcción según la estructura madre de los compuestos naturales (cíclicos, 8 aminoácidos), adicionalmente todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de los aminoácidos hidroxilados, adicionalmente todos los análogos sintéticos o semisintéticos, en los que el resto sulfóxido de tioéter se reemplaza por un sulfuro, sulfona, o por átomos diferentes de azufre, por ejemplo un átomo de carbono como en un carbaanálogo de amanitina, en cada caso en el que cualquier derivado o análogo de este tipo es funcionalmente activo inhibiendo la ARN polimerasa II de mamífero.

Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsi péptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamífero. Amatoxinas preferidas son aquéllas con un grupo funcional (por ejemplo un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo de captura de tiol) que puede reaccionar con las moléculas de ligador o restos de unión a una diana tal como se definió anteriormente. Amatoxinas que son particularmente adecuadas para los conjugados de la presente invención son  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\varepsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico tal como se muestra en la figura 1 así como sales, derivados químicos, análogos semisintéticos y análogos sintéticos de los mismos. Amatoxinas particularmente preferidas para su uso en la presente invención son  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina y amaninamida.

En el contexto de la presente invención, el término “conectado al resto de unión a una diana a través de un resto urea” se refiere a una conexión entre el ligador y el resto de unión a una diana, en la que el resto de unión a una diana se une directamente al ligador a través de un grupo -NH-C(O)-NH-.

En realizaciones particulares de la presente invención, el conjugado tiene una estructura seleccionada de una de las siguientes estructuras:

amatoxina-C $\gamma$ (O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;

amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;

amatoxina-C $\delta$ -O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;

amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana; y

amatoxina-C6'-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana.

En realizaciones particulares de la presente invención, el resto de unión a una diana se conecta al ligador L a través de un grupo amino presente en el resto de unión a una diana, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto urea.

En realizaciones particulares de la presente invención, la amatoxina se selecciona de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\varepsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina o ácido amanulínico, o de sales o análogos de los mismos.

En realizaciones particulares de la presente invención, el ligador L comprende uno o más grupos, particularmente uno, dos o tres grupos, seleccionados de la lista de: grupo alquileo, alquencileno, alquinileno, cicloalquileo, heteroalquileo, heteroalquencileno, heteroalquinileno, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo y heteroaralquileo, en el que cada grupo puede estar opcionalmente sustituido independientemente.

El término "alquileo" se refiere a grupos hidrocarbonados saturados de cadena lineal bivalente que tienen desde 1 hasta 20 átomos de carbono, incluyendo grupos que tienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, los grupos alquileo pueden ser grupos alquileo inferiores. El término "alquileo inferior" se refiere a grupos alquileo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, y en determinadas realizaciones desde 1 hasta 5 o de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquileo incluyen, pero no se limitan a, metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), n-propileno, n-butileno, n-pentileno y n-hexileno.

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

Tal como se usa en el presente documento, "cicloalquileo" pretende referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que tal anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero ningún heteroátomo, y en el que tal anillo está completamente saturado, y el término "cicloalquencileno" pretende referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que tal anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero ningún heteroátomo, y en el que tal anillo está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno). Los ejemplos de cicloalquileos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y cicloheptileno. Los ejemplos de cicloalquencilenos incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenileno y ciclohexenileno.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "heterocicloalquileo" y "heterocicloalquencileno" pretenden referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema de anillos monocíclico o policíclico estable, en el que tal anillo tiene entre 3 y aproximadamente 12 átomos, y en el que tal anillo consiste en átomos de carbono y al menos un heteroátomo, particularmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en N, O y S, refiriéndose heterocicloalquileo a un anillo de ese tipo que está completamente insaturado, y refiriéndose heterocicloalquencileno a un anillo que está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno o heteroarileno).

El término "arileno" pretende significar un anillo bivalente o sistema de anillos que es parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que tal anillo o sistema de anillos tiene entre 3 y 20 átomos de carbono, pero no tiene ningún heteroátomo, anillo o sistema de anillos que consiste en un resto aromático tal como se define por la regla de electrones  $\pi$  "4n+2", incluyendo fenileno.

Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarileno" se refiere a un anillo bivalente o sistema de anillos que es parte de cualquier sistema mono o policíclico estable, en el que tal anillo o sistema de anillos tiene entre 3 y 20 átomos, anillo o sistema de anillos que consiste en un resto aromático tal como se define por la regla de electrones  $\pi$  "4n+2" y contiene átomos de carbono y uno o más heteroátomos de nitrógeno, azufre y/o oxígeno.

En el contexto de la presente invención, el término "sustituido" pretende indicar que uno o más hidrógenos presentes en la estructura principal de un ligador se reemplazan por una selección del/de los grupo(s) indicado(s), siempre que la valencia normal del átomo indicado, o que el átomo apropiado del grupo que se sustituye, no se exceda, y que la sustitución de como resultado un compuesto estable. El término "opcionalmente sustituido" pretende significar que el ligador está o bien no sustituido o bien sustituido, tal como se define en el presente documento, con uno o más sustituyentes, tal como se define en el presente documento. Cuando un sustituyente es un grupo ceto (o oxo, es decir, =O), un grupo tio o imino o similar, entonces se reemplazan dos hidrógenos en el átomo de la estructura principal del ligador. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, alquilo, alquencilo, alquinilo,

5 cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, acilo, aroilo, heteroaróilo, carboxilo, alcoxilo, ariloxilo, aciloxilo, aroiloxilo, heteroaroiloxilo, alcoxicarbonilo, halógeno, (tio)éster, ciano, fosforilo, amino, imino, (tio)amido, sulfidrido, alquiltio, aciltio, sulfonilo, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, nitro, azido, haloalquilo, incluyendo perfluoroalquilo (tal como trifluorometilo), haloalcoxilo, alquilsulfanilo, alquilsulfino, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonoamino, fosforilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, alquilcarboxilo, alquilcarboxiamida, oxo, hidroxilo, mercapto, amino (opcionalmente mono o disustituido, por ejemplo por alquilo, arilo o heteroarilo), imino, carboxamida, carbamoilo (opcionalmente mono o disustituido, por ejemplo por alquilo, arilo o heteroarilo), amidino, aminosulfonilo, acilamino, aroilamino, (tio)ureido, aril(tio)ureido, alquil(tio)ureido, cicloalquil(tio)ureido, ariloxilo, aralcoxilo, u  $-O(CH_2)_n-OH$ ,  $-O(CH_2)_n-NH_2$ ,  $-O(CH_2)_nCOOH$ ,  $-(CH_2)_nCOOH$ ,  $-C(O)O(CH_2)_nR$ ,  $-(CH_2)_nN(H)C(O)OR$ , o  $-N(R)S(O)_2R$  en los que n es 1-4 y R se selecciona independientemente de hidrógeno, -alquilo, -alquenilo, -alquinilo, -cicloalquilo, -cicloalquenilo, -(heterocicloalquilo unido a C), -(heterocicloalquenilo unido a C), -arilo y -heteroarilo, estando permitidos múltiples grados de sustitución. Los expertos en la técnica entenderán que sustituyentes, tales como heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, etc., o grupos funcionales tales como -OH, -NHR etc., pueden estar sustituidos por sí mismos, si es apropiado. Los expertos en la técnica entenderán también que los propios restos sustituidos también pueden estar sustituidos cuando sea apropiado.

20 En realizaciones particulares de la presente invención, en las que el ligador L comprende grupos m seleccionados de la lista de: grupo alquileno, alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, heteroalquileno, heteroalquenileno, heteroalquinileno, heterocicloalquileno, arileno, heteroarileno, aralquileno y heteroaralquileno, en los que cada grupo puede estar opcionalmente sustituido independientemente, el ligador comprende además un resto n seleccionado independientemente de uno de los siguientes restos: un resto disulfuro (-S-S-), un resto éter (-O-), un resto tioéter (-S-), un resto amina (-NH-), un resto éster (-O-C(=O)- o -C(=O)-O-), un resto carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un resto uretano (-NH-C(=O)-O- o -O-C(=O)-NH-) y un resto urea (-NH-C(=O)-NH-), en los que m = n+1. En realizaciones particulares, m es 2 y n es 1, o m es 3 y n es 2. En realizaciones particulares, el ligador comprende 2 ó 3 grupos alquileno no sustituidos, y 1 ó 2, respectivamente, restos disulfuro, éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, uretano o urea que unen los grupos alquileno no sustituidos.

En realizaciones particulares de la presente invención, el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo que está presente en una célula tumoral.

30 En realizaciones particulares de la presente invención, el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo de Her-2/neu o molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM).

En realizaciones particulares de la presente invención, el resto de unión a una diana se selecciona del grupo que consiste en: anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; proteína de tipo anticuerpo; y aptámero de ácido nucleico.

35 En realizaciones particulares de la presente invención, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desimmunizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

En realizaciones particulares de la presente invención, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab,  $F(ab')_2$ , Fd, Fv, Fv de cadena sencilla y Fv unidos por disulfuros (dsFv).

40 En realizaciones particulares, el anticuerpo es herceptina o HEA125, o un fragmento de anticuerpo que comprende el fragmento de unión a antígeno de herceptina o HEA125.

45 En realizaciones particulares, se acopla más de una molécula de amatoxina a un resto de unión a una diana. Un aumento del número de amatoxinas por conjugado también aumentará la toxicidad. Por consiguiente, en una realización particular, la razón de resto de unión a una diana con respecto a amatoxina es de entre 1 resto de unión a una diana y entre 2 y 15 moléculas de amatoxina, particularmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15. Para el fin del cálculo de la razón en el caso de dímeros de anticuerpos tales como IgG, se considera el dímero como un resto de unión a una diana.

En realizaciones particulares de la presente invención, el conjugado es para su uso como medicamento.

50 En realizaciones particulares de la presente invención, el conjugado es para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

55 Tal como se usa en el presente documento, un "paciente" significa cualquier mamífero o ave que puede beneficiarse de un tratamiento con los conjugados de resto de unión a una diana-toxina descritos en el presente documento. Preferiblemente, un "paciente" se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo ratón o rata), animales domésticos (incluyendo por ejemplo cobaya, conejo, pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro), o primates incluyendo seres humanos. Se prefiere particularmente que el "paciente" sea un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar”, “que trata” o “tratamiento” de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del/de los trastorno(s) que está(n) tratándose; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del/de los trastorno(s) que está(n) tratándose; (d) limitar o prevenir la recidiva del/de los trastorno(s) en pacientes que han tenido previamente el/los trastorno(s); y (e) limitar o prevenir la recidiva de síntomas en pacientes que eran previamente sintomáticos para el/los trastorno(s).

Tal como se usa en el presente documento, el tratamiento puede comprender administrar un conjugado o una composición farmacéutica según la presente invención a un paciente, en el que “administrar” incluye administración *in vivo*, así como administración directamente a tejido *ex vivo*, tal como injertos en venas.

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

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el fin pretendido. La cantidad eficaz de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que recibe el agente terapéutico, y el fin de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un experto según métodos establecidos en la técnica.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado según la presente invención, que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, disgregantes, adsorbentes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

“Farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se usa en forma de un medicamento administrado de manera sistémica. Esto incluye composiciones parenterales, que comprenden entre otros inyectables e infusiones. Las inyectables se formulan o bien en forma de ampollas o bien como los denominados inyectables listos para usar, por ejemplo jeringuillas listas para usar o jeringuillas de uso único y aparte de esto en frascos perforables para múltiples retiradas. La administración de inyectables puede ser en forma de aplicación subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.c.). En particular, es posible producir las formulaciones de inyección respectivamente adecuadas como una suspensión de cristales, disoluciones, nanopartículas o sistemas dispersados coloidales como, por ejemplo, hidrosoles.

Pueden producirse adicionalmente formulaciones inyectables como concentrados, que pueden disolverse o dispersarse con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también puede prepararse en forma de disoluciones isotónicas, emulsiones grasas, microemulsiones y formulaciones liposomales. Similares a inyectables, también pueden prepararse formulaciones de infusión en forma de concentrados para su dilución. También pueden aplicarse formulaciones inyectables en forma de infusiones permanentes tanto en terapia en pacientes internos como en terapia ambulatoria, por ejemplo a modo de mini-bombas.

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

Los conjugados de resto de unión a una diana-toxina de la invención pueden unirse a microportadores o nanopartículas en composiciones parenterales como, por ejemplo, a partículas finamente dispersadas a base de poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter uretanos. Las formulaciones parenterales también pueden modificarse como preparaciones de depósito, por ejemplo basadas en el “principio de múltiples unidades”, si los conjugados de unión a una diana-toxina de la invención se introducen en forma finamente dispersada, dispersada y suspendida, respectivamente, o como una suspensión de cristales en el medicamento o basada en el “principio de unidad única” si el conjugado de resto de unión a una diana-toxina de la invención se encierra en una formulación, por ejemplo en un comprimido o una varilla que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de unidad única y múltiples unidades a menudo consisten en los denominados polímeros biodegradables como por ejemplo poliésteres de ácido láctico y ácido glicólico, poliéter uretanos, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

Los adyuvantes y portadores añadidos durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas como composiciones parenterales son preferiblemente agua esterilizada, sustancias que influyen en el valor del pH como, por ejemplo bases o ácidos orgánicos o inorgánicos así como sales de los mismos, sustancias tamponantes para ajustar los valores de pH, sustancias para la isotonización como por ejemplo cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, glucosa y fructosa, tensioactivos y surfactantes, respectivamente, y emulsionantes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de polioxietilensorbitanos (por ejemplo,

5 Tween®) o, por ejemplo ésteres de ácido graso de polioxietilenos (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®) así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos como, por ejemplo propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias que forman complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster metílico y éster hidroxipropílico del ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como por ejemplo sulfito de sodio y estabilizantes como por ejemplo EDTA.

10 Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una realización preferida, se añaden agentes espesantes para prevenir la sedimentación de los conjugados de resto de unión a una diana-toxina de la invención o tensioactivos y polielectrolitos para garantizar la resuspendibilidad de sedimentos y/o agentes que forman complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible lograr complejos del principio activo con diversos polímeros. Ejemplos de tales polímeros son polietilenglicol, poliestirol, carboximetilcelulosa, Pluronic® o éster de ácido graso de polietilenglicol sorbitano. Los conjugados de resto de unión a una diana-toxina de la invención también pueden incorporarse en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión por ejemplo con ciclodextrinas. En realizaciones particulares, pueden añadirse agentes de dispersión como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados, pueden usarse agentes de armazón como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

20 En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer un método de tratamiento de cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia, o linfoma maligno en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un conjugado o composición farmacéutica de la presente invención.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación con amatoxina como producto intermedio para la síntesis de los conjugados de la presente invención, en los que la molécula de conjugación con amatoxina comprende un ligador L conectado a una amatoxina a través de

(i) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;

(ii) un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

30 (iii) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;

en cada caso en el que el ligador L comprende un derivado de ácido carbámico -NH-C(O)-X, en el que X es un grupo saliente que puede reemplazarse por una amina primaria de un resto de unión a una diana.

35 En una realización, la molécula de conjugación con amatoxina tiene una estructura seleccionada de una de las siguientes estructuras:

(i) amatoxina-C $\gamma$ (O)-NH-L-NH-C(O)-X;

(ii) amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-L-NH-C(O)-X;

(iii) amatoxina-C $\delta$ -O-L-NH-C(O)-X;

(iv) amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-X; y

40 (v) amatoxina-C6'-O-L-NH-C(O)-X.

En determinadas realizaciones, la amatoxina se selecciona de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina o ácido amanulínico, o de sales o análogos de los mismos.

45 En determinadas realizaciones, el ligador L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquilenilo, heteroalquilenilo, alquinileno, heteroalquinileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroaralquileo, opcionalmente sustituido.

En determinadas realizaciones, el ligador L comprende un resto seleccionado de uno de los siguientes restos: un resto disulfuro, un resto éter, un resto amina, un resto éster, un resto carboxamida, un resto uretano y un resto urea.

50 En determinadas realizaciones, el grupo funcional X se selecciona de: -<sup>t</sup>butiloxilo, -succinimidiloxilo, -1-O-succinimidiloxi-3-sulfonato (-Sulfo-NHS), -O-(4-nitrofeniloxilo), -O-(3-nitrofeniloxilo), -O-(2,4-dinitrofeniloxilo), -O-(2,4-dicloro-6-nitrofeniloxilo), -pentafluorofeniloxilo, -pentaclorofeniloxilo, -O-(2,4,5-triclorofeniloxilo), -O-(3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-ilo), -O-(endo-1-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboximida-1-ilo), -1-ftalimidiloxilo, -1-benzotriazoliloxilo, -1-(7-aza-benzotriazolilo)oxilo y -N-imidazolilo.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar un conjugado de amatoxina de la presente invención, que comprende la etapa de hacer reaccionar una molécula de conjugación con amatoxina de la presente invención con un resto de unión a una diana que comprende un grupo amino primario.

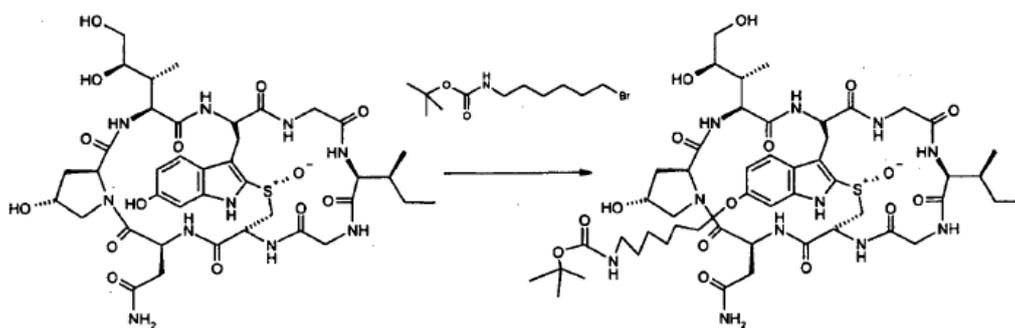
**Ejemplos**

5 A continuación, la invención se explica en más detalles mediante ejemplos no limitativos:

**Ejemplo 1**

Síntesis del conjugado de  $\alpha$ -amanitina-anticuerpo herceptina Her-DSC-30.0134

1.1 Síntesis de 6'-NH-boc-(6-aminohexil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0132



10  $\alpha$ -amanitina HDP 30.0132

Se disolvieron, bajo argón y a temperatura ambiente, 30,00 mg (32,6  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 900  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se añadieron 3,66 mg de terc-butilato de potasio (32,6  $\mu$ mol) y 73,18 mg (261,2  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-Boc-aminohexilo (Fluka 89171). Tras 6 h a temperatura ambiente, se acidificó la mezcla de reacción hasta pH = 5 con 50  $\mu$ l de una disolución de ácido acético 0,33 M en DMSO. Se evaporaron los compuestos volátiles a vacío y se disolvió el residuo en 1000  $\mu$ l de metanol y se diluyó con 20 ml de dietiléter. Se recogió el precipitado y se tomó en 1000  $\mu$ l de metanol. Se diluyó esta disolución con 1000  $\mu$ l de agua y se usó para la purificación en una LaPrep-HPLC:

(columna: Kromasil 100-C18, 250 mm x 20 mm, 10  $\mu$ m, con metanol/agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda$  = 295 nm).

20 Disolvente A: 95% de agua: 5% de metanol:0,05% de ácido trifluoroacético

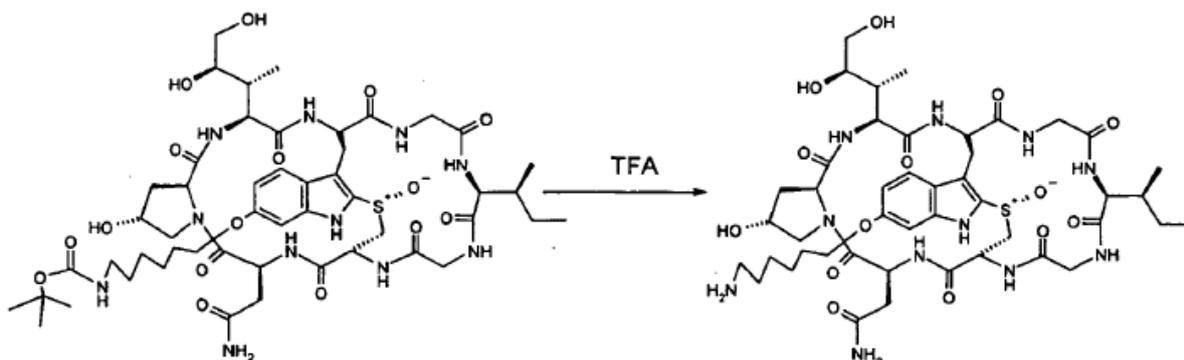
Disolvente B: 10% de agua: 90% de metanol:0,05% de ácido trifluoroacético

gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-40 min. el 0% de A

Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 19,8 min. y se evaporaron los disolventes.

15,9 mg (rendimiento del 43%) de un polvo. EM: 1119 (M+H<sup>+</sup>); 1141 (M+Na<sup>+</sup>)

25 1.2 Síntesis de 6'-(-6-aminohexil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0134



HDP 30.0132 HDP 30.0134

Se disolvieron 9,90 mg (8,85  $\mu$ mol) de 6'-NH-boc-6-aminoheptil- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0132 en 250  $\mu$ l de ácido trifluoroacético. Se agitó la mezcla de reacción bajo argón a temperatura ambiente. Tras 2 min., se eliminó el ácido a vacío a 20°C y se secó el residuo. Se purificó el éter de amanitina en bruto en una LaPrep-HPLC:

- 5 (columna: Kromasil 100-C18, d = 10 mm, 10  $\mu$ m, con metanol/agua (TFA al 0,05%), flujo: 6 ml/min., detección a  $\lambda$  = 295 nm).

Disolvente A: 95% de agua: 5% de metanol:0,05% de ácido trifluoroacético

Disolvente B: 10% de agua: 90% de metanol:0,05% de ácido trifluoroacético

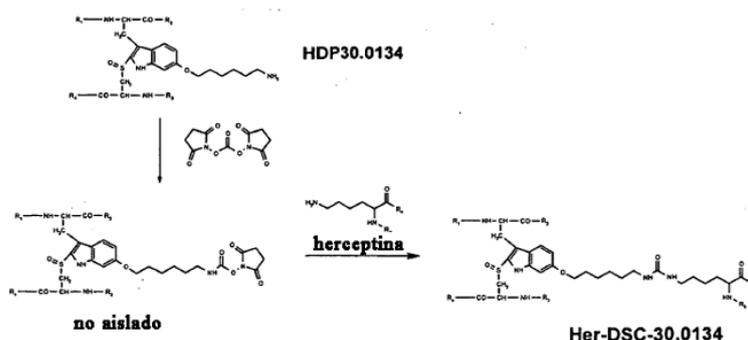
- 10 Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-25 min. el 50% de A; 25-30 min. el 0% de A; 30-35 min. el 0% de A; 35-40 min. el 100% de A, 40-45 min. el 100% de A

Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención (145 min.[14,5??]) y se evaporaron los disolventes.

9,10 mg (rendimiento del 99%) de un polvo blanco. EM: 1019 (M+H+); 1041 (M+Na+)

1.3 Síntesis del derivado Her-DSC-30.0134 de anticuerpo HDP 30.0134

**Esquema 1**



- 15 En el esquema 1 (y otros esquemas mostrados en los ejemplos), se representa la herceptina mediante una fórmula esquemática que muestra una cadena lateral de lisina con R3 y R4 que representan la parte restante de la proteína del anticuerpo herceptina.

1.3.1 Síntesis del conjugado de 6'-(-6-aminoheptil-6-hidroxisuccinimidil)- $\alpha$ -amanitina-herceptina Her-DSC-30.0134 con diferentes cargas de toxina (tabla 2)

- 20 Se disolvieron 5,00 mg de 6'-(-6-aminoheptil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0134 en 538  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) seca. Bajo argón y con agitación a temperatura ambiente, se añadieron de una vez 18,6  $\mu$ l de una disolución de carbonato de dihidroxisuccinimido (DSC) en DMF (2,56 mg en 100  $\mu$ l de DMF) y 10,0  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras 12 h, se añadieron 60 ml de dietiléter frío. Se recogió el precipitado de carbonato de  $\alpha$ -amanitina-6'-(-6-aminoheptil-6-hidroxisuccinimidilo) y se lavó varias veces con dietiléter y se secó a vacío. Se llevó el sólido restante a 750  $\mu$ l de DMF = disolución A.
- 25

Se disolvieron 114,0 mg de herceptina en 19,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) = disolución B.

Tabla 2

Se tratan 3 muestras de la disolución de herceptina con diferentes cantidades de las disoluciones de carbonato de $\alpha$ -amanitina-6'-(-6-aminoheptil-6-hidroxisuccinimidilo):			
Disolución A	Disolución B	Carga de herceptina-ligador de amanitina	Nombre de la muestra
152 $\mu$ l	11,0 ml	1 : 1,3	Her-DSC-30.0134 [1.3]
242 $\mu$ l	5,0 ml	1 : 4,3	Her-DSC-30.0134 [4.3]

(continuación)

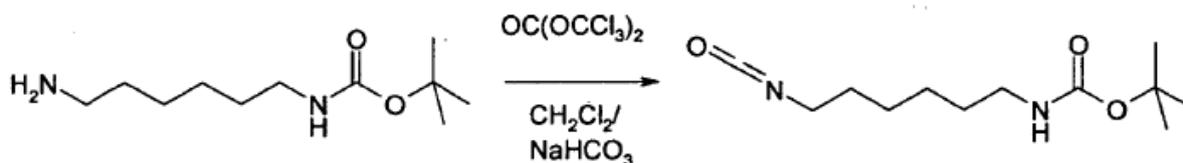
Se tratan 3 muestras de la disolución de herceptina con diferentes cantidades de las disoluciones de carbonato de $\alpha$ -amanitina-6'-(-6-aminohexil-6-hidroxisuccinimidilo):			
Disolución A	Disolución B	Carga de herceptina-ligador de amanitina	Nombre de la muestra
290 $\mu$ l	3,0 ml	1 : 7,5	Her-DSC-30.0134 [7.5]

- 5 Se agitaron las tres disoluciones de herceptina-ligador de amanitina a 4°C durante 14 h y se separaron cada una mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25 (columna XK-16; 2 ml/min.). Se lavó previamente la columna G-25 con 500 ml de disoluciones de PBS, pH = 7,4. Se detectó la fracción de conjugado Her-DSC-30.0134 mediante absorción UV. Se determinó la concentración de proteína mediante ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). Se determinó la carga de amanitina de la herceptina mediante determinación de la absorción UV a  $\lambda = 280$  nm y  $\lambda = 310$  nm.

**Ejemplo 2**

- 10 Síntesis del conjugado de  $\alpha$ -amanitina-anticuerpo herceptina Her-DSC-30.0256

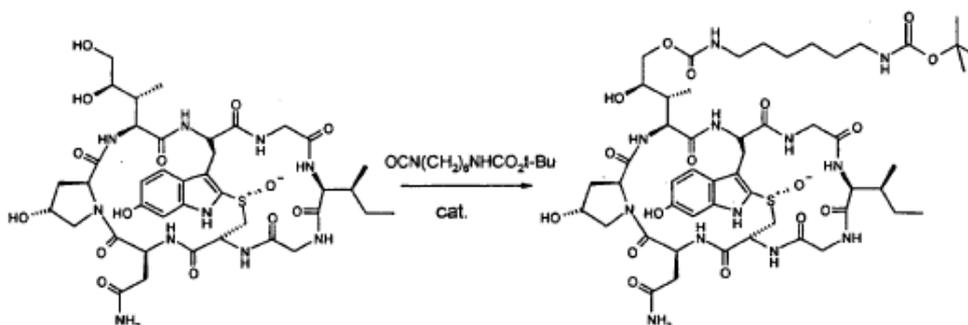
## 2.1 Preparación de 1-isocianato-6-BocNH-aminohexano HDP 30.0247



HDP 30.0247

- 15 Se disolvieron 2,50 g (11,56 mmol) de NH-Boc-1,6-hexametilendiamina (Aldrich 79229) en 35 ml de diclorometano. Se añadieron 35 ml de una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  en agua. Tras la adición de 1,143 g (3,85 mmol) de bis-(triclorometilcarbonato (trifosgeno) se agitó vigorosamente la mezcla de reacción a 0°C durante 30 min. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa tres veces con 15 ml de diclorometano. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron. Se repartió el residuo aceitoso a 150°C y 0,59 mbar en un horno Kugelrohr. 2,23 g (80%) de un aceite transparente EM: 242 (M+)

- 20 2.2 Síntesis de  $\delta$ -O-(NH-boc-6-aminohexilcarbamoil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0253

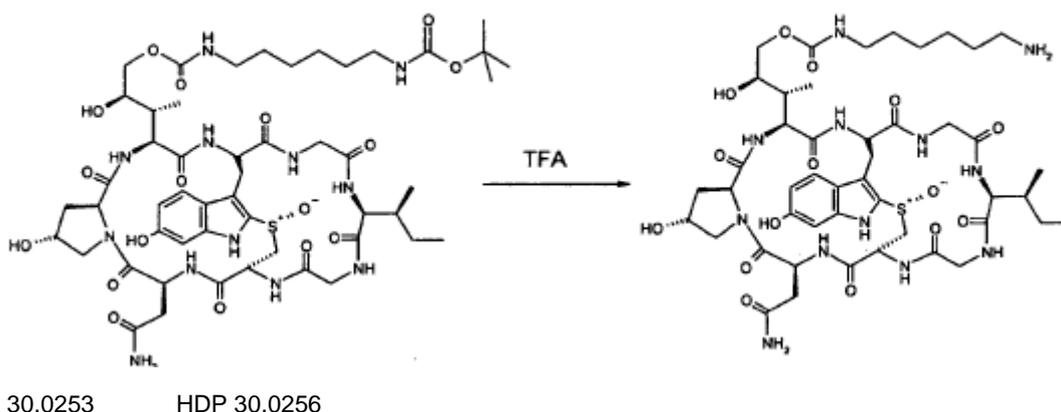
 $\alpha$ -amanitina HDP 30.0253Cat.: dilaurilestanato de dibutilo  $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[\text{OCO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]_2$ 

- 25 Bajo una atmósfera de argón se disolvieron 13,43 mg (14,6  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 1000  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) seca. Se añadieron 7,08 mg (29,2  $\mu$ mol) de NH-Boc-6-isocianato-aminohexano y 18,46 mg (29,2  $\mu$ mol) de dilaurilestanato de di-butilo y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras 23 h se

añadieron 13,43 mg adicionales (14,6  $\mu\text{mol}$ ) de NH-Boc-6-isocianato-aminohexano. Tras 52 h se hidrolizó la mezcla de reacción con 200  $\mu\text{l}$  de metanol y se evaporó hasta sequedad. Se disolvió el residuo en 1200  $\mu\text{l}$  de DMSO y se purificó en una columna LaPrep-HPLC: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A. Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los disolventes.

9,06 mg (rendimiento del 53%) de un sólido blanco. EM: 1161 (M+H<sup>+</sup>); 1183 (M+Na<sup>+</sup>)

### 2.3 Síntesis de $\delta$ -O-(6-aminohexilcarbamoi)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0256



Se disolvieron 9,06 mg (7,8  $\mu\text{mol}$ ) de HDP 30.0253 en 250  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético y se agitó durante 2 min. a temperatura ambiente. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y se evaporó conjuntamente el residuo 2 veces con 1,5 ml de acetonitrilo. Se purificó el sólido en una LaPrep-HPLC:

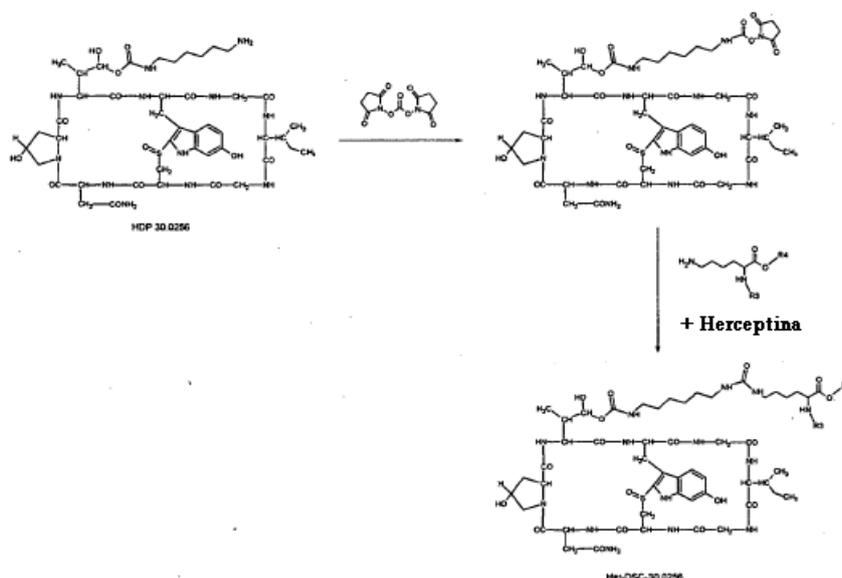
15 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 20 mm, con acetonitrilo/agua, flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de acetonitrilo. Disolvente B: 5% de agua:95% de acetonitrilo. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogieron las fracciones con el tiempo de retención entre 12-17 min. y se evaporaron hasta un sólido blanco.

20 8,75 mg (rendimiento del 95%). EM: (1061 M+H<sup>+</sup>); 1083 (M+Na<sup>+</sup>)

### 2.4 Síntesis del derivado Her-DSC-30.0256 de anticuerpo HDP 30.0256

Esquema 2



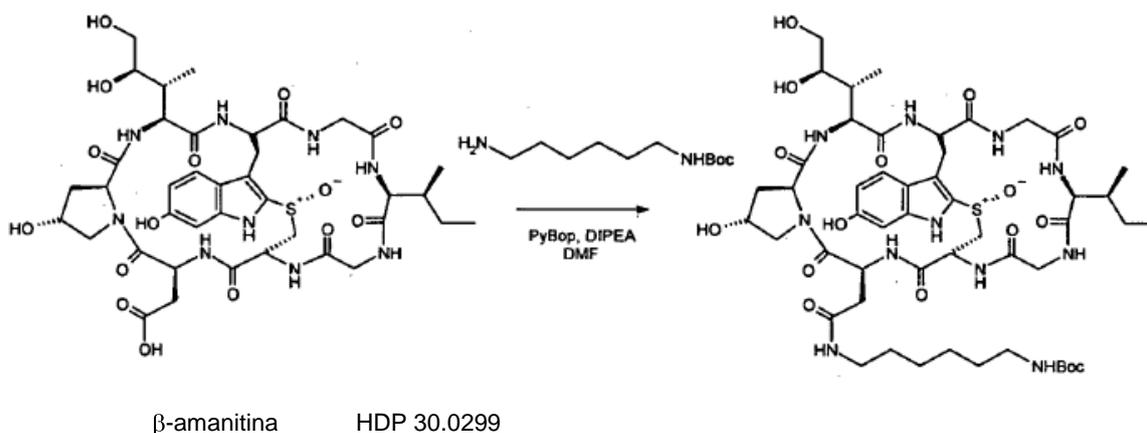
#### 2.4.1 Síntesis del conjugado Her-DSC-30.0256 [3.3] de herceptina HDP-30.0256

Se disolvieron 1,00 mg de HDP 30.0256 en 108  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) seca. Bajo argón y con agitación a temperatura ambiente, se añadieron de una vez 10,0  $\mu$ l de una disolución de carbonato de dihidroxisuccinimido (DSC) en DMF (2,56 mg en 100  $\mu$ l de DMF) y 2,0  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras la incubación durante la noche, se añadieron 30 ml de dietiléter frío. Se recogió el precipitado y se lavó varias veces con dietiléter y se secó a vacío. Se llevó el sólido restante a 143  $\mu$ l de DMF = disolución A. Se disolvieron 12,0 mg de herceptina en 6,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) = disolución B. Se combinaron la disolución A y la disolución B. Se agitó la disolución de herceptina-ligador de amanitina a 4°C durante 14 h y se separó mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25 (columna XK-16; 2 ml/min.). Se lavó previamente la columna G-25 con 500 ml de disolución de PBS, pH = 7,4. Se detectó la fracción del conjugado Her-DSC-30.0256 mediante absorción UV. Se determinó la concentración de proteína mediante ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). Se determinó la carga de amanitina de la herceptina mediante determinación de la absorción UV a  $A = 280$  nm y  $A = 310$  nm. Se calculó una carga de toxina de 3,3 moléculas de amanitina por cada molécula de herceptina.

#### 15 Ejemplo 3

Síntesis del conjugado de  $\beta$ -amanitina-anticuerpo herceptina Her-DSC-30.0304

##### 3.1 Amida de BocNH-hexametilendiamino- $\beta$ -amanitina HDP 30.0299



20 Bajo argón, se disolvieron 4,65 mg (5,05  $\mu$ mol) de  $\beta$ -amanitina secada a vacío en 1000  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) seca. Se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución 0,15 M de BocNH-hexametilendiamina en DMF y 100  $\mu$ l de una

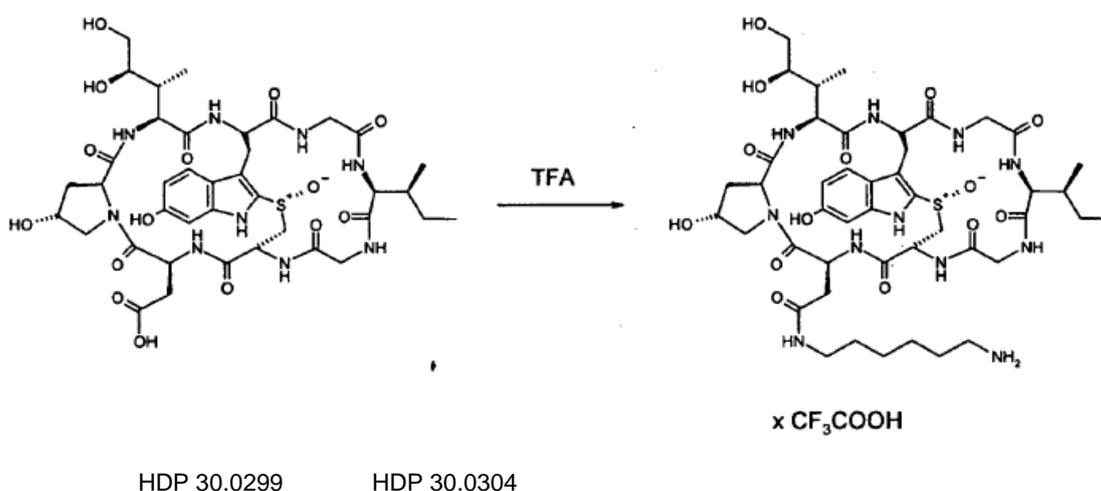
disolución 0,15 M de diisopropiletilamina (DIPEA) en DMF a temperatura ambiente. Tras la adición final de 100  $\mu$ l de una disolución 0,30 M de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) en DMF, se agitó la mezcla de reacción durante 20 h y se hidrolizó con 100  $\mu$ l de agua. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad a vacío y se disolvió el residuo en 1000  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Se llevó a cabo la purificación en una LaPrep-HPLC:

5 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda$  = 295 nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

10 Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención y se evaporaron los disolventes.

4,45 mg (rendimiento del 80%) de un sólido blanco. EM: 1119 M+H<sup>+</sup>; 1141 M+Na<sup>+</sup>

3.2 Amida de 6'-hexametildiamino- $\beta$ -amanitina HDP 30.0304



15 Se disolvieron 4,14 mg (3,70  $\mu$ mol) de amida de BocNH-hexametilendiamino- $\beta$ -amanitina HDP 30.0299 en 500  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 2 min. Se evaporó el TFA en exceso a vacío y se evaporó conjuntamente el residuo con 2 porciones de 1000  $\mu$ l de acetonitrilo. Se purificó el sólido restante en una LaPrep-HPLC:

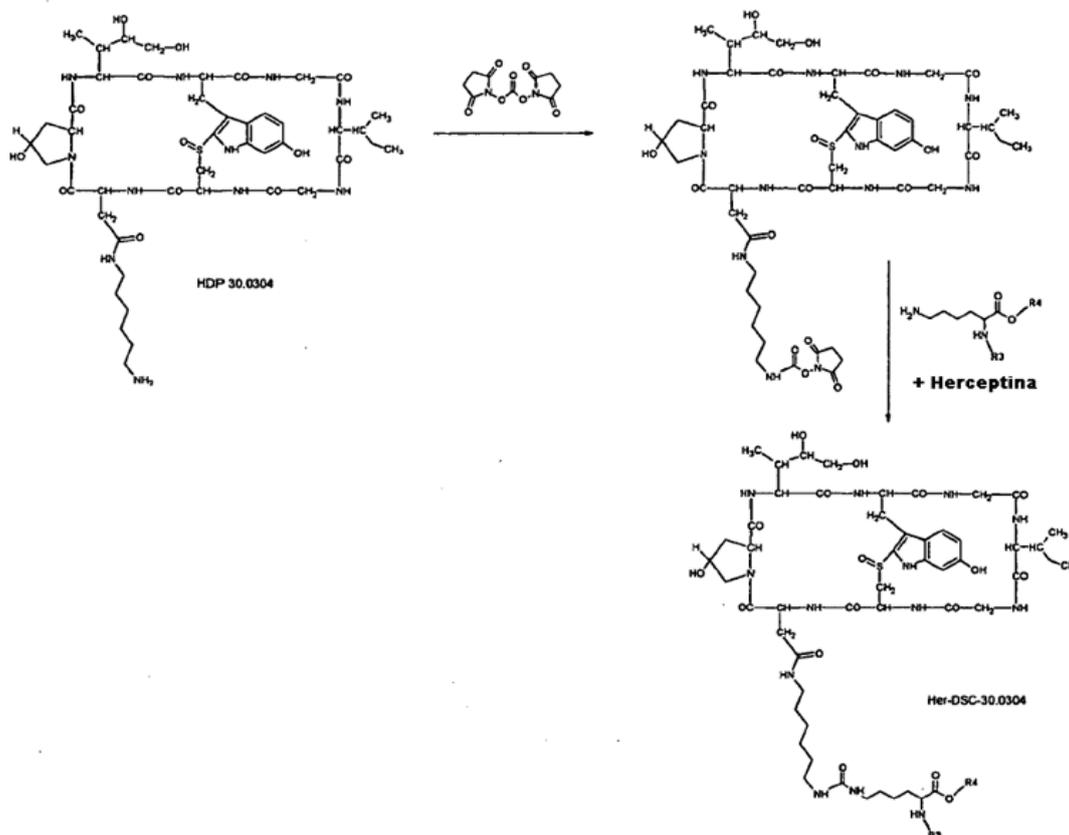
20 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda$  = 295 nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogieron las fracciones con el mismo tiempo de retención 13,43 - 14,02 min. y se evaporaron los disolventes. Se llevó el residuo a 2000  $\mu$ l de agua y se congeló la disolución con nitrógeno líquido y se liofilizó durante la noche.

25 4,00 mg (rendimiento del 95%) de una espuma blanca. EM: 1018 (M+H<sup>+</sup>); 1041 (M+Na<sup>+</sup>)

3.3 Síntesis del derivado Her-DSC-30.0304 de anticuerpo HDP 30.0304

## Esquema 3

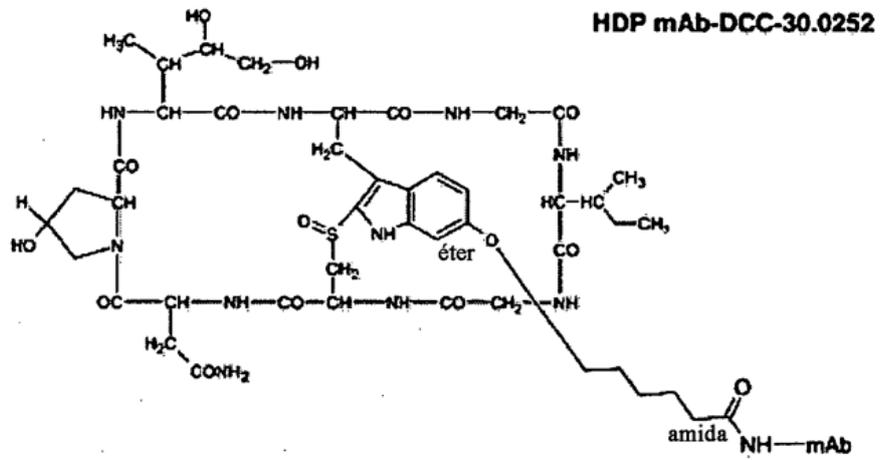


## 3.3.1 Síntesis del conjugado Her-DSC-30.0304 [4.7] de herceptina HDP-30.0304

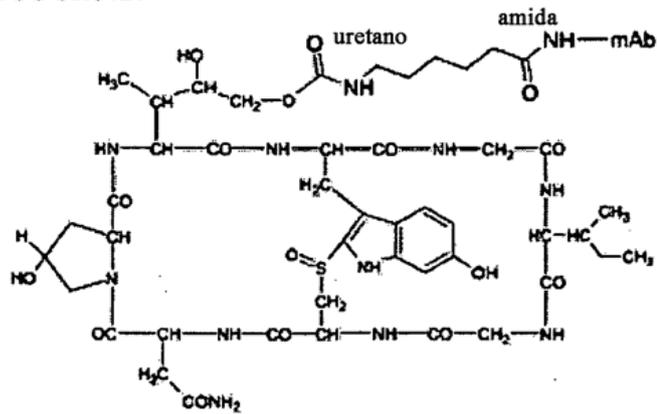
Se disolvieron 1,33 mg de HDP 30.0304 en 144  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF) seca. Bajo argón y con agitación a temperatura ambiente, se añadieron de una vez 13,4  $\mu$ l de una disolución de carbonato de dihidroxisuccinimido (DSC) en DMF (2,56 mg en 100  $\mu$ l de DMF) y 2,6  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras 12 h, se añadieron 30 ml de dietiléter frío. Se recogió el precipitado y se lavó varias veces con dietiléter y se secó a vacío. Se llevó el sólido restante a 200  $\mu$ l de DMF = disolución A. Se disolvieron 12,0 mg de herceptina en 4,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) = disolución B. Se combinaron la disolución A y la disolución B. Se agitó la disolución herceptina-ligador de amanitina a 4°C durante 14 h y se separó mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25 (columna XK-16; 2 ml/min.). Se lavó previamente la columna G-25 con 500 ml de disoluciones de PBS, pH = 7,4. Se detectó la fracción de conjugado Her-DSC-30.0304 mediante absorción UV. Se determinó la concentración de proteína mediante ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). Se determinó la carga de amanitina de la herceptina mediante determinación de la absorción UV a  $\lambda = 280$  nm y  $\lambda = 310$  nm. Se calculó una carga de toxina de 4,7 moléculas de amanitina por cada molécula de herceptina.

## Ejemplo 4

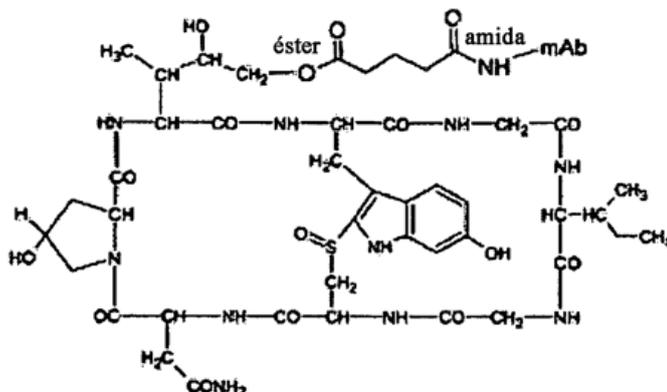
Otras estructuras de conjugados de amanitina-herceptina



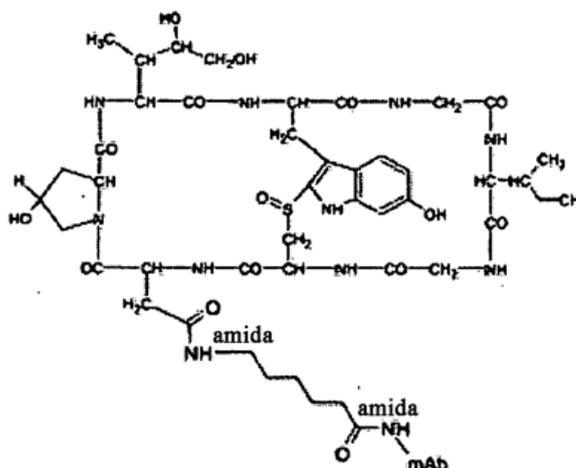
**HDP mAb-DCC-30.0127**



**HDP mAb-Éster-30.0001**



**HDP mAb-DCC-30.0xyz**



**Ejemplo 5**

Citotoxicidad de conjugados de herceptina-amanitina en diferentes líneas de células tumorales positivas para HER2 y negativas para HER2 *in vitro*

- 5 Se evaluó la actividad citotóxica de Her-DSC-30.0134, Her-DSC-30.0256, Her-éster-30.0001, Her-DCC-30.0252 y Her-DCC-30.0127 con las líneas de células tumorales positivas para HER2 SKOV-3 (ovario), SK-BR-3 (mama), NCI-N87 (estómago) y la línea de células tumorales negativa para HER2 MDA-MB231 (mama) y un ensayo de incorporación de BrdU quimioluminiscente (Roche Diagnostics) *in vitro*. Se determinó la viabilidad celular tras de 72 h a 96 h de incubación con diferentes concentraciones de conjugados de herceptina-amanitina a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% mediante medición de células fijadas y permeabilizadas con un anticuerpo anti-BrdU-HRP en un lector de microplacas BMG Labtech Optima. Se calcularon los valores de CE50 de curvas de dosis-respuesta mediante el software Graphpad Prism 4.0 (véanse las figuras 2 - 5).

Estabilidad de conjugados de herceptina-amanitina en plasma *in vitro*

5.1 Liberación de amanitina tras incubación en plasma

- 15 Se incubaron conjugados de herceptina-amanitina 35 μM durante hasta 14 días en plasma de ratón en un baño de agua a 37°C. Se recogieron muestras a diferentes puntos de tiempo y se analizaron para determinar los compuestos de amanitina de molécula pequeña liberados mediante un método ELISA. Para el mismo, se extrajeron amanitina liberada y metabolitos de amanitina a diferentes puntos de tiempo con EtOH al 80%. Se aclararon las disoluciones mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 min. y almacenaron los sobrenadantes a -70°C. Se recubrió una placa de micropocillos Lumitrac (Greiner) blanca con antisuero de conejo anti-amanitina durante la noche a 4°C. Se bloqueó la placa con BSA al 3% en PBS durante 1 h a 37°C y se lavó tres veces con Tween al 0,05%/PBS. Se mezclaron muestras de amanitina y disoluciones de amanitina con concentraciones definidas con biotilil-amanitina 1 nM en BSA al 1%/PBS y se incubaron en pocillos recubiertos durante 1 h a 37°C. Se lavaron los pocillos tres veces con Tween al 0,05%/PBS. Se diluyó una disolución madre de estreptavidina-HRP (Sigma-Aldrich) (1 mg/ml en PBS)

1:1000 en BSA al 3%/PBS y se añadieron 50  $\mu$ l a cada pocillo. Tras la incubación durante 1 h a 37°C, se lavaron los pocillos tres veces con Tween al 0,05%/PBS. Se añadieron 50  $\mu$ l de disolución de luminol (Applichem) a cada pocillo y se midió la señal de luminiscencia mediante un lector BMG Labtech Optima. Se calcularon las cantidades de compuestos de amanitina liberados mediante regresión lineal (véanse las figuras 6 - 7).

## 5 5.2 Actividad citotóxica tras la incubación en plasma

Se incubaron los conjugados de herceptina-amanitina durante hasta 11 días en plasma humano en un baño de agua a 37°C. Se recogieron muestras a diferentes puntos de tiempo y se analizaron para determinar la potencia citotóxica restante en células SKOV-3 positivas para HER2 mediante un ensayo de incorporación de BrdU quimioluminiscente (Roche Diagnostics) *in vitro*. Se determinó la viabilidad celular tras 72 h de incubación con diferentes concentraciones de conjugados de herceptina-amanitina a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% mediante medición de células fijadas y permeabilizadas con un anticuerpo anti-BrdU-HRP en un lector de microplacas BMG Labtech Optima. Se calcularon los valores de CE50 de curvas de dosis-respuesta mediante el software Graphpad Prism 4.0 (véase la figura 8).

Actividad antitumoral de conjugados de herceptina-amanitina en modelos de xenoinjerto de ratón con células cancerosas positivas para HER2

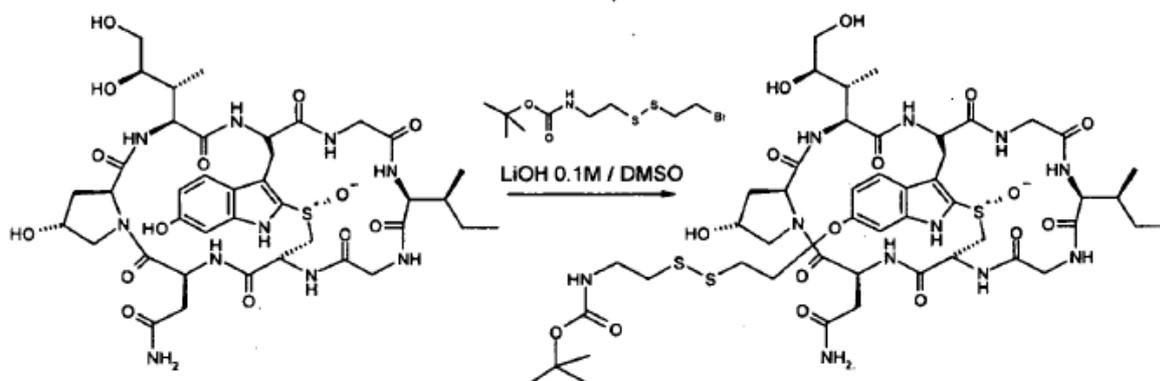
15 Se adquirieron (Janvier) ratones atímicos BALB/c nu/nu hembra intactos de seis semanas de edad y se dividieron aleatoriamente en tres grupos de ocho ratones cada uno. Se inyectaron 2,5 x 10<sup>6</sup> células SKOV-3 por vía s.c. en el costado de cada ratón. Se inyectaron una vez por vía i.v. los conjugados de herceptina-amanitina a una dosis de 50  $\mu$ g/kg el día 19 tras la inoculación del tumor, mientras que se inyectó al grupo control negativo vehículo (tampón de NaCl). Se registraron parámetros tales como supervivencia, peso y tamaño del tumor (véase la figura 9).

## 20 Ejemplo 6:

Preparación de los compuestos de ligador de  $\alpha$ -amanitina adicionales HDP 30.0353, HDP 30.0354, HDP 30.0355, HDP 30.0409, HDP 30.0410, HDP 30.0411 y HDP 30.0412

### 6.1 Ligador de amanitina HDP 30.0353

#### 6.1.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-6-amino-3,4-ditia-hexil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0341



25

$\alpha$ -amanitina      HDP 30.0341

Se disolvieron 6,78 mg (7,38  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 500  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 18,67 mg (59,02  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-boc-amino-3,4-ditia-hexilo y 73,8  $\mu$ l (7,38  $\mu$ mol, 1 eq.) de LiOH (0,1 M) en agua / DMSO (1:1) bajo argón. Tras 1 h, 3,5 h, 4,5 h, 6,5 h y 8 h adicionales se añadieron equivalentes de la disolución de LiOH 0,1 M. Se purificó la mezcla de reacción bruta en una LaPrep-HPLC:

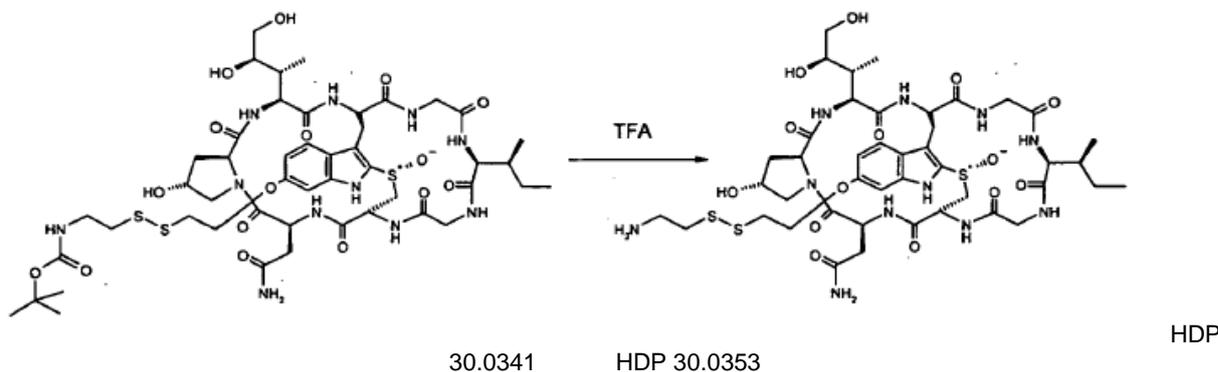
30

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 6,5 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% de agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

35 Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 20,8-21,4 min. y se evaporaron los disolventes a vacío.

1,29 mg (rendimiento del 15%) de un sólido blanco. EM: 1154 M+H+

#### 6.1.2 Síntesis de 6'-O-(6-amino-3,4-ditia-hexil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0353



Se disolvieron 1,29 mg (1,12  $\mu\text{mol}$ ) de 6'-O-(-6-amino-3,4-ditia-hexil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0341 en 200  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético (TFA). Se agitó la mezcla de reacción bajo argón a temperatura ambiente. Tras 1 min., se diluyó el ácido trifluoroacético con 1000  $\mu\text{l}$  de tolueno y se evaporó hasta sequedad. La temperatura no debe exceder 20°C. Se repitió este procedimiento con 1000  $\mu\text{l}$  de tolueno y 1000  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo (2x). Se purificó el éter de  $\alpha$ -amanitina en bruto en una LaPrep-HPLC:

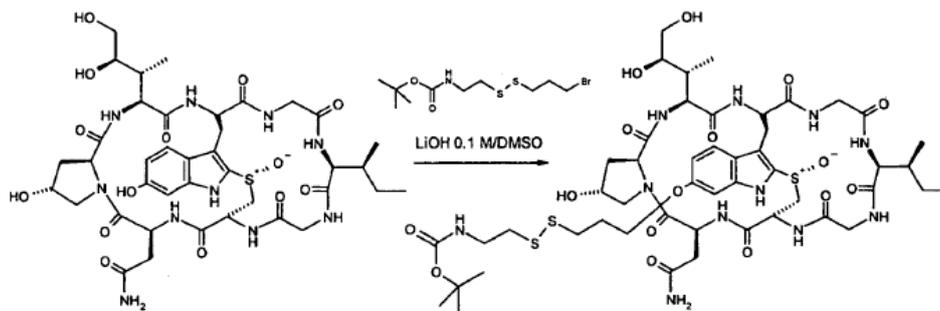
columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 6,5 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% de agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-25 min. el 50% de A; 25-30 min. el 0% de A; 30-35 min. el 0% de A; 35-40 min. el 100% de A, 40-45 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 16,1-17,0 min. y se evaporaron los disolventes. Se liofilizó el residuo en agua.

0,39 mg (rendimiento del 30%, sal de TFA) de un sólido amarillo. EM: 1054 M+H+

## 6.2 Ligador de amanitina HDP 30.0354

### 6.2.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptilo)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0349



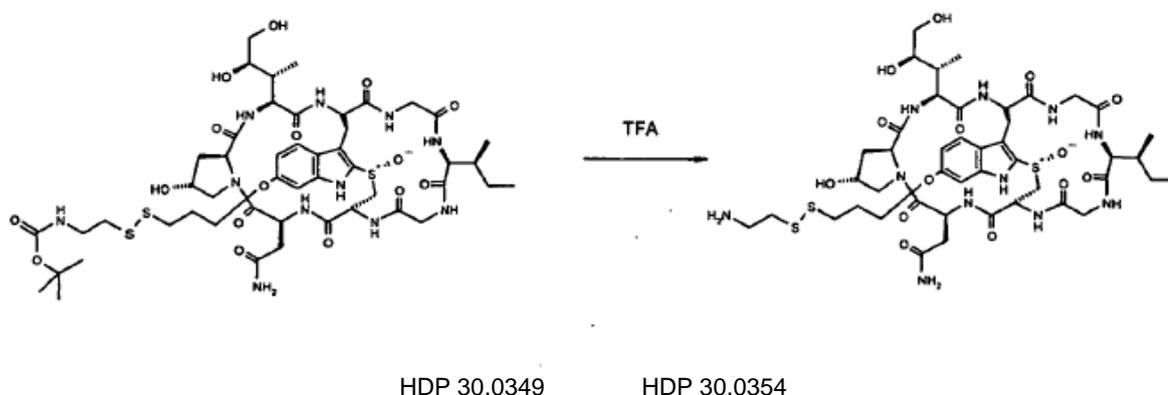
$\alpha$ -amanitina                      HDP 30.0349

Se disolvieron 5,67 mg (6,17  $\mu\text{mol}$ ) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 250  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se añadieron 19,00 mg (58,00  $\mu\text{mol}$ , 9,3 eq.) de bromuro de NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0345 a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Se añadieron de una vez 61,7  $\mu\text{l}$  (6,10  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Se agitó la mezcla de reacción durante 3,5 h y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  adicionales (13,00 mg; 39,7  $\mu\text{mol}$ ; 6,3 eq.) de bromuro de NH-boc-7-amino-4,5-ditiaheptilo HDP 30.0345 y 61,7  $\mu\text{l}$  de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Tras 8 h se purificó la mezcla de reacción en bruto en una LaPrep-HPLC:

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-30 min. el 0% de A; 30-35 min. el 100% de A; 35-40 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 19,4-21,0 min. y se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente.

4,83 mg (rendimiento del 67%) de un polvo blanco. EM: 1168 M+H+

6.2.2 Síntesis de 6'-O-(7-amino-4,5-ditia-heptil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0354

5 Se disolvieron 4,83 mg (4,13  $\mu$ mol) de 6'-O-(NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0349 en 200  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 min. bajo argón y se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente. Se evaporó conjuntamente el residuo con 1000  $\mu$ l de tolueno y 1000  $\mu$ l de acetonitrilo. Se purificó el sólido restante en una LaPrep-HPLC:

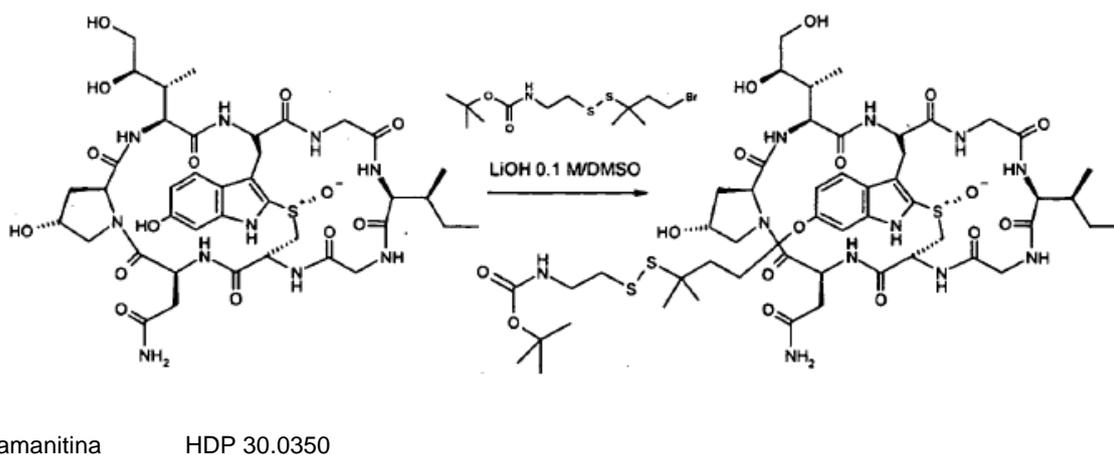
10 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 6,5 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% de agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 17,1-17,5 min. y se evaporó. Se liofilizó el residuo en agua.

0,36 mg (rendimiento del 7,0%, sal de TFA) de un sólido amarillo. EM: 1068 M+H+

## 6.3 Ligador de amanitina HDP 30.0355

15 6.3.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0350



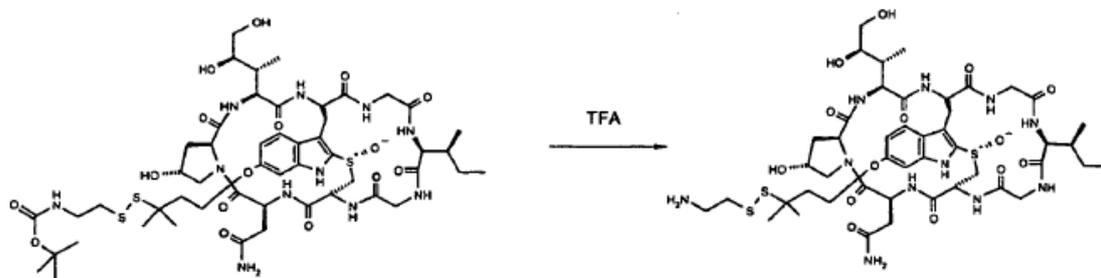
20 Se disolvieron 5,67 mg (6,17  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 250  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Bajo argón se añadieron 18,00 mg (51,62  $\mu$ mol, 9,8 eq.) de bromuro de NH-boc-7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0348 y 61,7  $\mu$ l (6,10  $\mu$ mol, 1 eq.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Tras 2 h se trató repetidamente la mezcla de reacción con 10  $\mu$ l (12,00 mg; 34,4  $\mu$ mol; 5,6 eq.) de bromuro de NH-boc-7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0348 y 61,7  $\mu$ l de LiOH 0,1 M. Tras 8 h se diluyó la mezcla con DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

25 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% de agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-30 min. el 0% de A; 30-35 min. el 100% de A; 35-40 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 20,5-21,0 min. y se evaporaron los disolventes.

0,51 mg (rendimiento del 7%; rendimiento del 48% basado en  $\alpha$ -amanitina convertida). EM: 1196 M+H+

### 6.3.2 Síntesis de 6'-O-(7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0355



5 HDP 30.0350 HDP 30.0355

Se disolvieron 0,51 mg (0,43  $\mu$ mol) de HDP 30.0350 en 200  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 1 min. a temperatura ambiente. Se diluyó el ácido trifluoroacético con 1000  $\mu$ l de tolueno y se evaporó a 20°C hasta sequedad. Se repitió este procedimiento con 1000  $\mu$ l de tolueno y 1000  $\mu$ l de acetonitrilo (2x). Se purificó la mezcla de reacción en una LaPrep-HPLC:

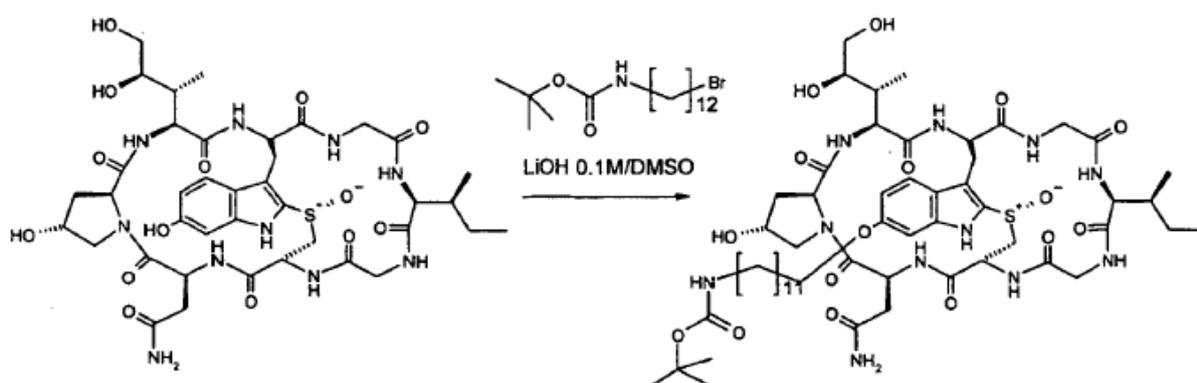
10 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 6,5 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: 10% de agua:90% de metanol, 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

15 Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 18,2-18,6 min. y se evaporaron los disolventes. Se liofilizó el residuo en agua.

0,15 mg (rendimiento del 27%, sal de TFA) de un sólido amarillo. EM: 1096 M+H+

### 6.4 Ligador de amanitina HDP 30.0409

#### 6.4.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-12-amino-dodecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0404



20  $\alpha$ -amanitina HDP 30.0404

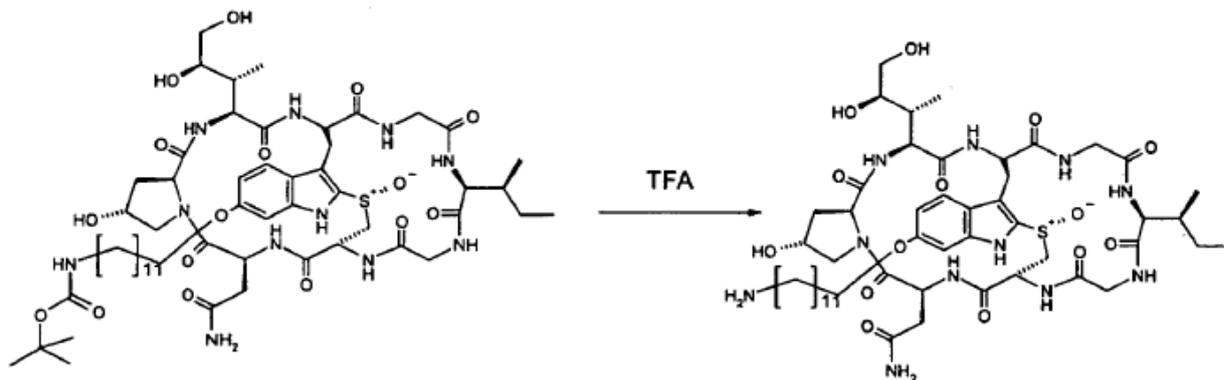
25 Se disolvieron 6,67 mg (7,26  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 250  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se añadieron 21,00 mg (58,10  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-boc-12-amino-dodecilo HDP 30.0383 y 72,6  $\mu$ l (7,26  $\mu$ mol, 1 eq.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Tras 6 h, se añadieron 36,5  $\mu$ l de LiOH 0,1 M y se extinguió la mezcla con 72,6  $\mu$ l de una disolución de ácido acético 0,1 M en DMSO dos h después. Se purificó el producto de reacción en bruto en una LaPrep-HPLC:

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

5 Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 22,0-22,7 min. y se evaporaron los disolventes.

5,96 mg (rendimiento del 68%) de un sólido blanco. EM: 1202 M+H+

#### 6.4.2 Síntesis de 6'-O-(12-aminododecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0409



HDP 30.0404

HDP 30.0409

10 Se disolvieron 5,96 mg (4,96  $\mu$ mol) de HDP 30.0404 en 200  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron 1 min. a temperatura ambiente. Se evaporó conjuntamente la mezcla de reacción con 1000  $\mu$ l de tolueno y acetonitrilo y se purificó el sólido restante en una LaPrep-HPLC:

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con acetonitrilo / agua, flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de acetonitrilo. Disolvente B: 5% de agua:95% de acetonitrilo. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

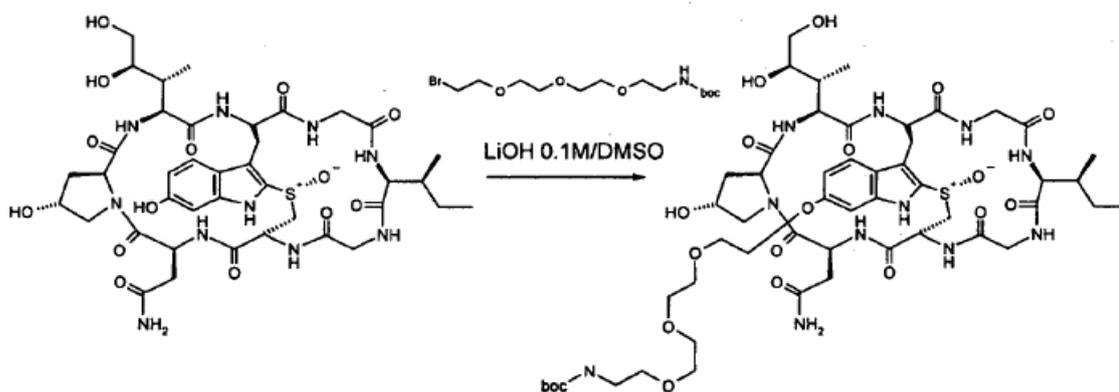
15

Se recogió la fracción con un tiempo de retención entre 18,6-19,2 min. y se evaporó hasta un sólido blanco.

6,03 mg (rendimiento del 99%, sal de TFA). EM: 1102 M+H+

#### 6.5 Ligador de amanitina HDP 30.0410

##### 6.5.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-11-amino-3,6,9-trioxa-undecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0405



20

$\alpha$ -amanitina

HDP 30.0405

Se disolvieron 6,67 mg (7,26  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 250  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se disolvieron 20,51 mg (58,10  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-boc-11-amino-3,6,9-trioxa-undecilo HDP 30.0391 y

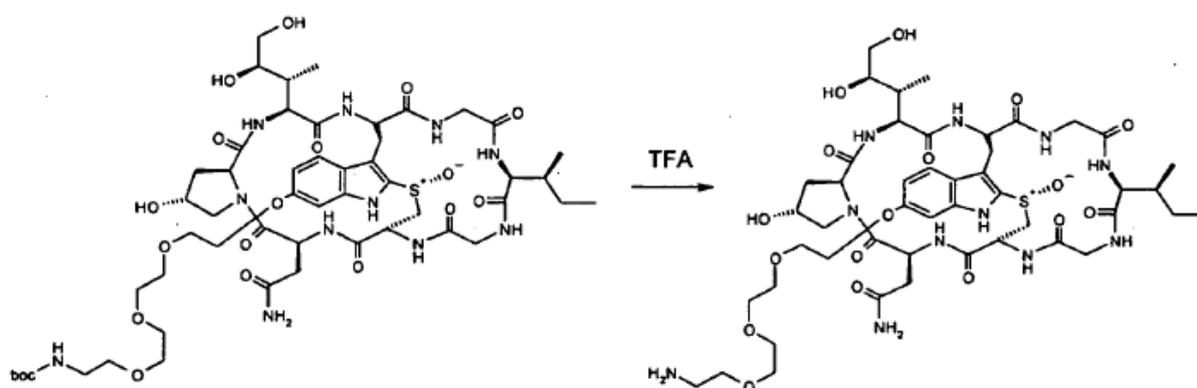
72,6  $\mu\text{l}$  (7,26  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. Tras 6 h se añadió base de LiOH adicional (0,5 eq.). Se extinguió la mezcla tras 8 h con 72,6  $\mu\text{l}$  de una disolución de ácido acético 0,1 M en DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

5 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección at  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 18,1-18,6 min. y se evaporaron los disolventes.

4,68 mg (rendimiento del 54%) de sólido. EM: 1194 M+H+

10 6.5.2 Síntesis de 6'O-(11-amino-3,6,9-trioxa-undecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0410



HDP 30.0405

HDP 30.0410

15 Se disolvieron 4,68 mg (3,92  $\mu\text{mol}$ ) de HDP 30.0405 en 200  $\mu\text{l}$  de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 1 min. a temperatura ambiente. Se evaporó conjuntamente la mezcla de reacción con tolueno y acetonitrilo y se purificó el sólido bruto en una LaPrep-HPLC:

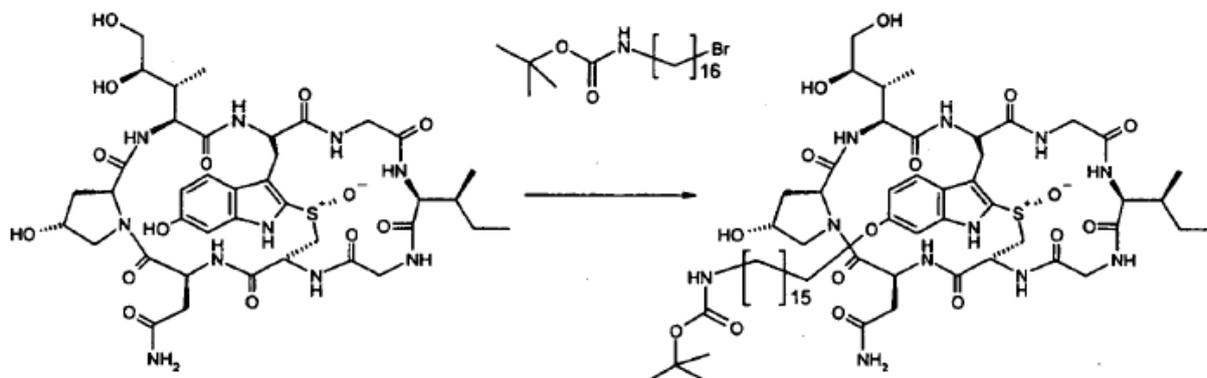
20 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención entre 18,6-19,2 min. y se evaporó. Se liofilizó el sólido restante en agua.

2,44 mg (rendimiento del 52%, sal de TFA). EM del polvo blanco: 1102 M+H+

6.6 Ligador de amanitina HDP 30.0411

25 6-6.1 Síntesis de 6'O-(NH-boc-16-amino-hexadecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0406



$\alpha$ -amanitina HDP 30.0406

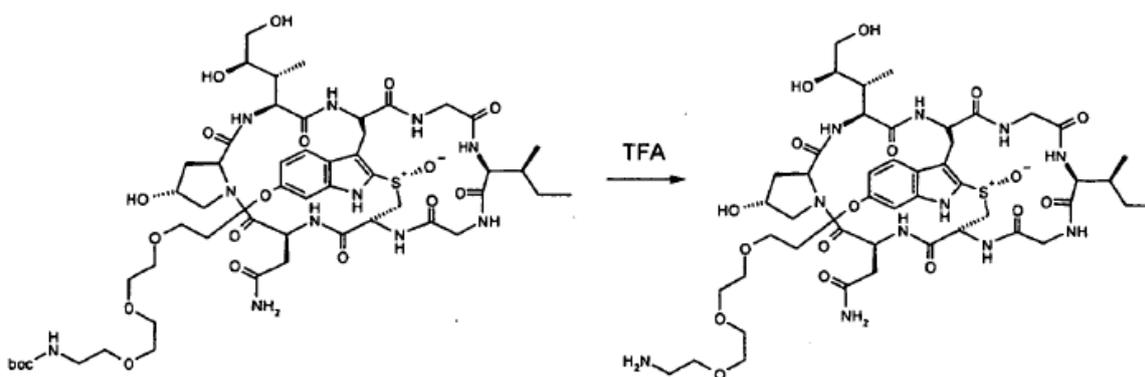
5 Se disolvieron 6,67 mg (7,26  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 750  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se añadieron 24,00 mg (58,10  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-boc-16-amino-hexadecilo HDP 30.0398 a temperatura ambiente bajo argón. Se añadieron 72,6  $\mu$ l (7,26  $\mu$ mol, 1 eq.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1) y se calentó la mezcla de reacción hasta 50°C. Tras 6 h se añadió base de LiOH adicional (36,5  $\mu$ l) y se extinguió la mezcla de reacción después de 8 h con 72,6  $\mu$ l de una disolución 0,1 M de ácido acético en DMSO. Se diluyó la mezcla de reacción solidificada con DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

10 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención de 23,4-24,1 min. y se evaporaron los disolventes.

4,41 mg (rendimiento del 48%) de un sólido blanco. EM: 1258 M+H<sup>+</sup>

15 6.6.2 Síntesis de 6'-O-(16-amino-hexadecil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0411



HDP 30.0406

HDP 30.0411

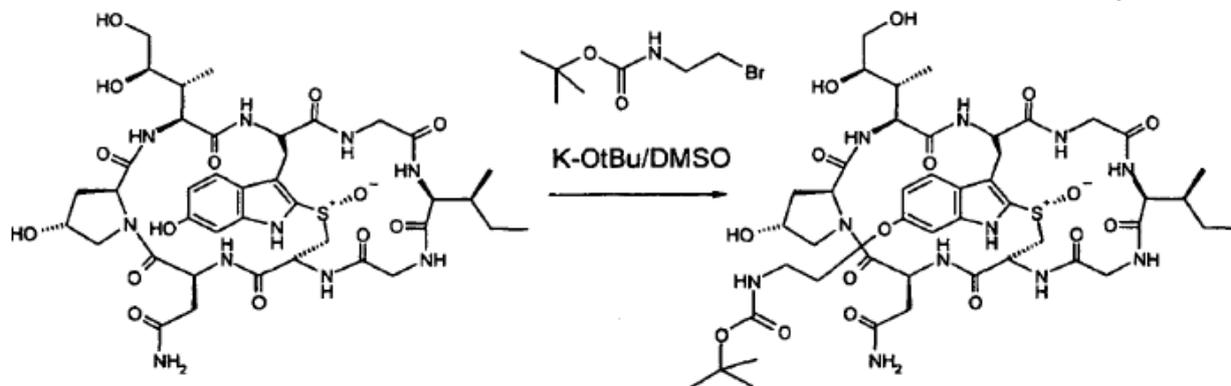
20 Se disolvieron 4,41 mg (3,50  $\mu$ mol) de HDP 30.0406 en 200  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 2 min. a temperatura ambiente. Se evaporó conjuntamente la mezcla de reacción dos veces con 1000  $\mu$ l de tolueno y 1000  $\mu$ l de acetonitrilo y se purificó el residuo sólido en una LaPrep-HPLC:

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

25 Se recogió la fracción con un tiempo de retención entre 20,5-21,2 min. y se evaporó. Se liofilizó el residuo en agua.

2,44 mg (rendimiento del 52%, sal de TFA). EM: 1102 M+H<sup>+</sup>

## 6.7 Ligador de amanitina HDP 30.0412

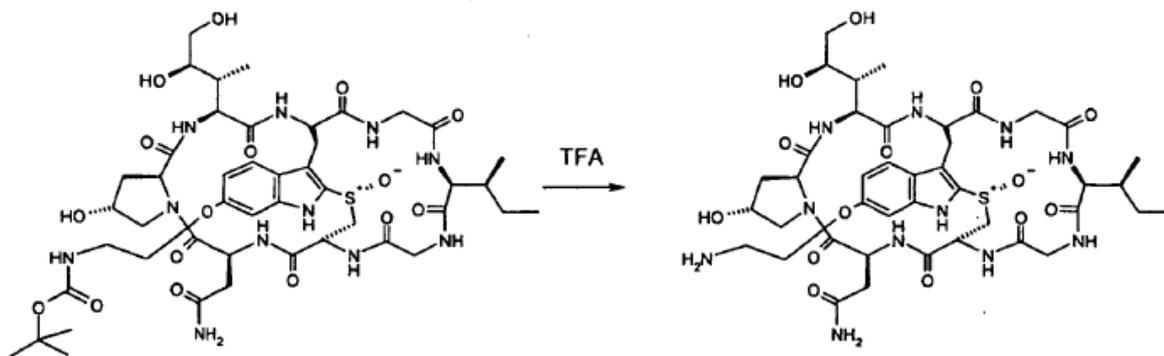
6.7.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-2-amino-etil)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0317 $\alpha$ -amanitina HDP 30.0317

- 5 Se disolvieron 20,00 mg (21,8  $\mu$ mol) de  $\alpha$ -amanitina secada a vacío en 900  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Se añadieron 100,0  $\mu$ l (21,8  $\mu$ mol, 1 eq.) de una disolución 0,218 M de t-butilato de potasio en DMSO y 39,00 mg (174,1  $\mu$ mol, 8 eq.) de bromuro de NH-boc2-aminoetilo (obtenido de Fluka) a temperatura ambiente. Tras 4 y 6 h se añadieron 1 y 2 equivalentes adicionales de t-butilato de potasio y bromuro de NH-boc-2-aminoetilo. Se extinguió la mezcla tras 23 h con 72,6  $\mu$ l de una disolución 0,1 M de ácido acético en DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:
- 10 columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención entre 13,2-14,5 min. y se evaporaron los disolventes.

3,86 mg (rendimiento del 16%) de un sólido blanco. EM: 1062 M+H<sup>+</sup>

- 15 6.7.2 Síntesis de 6'-O-(2-amino-etilo)- $\alpha$ -amanitina HDP 30.0412



HDP 30.0317 HDP 30.0412

- 20 Se disolvieron 3,86 mg (3,36  $\mu$ mol) de HDP 30.0317 en 200  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 2 min. a temperatura ambiente. Se evaporó conjuntamente la mezcla de reacción con 1000  $\mu$ l de tolueno y 1000  $\mu$ l de acetonitrilo y se purificó el sólido en una LaPrep-HPLC:

columna: Kromasil 100-C18, 10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05%), flujo: 26 ml/min., detección a  $\lambda = 295$  nm. Disolvente A: 95% de agua:5% de metanol. Disolvente B: 5% de agua:95% de metanol. Gradiente: 0-5 min. el 100% de A; 5-20 min. el 0% de A; 20-25 min. el 0% de A; 25-27 min. el 100% de A; 27-35 min. el 100% de A.

Se recogió la fracción con un tiempo de retención entre 20,5-21,2 min. y se evaporó. Se liofilizó el residuo en agua.

- 25 1,54 mg (rendimiento del 44%, sal de TFA) de un sólido blanco. EM: 962 M+H<sup>+</sup>

## REIVINDICACIONES

1. Conjugado que comprende un resto de unión a una diana unido a través de un ligador L a una amatoxina, en el que el ligador L está conectado a la amatoxina a través de
- (i) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;
- 5 (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo de C  $\delta$  del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
- (iii) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;
- en cada caso en el que el ligador L está conectado al resto de unión a una diana a través de un resto urea.
- 10 2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el conjugado tiene una estructura seleccionada de una de las siguientes estructuras:
- (i) amatoxina-C $\gamma$ -(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;
- (ii) amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;
- (iii) amatoxina-C $\delta$ -O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana;
- 15 (iv) amatoxina-C $\delta$ -O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana; y
- (v) amatoxina-6'C-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a una diana.
3. Conjugado según la reivindicación 1 ó 2, en el que el resto de unión a una diana está conectado al ligador L a través de un grupo amino presente en el resto de unión a una diana, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto urea.
- 20 4. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la amatoxina se selecciona de  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina,  $\gamma$ -amanitina,  $\epsilon$ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina o ácido amanulínico, o de sales o análogos de los mismos.
5. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligador L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquenilo, heteroalquenilo, alquileno, heteroalquileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroaralquileo, opcionalmente sustituido.
- 25 6. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligador L comprende un resto seleccionado de uno de los siguientes restos: un resto disulfuro, un resto éter, un resto amina, un resto éster, un resto carboxamida, un resto uretano y un resto urea.
7. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo que está presente en una célula tumoral, particularmente en el que el resto de unión a una diana se une específicamente a un epítipo de molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM).
- 30 8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto de unión a una diana se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo;
- (ii) proteína de tipo anticuerpo; y
- (iii) aptámero de ácido nucleico.
9. Conjugado según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desimmunizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 40 10. Conjugado de resto de unión a una diana-toxina según la reivindicación 8 ó 9, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla y Fv unidos por disulfuros (dsFv).
11. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso como medicamento.
- 45 12. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pancreático, colangiocarcinoma, cáncer de

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

5 13. Composición farmacéutica que comprende el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, disgregantes, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

14. Molécula de conjugación con amatoxina que comprende un ligador L conectado a una amatoxina a través de

(i) el átomo de C  $\gamma$  del aminoácido de amatoxina 1, particularmente a través de un enlace amida;

(ii) un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6 del aminoácido de amatoxina 3, particularmente a través de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

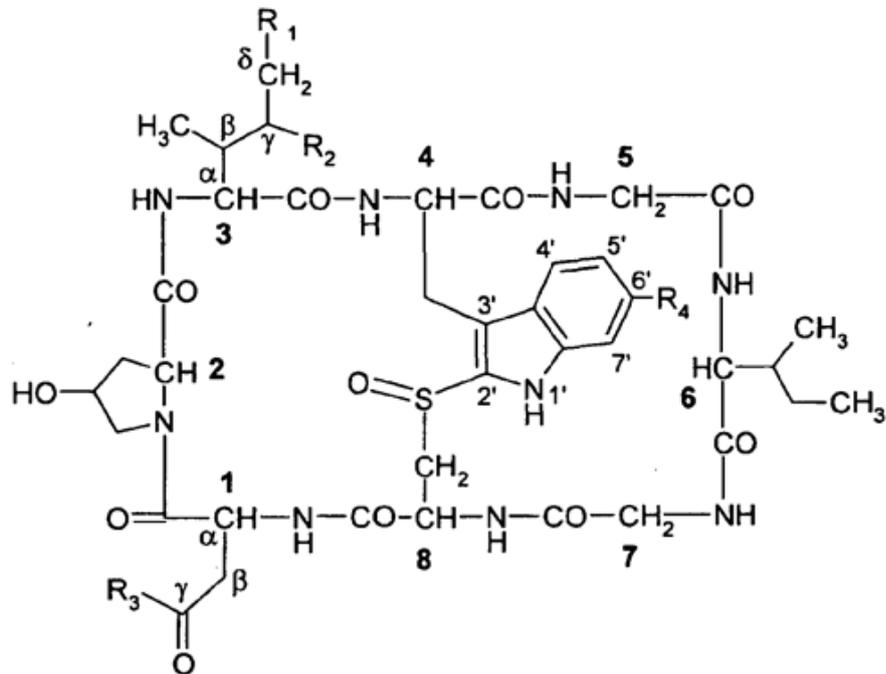
10 (iii) el átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4, particularmente a través de un átomo de oxígeno unido al átomo de C 6' del aminoácido de amatoxina 4;

en cada caso en el que el ligador L comprende un derivado de ácido carbámico -NH-C(O)-X, en el que X es un grupo saliente que puede reemplazarse por una amina primaria de un resto de unión a una diana.

15 15. Molécula de conjugación con amatoxina según la reivindicación 14, en la que X se selecciona de: -butiloxilo, -succinimidiloxilo, -1-O-succinimidiloxi-3-sulfonato (-Sulfo-NHS), -O-(4-nitrofeniloxilo), -O-(3-nitrofeniloxilo), -O-(2,4-dinitrofeniloxilo), -O-(2,4-dicloro-6-nitrofeniloxilo), -pentafluorofeniloxilo, -pentaclorofeniloxilo, -O-(2,4,5-triclorofeniloxilo), -O-(3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-ilo), -O-(endo-1-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboximida-1-ilo), -1-ftalimidoiloxilo, -1-benzotriazoliloxilo, -1-(7-aza-benzotriazolilo)oxilo y -N-imidazolilo.

20 16. Método para sintetizar un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende la etapa de hacer reaccionar una molécula de conjugación con amatoxina según la reivindicación 14 ó 15 con un resto de unión a una diana que comprende un grupo amino primario.

Fig. 1



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

Fig. 2

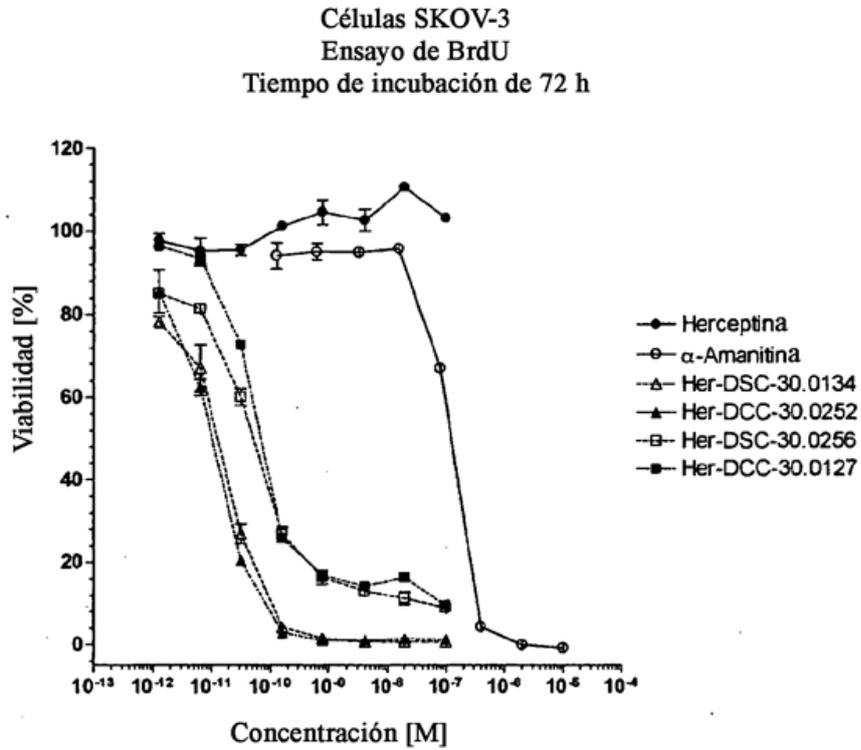


Fig. 3

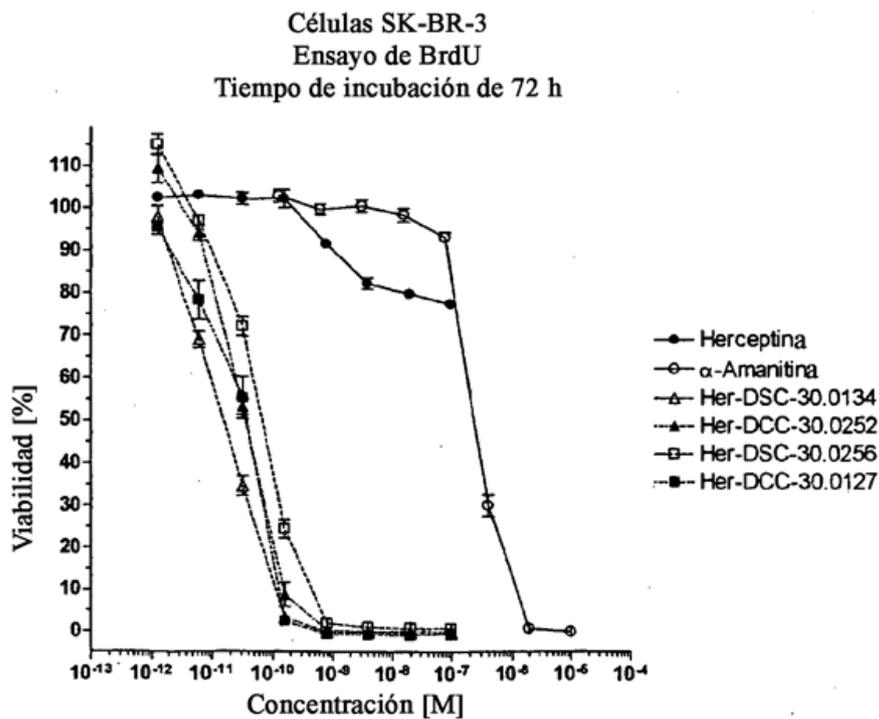


Fig. 4

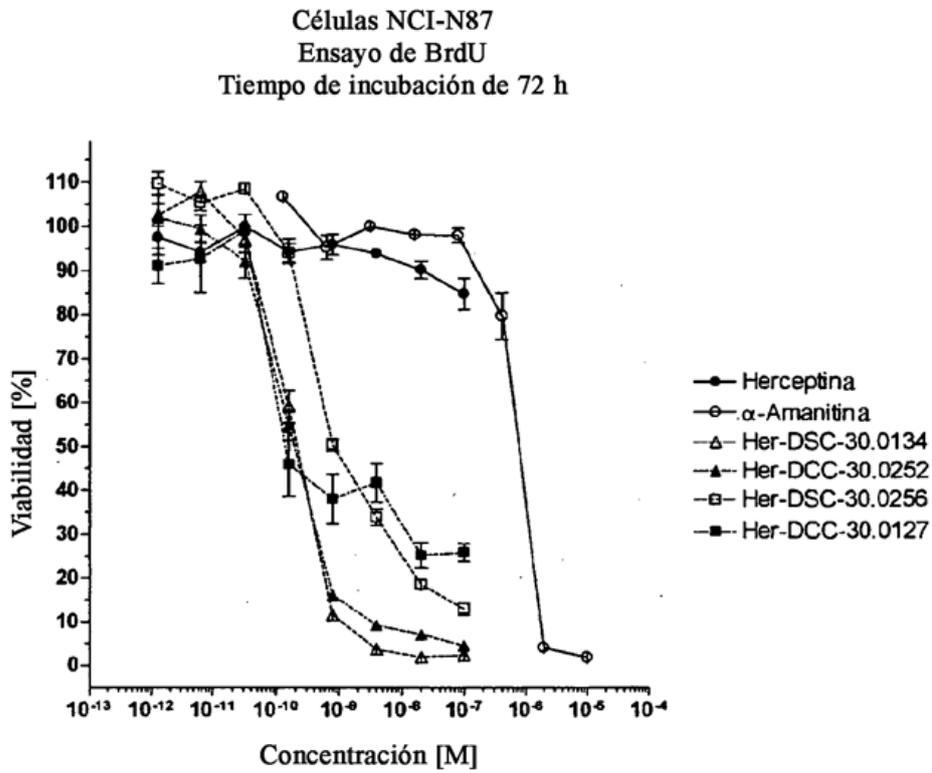
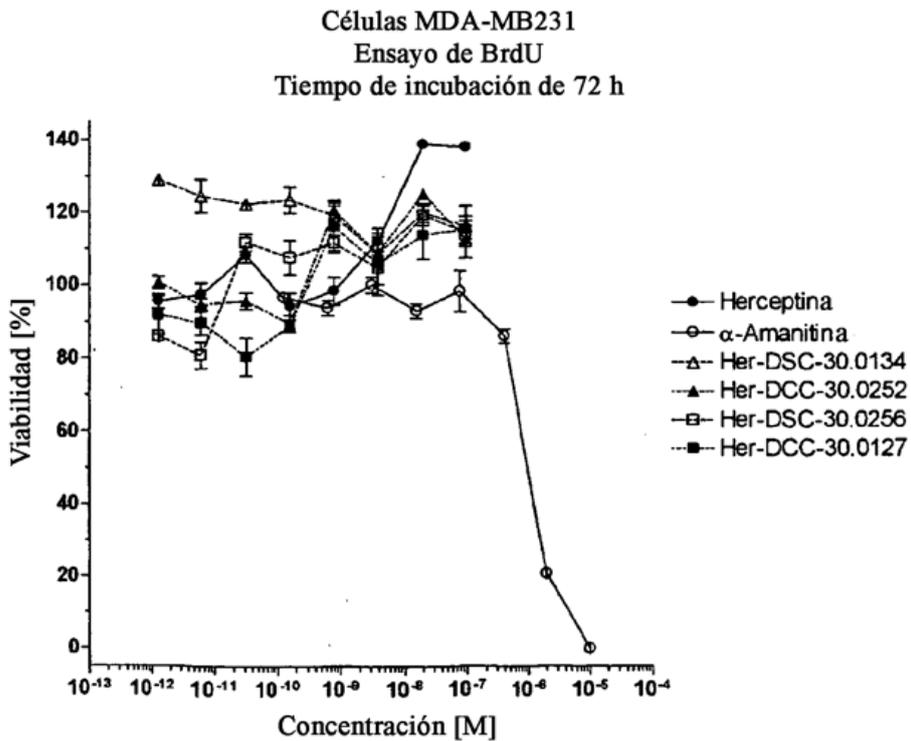
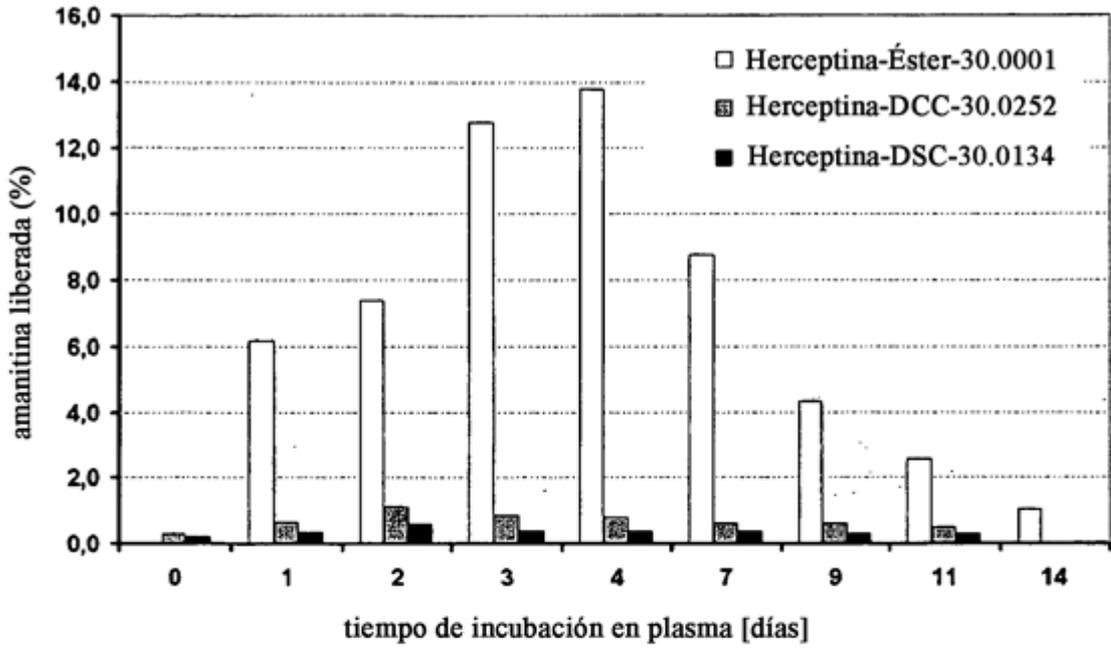


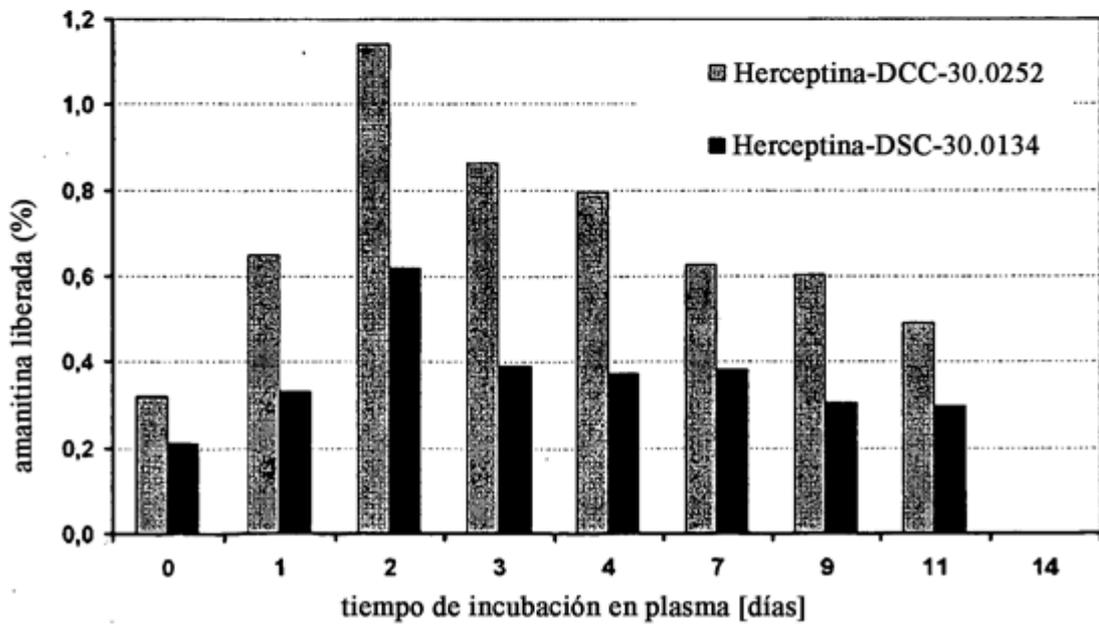
Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

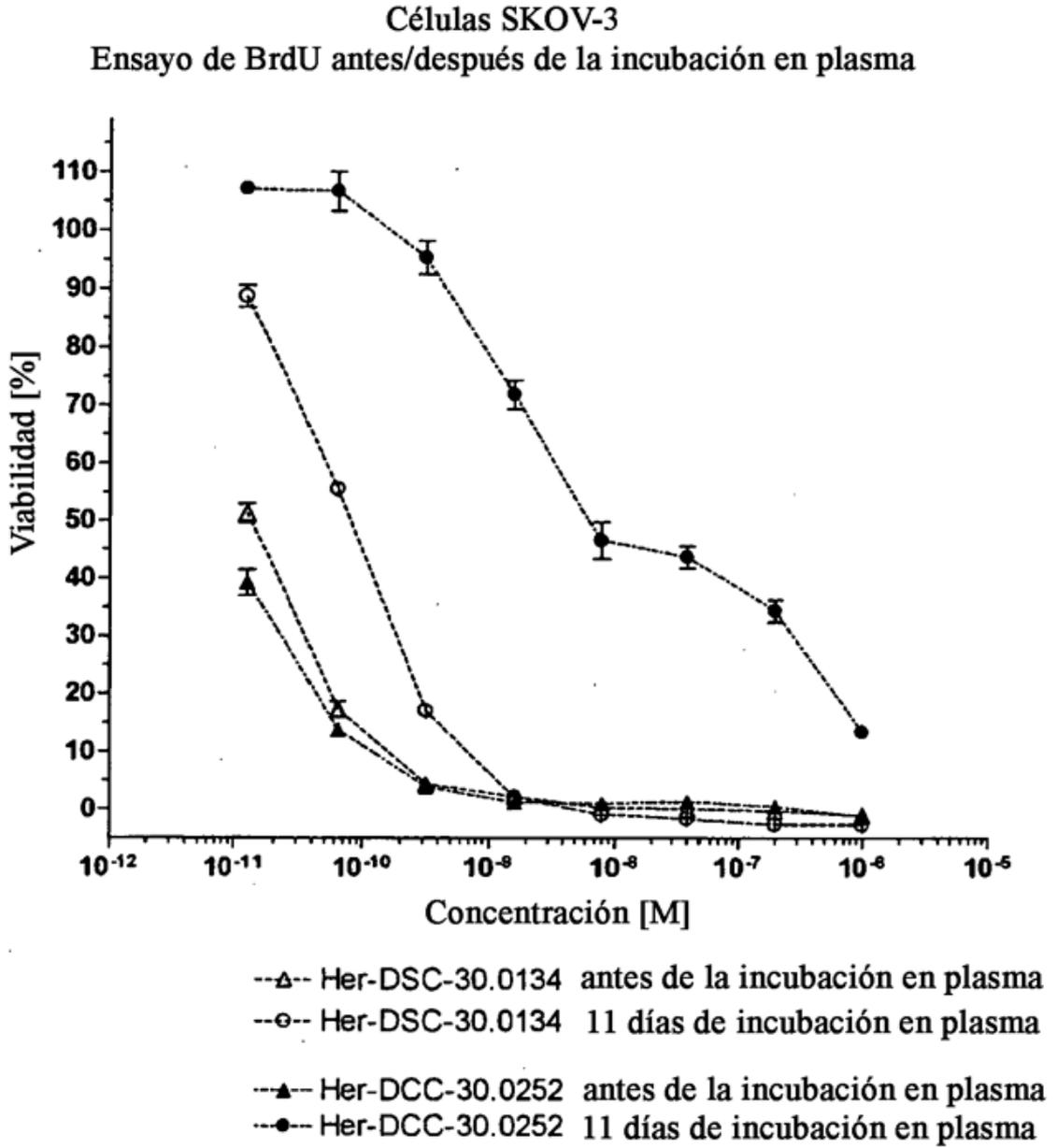


Fig. 9

