

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 855**

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: **09.03.2012** **E 12708251 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2683409**

54 Título: **Conjugados de amatoxina con uniones mejoradas**

30 Prioridad:

10.03.2011 EP 11001999

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

01.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 532 855 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 amatoxina con uniones mejoradas

5 Campo de la invención

15 La invención se refiere a compuestos para su uso en terapia tumoral. En un aspecto, la presente invención se refiere a conjugados de una amatoxina y un resto de unión a dianas, por ejemplo un anticuerpo, conectado mediante determinadas uniones, que son útiles en el tratamiento de cáncer. En un aspecto adicional, la invención se refiere a
 10 composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados.

Antecedentes de la invención

15 Las amatoxinas son péptidos cíclicos que se componen de 8 aminoácidos. Pueden aislarse a partir de las setas *Amanita phalloides* o prepararse de manera sintética. Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamífero, y por tanto también la transcripción y la biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca que se detenga el crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido de manera covalente, el complejo entre amanitina y la ARN polimerasa II es muy fuerte ($K_D = 3$ nM). La disociación de amanitina de la enzima es un proceso muy lento, haciendo así que sea
 20 improbable la recuperación de una célula afectada. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado tiempo, la célula experimentará muerte celular programada (apoptosis).

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

30 La solicitud de patente EP 1859811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describió conjugados en los que el átomo de C en γ del aminoácido 1 de amatoxina de la β -amanitina se acopló directamente, es decir sin estructura de grupo de unión, a albúmina o a un 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 T de linfoma (Jurkat). Se sugirió el uso de grupos de unión, incluyendo grupos de unión que
 35 comprenden elementos tales como restos amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarbonados y similares, pero en realidad no se mostraron tales constructos, y no se proporcionaron más detalles, tales como sitios de unión en las amatoxinas.

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

50 Se sabe que las amatoxinas son relativamente no tóxicas cuando se acoplan a portadores de biomoléculas grandes, tales como moléculas de anticuerpo, y que ejercen su actividad citotóxica sólo después de que se escinda el portador de biomolécula. A la luz de la toxicidad de las amatoxinas, particularmente para las células hepáticas, es de extrema importancia que los conjugados de amatoxina para la 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
 55 drásticas para la ventana terapéutica y la seguridad de los conjugados de amatoxina para enfoques terapéuticos.

Objeto de la invención

60 Por tanto, existía una gran necesidad en la técnica anterior de conjugados de resto de unión a dianas-amatoxina que fuesen estables en plasma, de manera que se minimicen los efectos secundarios perjudiciales para las células que no son diana.

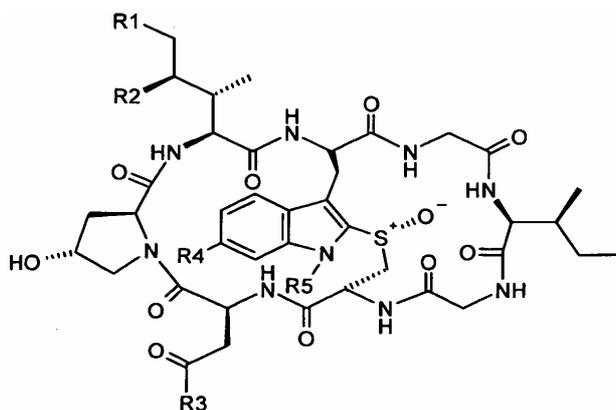
Sumario de la invención

65 La presente invención se basa en la observación inesperada de que pueden unirse restos de selección como diana a amatoxinas mediante grupos de unión en sitios de unión adicionales en el aminoácido 4 de triptófano,

concretamente en las posiciones 1'-N sin interferir en la interacción de tales amatoxinas con su diana, la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamífero.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un resto de unión a dianas unido mediante un grupo de unión L a una amatoxina, o un análogo de una amatoxina, en el que el grupo de unión L se conecta a la amatoxina mediante el átomo de N en 1' del aminoácido 4.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de amatoxina de fórmula I



Fórmula I

10 en la que:

R1 = H u OH;

15 R2 = H u OH;

R3 = NH₂ u OH;

20 R4 = OH u O-alquilo C₁₋₆; y

R5 = L-T; en el que L es un grupo de unión y T es un resto de unión a dianas.

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

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación de amatoxina de fórmula I, en la que R1 a R4 son tal como se definieron anteriormente y en la que R5 = L-X; en el que L es un grupo de unión y X es un grupo saliente que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas, particularmente una amina primaria.

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 de amatoxina de la presente invención con un resto de unión a dianas que comprende un grupo nucleófilo, particularmente una amina primaria.

35 Breve descripción de los dibujos

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

La figura 2 muestra la actividad citotóxica de Her-DSC-30.0378 [2.8] en una línea celular tumoral positiva para HER2 *in vitro* en un ensayo de BrdU tras incubación durante 72 h.

45 Descripción detallada de la invención

Antes que se describa a continuación la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en el presente documento ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de

describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto habitual en la técnica.

5 Preferiblemente, los términos usados en el presente documento se definen tal como se describen 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).

10 En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica 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.

15 La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos de la invención con 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 indicada como que es preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como que son preferidas o ventajosas.

20 Por tanto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende un resto de unión a dianas unido mediante un grupo de unión L a una amatoxina, o un análogo de una amatoxina, en el que el grupo de unión L se conecta a la amatoxina mediante el átomo de N en 1' del aminoácido 4.

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

30 El término "resto de unión a dianas", 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 a un epítipo diana. Los restos de unión a dianas preferidos en el contexto de la presente solicitud son (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos; (ii) proteínas similares a anticuerpo y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a dianas" adecuados para su uso en la presente invención tienen normalmente una masa molecular de 40.000 Da (40 kDa) o más.

35 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 con respecto a dicho segundo compuesto de 100 μM o menos, preferiblemente 50 μM o menos, preferiblemente 30 μM o menos, preferiblemente 20 μM o menos, preferiblemente 10 μM o menos, preferiblemente 5 μM o menos, más preferiblemente 1 μM 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, 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.

50 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, que se une específicamente por un resto de unión a dianas. Preferiblemente, la molécula diana es un antígeno asociado a tumores, 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 superficie de las células no tumorales. En realizaciones particulares, el resto de unión a dianas se une específicamente a un epítipo de HER-2/neu o a una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). En otras realizaciones, dicho antígeno o epítipo se expresa preferentemente en células implicadas en enfermedades autoinmunitarias. En particular en tales realizaciones, el resto de unión a dianas se une específicamente a un epítipo del receptor de IL-6 (IL-6R).

60 El término "anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une específicamente a un antígeno. También están comprendidas las proteínas similares a las inmunoglobulinas que se seleccionan a través de técnicas que incluyen, por ejemplo, presentación en fago para unirse específicamente a una molécula diana, por ejemplo a la proteína 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. Los “anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos 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 quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. *et al.*, 1993), nanocuerpos, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítotos de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígenos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos humanos de la presente invención e incluyen Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv con enlaces disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio o bien VL o bien VH. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, 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 los siguientes: región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3. También están incluidos en la invención los fragmentos de unión a antígenos que también comprenden cualquier combinación de dominio(s) variable(s) con una región bisagra, dominios CL, CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos que pueden usarse en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son de origen humano, de roedor (por ejemplo, ratón, rata, cobaya o conejo), gallina, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, asno, gato o 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 inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o a partir 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 Kuchlerapati y Jakobovits.

El término “proteína similar a anticuerpo” se refiere a una proteína que se ha modificado mediante ingeniería (por ejemplo, mediante mutagénesis de bucles) para unirse específicamente a una molécula diana. Normalmente, tal proteína similar a anticuerpo comprende al menos un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamiaje proteico. Esta doble restricción estructural aumenta enormemente la afinidad de unión de la proteína similar a anticuerpo hasta niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle peptídico variable consiste normalmente en de 10 a 20 aminoácidos. La proteína de andamiaje puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Preferiblemente, la proteína de andamiaje es una proteína globular pequeña. Las proteínas similares a anticuerpo incluyen aficuerpos, anticalinas y proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas (para su revisión, véase: Binz *et al.* 2005). Pueden derivarse proteínas similares a anticuerpo a partir de grandes bibliotecas de mutantes, por ejemplo seleccionarse de grandes bibliotecas de presentación en fago y pueden aislarse en analogía con anticuerpos normales. También pueden obtenerse proteínas de unión similares a anticuerpo mediante mutagénesis combinatoria de residuos expuestos en superficie en proteínas globulares.

El término “aptámero de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha modificado mediante ingeniería a través de tandas repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a una molécula diana (para su 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 flúor en 2'.

Tal como se usa en el presente documento, un “análogo” de un compuesto está relacionado estructuralmente 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 de enzimas. No se requiere que el análogo presente tal actividad en la misma extensión que el compuesto original. Un compuesto se considera un análogo en el contexto de la presente solicitud, si presenta la actividad relevante en 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 relacionado estructuralmente con cualquiera de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -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 la ARN polimerasa II de mamífero en comparación con al menos uno de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico. Un “análogo de una amatoxina” adecuado para su uso en la presente invención puede presentar incluso una mayor actividad inhibitoria frente a la ARN polimerasa II de mamífero que uno cualquiera de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico. La actividad inhibitoria podría medirse determinando la concentración a la que se produce una inhibición del 50% (valor de CI₅₀). La actividad inhibitoria frente a la ARN polimerasa II de mamífero puede

determinarse indirectamente midiendo la actividad inhibitoria sobre la proliferación celular. En los ejemplos, se describe un ensayo adecuado para medir la inhibición de la proliferación celular.

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 a partir de bloques estructurales pequeños (normalmente petroquímicos). Habitualmente, esta síntesis total se lleva a cabo sin la ayuda de procesos biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, un "conjugado aptamérico" se refiere a un conjugado de resto de unión a dianas-toxina en el que el resto de unión a dianas es un aptámero del ácido nucleico según la alternativa (iii) anterior.

Una "grupo de unión" 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 grupo de unión, 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 dianas y la amatoxina. En ausencia de un grupo de unión, una unión directa de la amatoxina al resto de unión a dianas puede disminuir la capacidad de la amatoxina para interaccionar con la ARN polimerasa II. En realizaciones particulares, un grupo de unión 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; por tanto, en el contexto de la presente invención, el término "entre" se usa de manera que se incluyan los límites mencionados) en su estructura principal, es decir la longitud del grupo de unión se define como la conexión más corta medida por el número de átomos o enlaces entre el resto de amatoxina y el resto de unión a dianas, en el que un lado de la estructura principal del grupo de unión se ha hecho reaccionar con la amatoxina y, el otro lado con un resto de unión a dianas. En el contexto de la presente invención, un grupo de unión es preferiblemente un grupo alquileo C_{1-20} , heteroalquileo C_{1-20} , alquilenilo C_{2-20} , heteroalquilenilo C_{2-20} , alquilenilo C_{2-20} , heteroalquilenilo C_{2-20} , cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroalquileo, opcionalmente sustituido. El grupo de unión puede contener uno o más elementos estructurales tales como restos carboxamida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarbonados y similares. El grupo de unión también puede contener combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el grupo de unión más de una vez, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el grupo de unión puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el grupo de unión ha de unirse o bien en una única etapa o bien en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y al resto de unión a dianas. Para ello, el grupo de unión portará dos grupos, preferiblemente en un extremo proximal y uno distal, que pueden (i) formar un enlace covalente con un grupo presente en uno de los componentes que van a unirse, preferiblemente un grupo activado en una amatoxina o el péptido de unión a dianas o (ii) que está 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 grupo de unión, que son el resultado de una reacción de acoplamiento de este tipo, por ejemplo un éster, un éter, un uretano, un enlace peptídico, etc.

En el contexto de la presente invención, el término "amatoxina" incluye todos los péptidos cíclicos que se componen de 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. dic. de 1978; 5(3): 185-260), e incluye además todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques estructurales según la estructura primaria de los compuestos naturales (cíclicos, de 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de los aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos en los que se reemplaza el resto sulfóxido de tioéter por un sulfuro, una sulfona o por átomos diferentes al azufre, por ejemplo un átomo de carbono como en un carboanálogo de amanitina, en cada caso, en los que cualquiera de tales derivados o análogos es funcionalmente activo inhibiendo la ARN polimerasa II de mamífero.

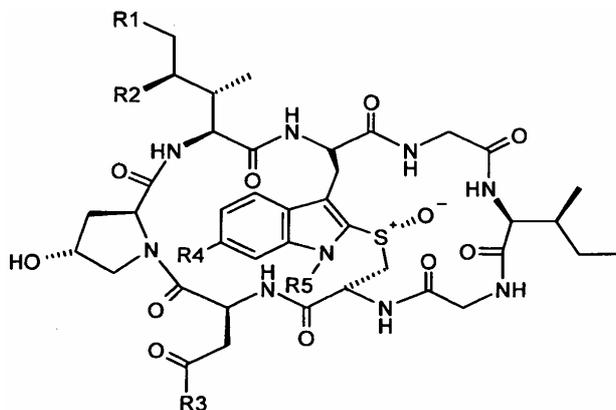
Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamífero. Amatoxinas preferidas son aquéllas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o de captura de tiol) que puede hacerse reaccionar con moléculas de grupo de unión o restos de unión a dianas tal como se definió anteriormente. Amatoxinas que son particularmente adecuadas para los conjugados de la presente invención son α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -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 α -amanitina, β -amanitina y amaninamida.

Tal como se usa en el presente documento, un "derivado químico" (o abreviado: un "derivado") de un compuesto se refiere a una especie que tiene una estructura química que es similar al compuesto, aunque contiene al menos un grupo químico que no está presente en el compuesto y/o deficiente en 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, puede producirse un "derivado" a partir del compuesto original en una o más etapas de reacción

química.

En realizaciones particulares de la presente invención, la amatoxina se selecciona de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina o ácido amanulínico, o de sales o análogos de los mismos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de amatoxina de fórmula I



Fórmula I

10 en la que:

R1 = H u OH;

R2 = H u OH;

15 R3 = NH₂ u OH;

R4 = OH u O-alquilo C₁₋₆; y

20 R5 = L-T; en el que L es un grupo de unión; y T es un resto de unión a dianas.

En una realización particular, el conjugado de amatoxina de fórmula I es un derivado de α -amanitina (R1 = OH; R2 = OH y R3 = NH₂).

25 En una realización particular, R4 es O-Me.

En una realización particular, el grupo de unión se conecta al resto de unión a dianas mediante un resto urea.

30 En el contexto de la presente invención, el término "conectado al resto de unión a dianas mediante un resto urea" se refiere a una conexión entre el grupo de unión y el resto de unión a dianas, en el que el resto de unión a dianas se une directamente al grupo de unión mediante un grupo -NH-C(O)-NH-.

35 En realizaciones particulares de la presente invención, el resto de unión a dianas se conecta al grupo de unión L mediante un grupo amino presente en el resto de unión a dianas, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto urea.

40 En realizaciones particulares, el grupo de unión tiene una longitud de entre 1 y 8 átomos, particularmente entre 1 y 6, más particularmente entre 1 y 4 y lo más particularmente entre 2 y 4 átomos. Por tanto, un grupo de unión de etileno tiene una longitud de grupo de unión de 2 átomos, un grupo de unión de propileno de 3 átomos y un grupo de unión de butileno de 4 átomos.

45 En realizaciones particulares de la presente invención, el grupo de unión L comprende uno o más grupos, particularmente uno, dos o tres grupos, seleccionados de la lista de: un grupo alquileo, alquenileno, alquinileno, cicloalquileo, heteroalquileo, heteroalquenileno, heteroalquinileno, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo y heteroalquileo, en los que cada grupo puede estar sustituido independientemente de manera opcional.

El término "alquileo" se refiere a grupos hidrocarbonados saturados de cadena lineal bivalentes 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 inferior. 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 metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂-CH₂-), n-propileno, n-butileno, n-pentileno y n-hexileno.

5 El término "alquileo" se refiere a grupos de cadena lineal bivalentes que tienen de 2 a 20 átomos de carbono, en los que al menos una de los enlaces carbono-carbono es un doble enlace, mientras otros enlaces pueden ser enlaces sencillos o además enlaces dobles. El término "alquileo" 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
10 enlace, mientras otros enlaces pueden ser enlaces sencillos, dobles o triples adicionales. Los ejemplos de los grupos alquileo incluyen etenileno (-CH=CH-), 1-propenileno, 2-propenileno, 1-butenileno, 2-butenileno, 3-butenileno y similares. Los ejemplos de grupos alquileo incluyen etenileno, 1-propinileno, 2-propinileno, etcétera.

15 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 "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 al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno). Los ejemplos de cicloalquileos incluyen ciclopropileno,
20 ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y cicloheptileno. Los ejemplos de cicloalquileos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropenileno y ciclohexenileno.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "heterocicloalquileo" y "heterocicloalquileo" pretenden referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema de anillos monocíclico o policíclico estable, en el que
25 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, haciendo referencia heterocicloalquileo a tal anillo que está completamente saturado y haciendo referencia heterocicloalquileo a un anillo que está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno o heteroarileno).

30 El término "arileno" pretende significar un anillo o sistema de anillos bivalente 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 mediante la regla de "4n+2" electrones π , incluyendo fenileno.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarileno" se refiere a un anillo o sistema de anillos bivalente 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, el anillo o sistema de anillos que consiste en un resto aromático tal como se define mediante la regla de "4n+2" electrones π y contiene átomos de carbono y uno o más heteroátomos de nitrógeno, azufre y/o
40 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 grupo de unión se rempazan por una selección del/de los grupo(s) indicado(s), siempre que no se supere la valencia normal del átomo indicado, o la del átomo apropiado del grupo que se
45 sustituye, y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. El término "opcionalmente sustituido" pretende significar que el grupo de unión 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 (u oxo, es decir, =O), un grupo tio o imino o similares, entonces se rempazan dos hidrógenos en los átomos de la estructura principal del grupo de unión. Los sustituyentes a modo de ejemplo
50 incluyen, por ejemplo, alquilo, alquileo, alquileo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, acilo, aroilo, heteroaróilo, carboxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo u -O(CH₂)_n-OH, -O(CH₂)_n-NH₂, -O(CH₂)_n-COOH, -(CH₂)_n-COOH, -C(O)O(CH₂)_n-R, -(CH₂)_n-N(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, -alquileo, -alquileo, -cicloalquilo, -cicloalquileo,
55 -(heteroaralquilo unido a C), -(heterocicloalquileo unido a C), -arilo y -heteroarilo, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Los expertos en la técnica entenderán que los sustituyentes, tales como heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, etc. o grupos funcionales tales como -OH, -NHR etc., pueden estar sustituidos ellos mismos, si es apropiado. Los expertos en la técnica también entenderán que los restos sustituidos ellos mismos pueden estar
65 sustituidos también cuando sea apropiado.

En realizaciones particulares de la presente invención, en las que el grupo de unión L comprende m grupos seleccionados de la lista de: un grupo alquileo, alquenileno, alquenileno, cicloalquileo, heteroalquileo, heteroalquenileno, heteroalquenileno, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo y heteroalquileo, en los que cada grupo puede estar sustituido independientemente de manera opcional, el grupo de unión comprende además n restos seleccionados independientemente de uno de los siguientes restos: un resto disulfuro (-S-S-), éter (-O-), tioéter (-S-), amina (-NH-), éster (-O-C(=O)- o -C(=O)-O-), carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), uretano (-NH-C(=O)-O- u -O-C(=O)-NH-) y 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 grupo de unión comprende 2 ó 3 grupos alquileo no sustituidos y respectivamente 1 ó 2, restos disulfuro, éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, uretano o urea que unen los grupos alquileo no sustituidos.

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

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

En realizaciones particulares de la presente invención, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos 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 antígenos se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla y Fv con enlaces disulfuro (dsFv).

En realizaciones particulares, el anticuerpo es Herceptin o HEA125, o un fragmento de anticuerpo que comprende el fragmento de unión a antígenos de Herceptin o HEA125.

En realizaciones particulares, se acopla más de una molécula de amatoxina a un resto de unión a dianas. 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 dianas con respecto a amatoxina es de entre 1 resto de unión a dianas a entre 2 y 15 moléculas de amatoxina, particularmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15. Con el fin del cálculo de la razón en el caso de dímeros de anticuerpo tales como IgG, el dímero se considera un resto de unión a dianas.

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

En realizaciones particulares de la presente invención, el conjugado es para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de páncreas, 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.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere al conjugado para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de páncreas, 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, que comprende la etapa de administrar un conjugado de la presente invención a un paciente que lo necesita.

Tal como se usa en el presente documento, un "paciente" significa cualquier mamífero o ave que pueda beneficiarse de un tratamiento con los conjugados de resto de unión a dianas-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, gallina, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, asno, 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 esté(n) tratándose; (c) inhibir el empeoramiento de síntomas característicos del/de los trastorno(s) que esté(n) tratándose; (d) limitar o prevenir la reaparición del/de los trastorno(s) en pacientes que han tenido previamente el/los trastorno(s) y (e) limitar o prevenir la reaparición de los 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 al paciente un conjugado o

una composición farmacéutica según la presente invención, en el que “administrar” incluye la administración *in vivo*, así como la administración directamente al tejido *ex vivo*, tal como injertos de vena.

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

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente de un agente terapéutico 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 va a recibir el agente terapéutico y el fin de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede determinarse empíricamente por un experto en la técnica según métodos establecidos en la técnica.

En un aspecto adicional, 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 de un estado o citado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general 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 formulaciones parenterales que comprenden, entre otras cosas, inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan o bien en forma de ampollas o bien como los denominados inyectables listos para usar, por ejemplo jeringas listas para usar o jeringas de un solo uso y, aparte de esto, en frascos perforables para múltiples extracciones. 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 para inyección adecuadas, respectivamente, como suspensión de cristales, disoluciones, sistemas dispersos de nanopartículas o coloides como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables también pueden producirse como concentrados, que pueden disolverse o dispersarse con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también puede prepararse en forma de diluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposomales y microemulsiones. De manera similar a los inyectables, las formulaciones para infusión también pueden prepararse en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también pueden aplicarse en forma de infusiones permanentes tanto en terapia hospitalaria como ambulatoria, por ejemplo, por medio de minibombas.

Es posible añadir a formulaciones de fármacos parentales, por ejemplo, albúmina, plasma, extensor, sustancias tensioactivas, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias complejantes o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción del conjugado de resto de unión a dianas-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 dianas-toxina de la invención a materiales como instrumentos para inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

Los conjugados de resto de unión a dianas-toxina de la invención pueden unirse a microportadores o nanopartículas en formulaciones parenterales como, por ejemplo, a partículas finamente dispersas basadas en poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter-uretanos. Las formulaciones parentales también pueden modificarse como preparaciones de depósito, por ejemplo basándose en el “principio de múltiples unidades”, si los conjugados de resto de unión a dianas-toxina de la invención se introducen en forma finamente dispersa, dispersa y suspendida, respectivamente, o como suspensión de cristales en el medicamento, o basándose en el “principio de unidad única” si el conjugado de resto de unión a dianas-toxina de la invención está encerrado en una formulación, por ejemplo en un comprimido o bastoncillo que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de unidad única y múltiples unidades consisten a menudo 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 formulaciones parenterales son preferiblemente aqua sterilisata (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 polioxietileno-sorbitano (por ejemplo, Tween®) o, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos 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

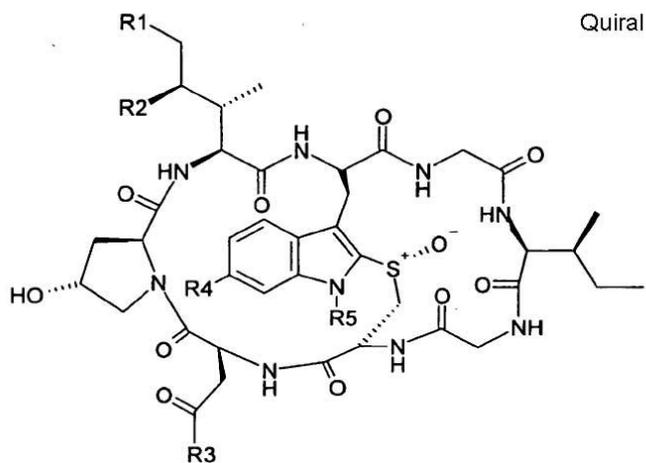
sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, éster hidroxipropílico y éster metílico del ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como, por ejemplo, sulfito de sodio y estabilizadores como, por ejemplo, EDTA.

5 Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una realización preferida, se añaden agentes espesantes para impedir el endurecimiento del conjugado de resto de unión a dianas-toxina de la invención o, tensioactivos y polielectrolitos para garantizar la resuspendibilidad de los sedimentos y/o agentes formadores de complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible obtener complejos del principio activo con diversos polímeros. Ejemplos de tales polímeros son polietilenglicol, poliestireno, carboximetilcelulosa, Pluronic[®] o éster de ácido graso de polietilenglicol-sorbitano. Los conjugados de resto de unión a dianas-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 dispersantes como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados, pueden usarse agentes de andamiaje como manitol, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o variedades de gelatina.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a los conjugados de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de cáncer de páncreas, 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 la administración al paciente de una cantidad eficaz de un conjugado o una composición farmacéutica de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación de amatoxina que comprende un grupo saliente X unido a un grupo de unión L conectado a una amatoxina, o un análogo de una amatoxina, en la que el grupo de unión L se conecta a la amatoxina mediante el átomo de N en 1' del aminoácido 4.

25 En determinadas realizaciones de tal aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación de amatoxina de fórmula I



Fórmula I

30 en la que:

R1 = H u OH;

R2= H u OH;

35

R3 = NH₂ u OH;

R4 = OH u O-alquilo C₁₋₆; y

40 R5 = L-X; en el que L es un grupo de unión y X es un grupo saliente que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas.

En una realización particular, el grupo nucleófilo es una amina primaria.

45 En una realización particular, la molécula de conjugación de amatoxina de fórmula I es un derivado de α -amanitina (R1= OH; R2 = OH y R3 = NH₂).

En una realización particular, R4 es O-Me.

En realizaciones particulares, el grupo de unión tiene una longitud de entre 1 y 8 átomos, particularmente entre 1 y 6, más particularmente entre 1 y 4 y lo más particularmente entre 2 y 4 átomos.

5 En determinadas realizaciones, el grupo de unión L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquenileno, heteroalquenileno, alquinileno, heteroalquinileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroalquileo, opcionalmente sustituido.

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

15 En determinadas realizaciones, el grupo funcional X se selecciona de: ^tbutiloxilo, 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-norborneno-2,3-dicarboximid-1-ilo), 1-ftalimidoiloxilo, 1-benzotriazoliloxilo, 1-(7-aza-benzotriazolil)oxilo y N-imidazolilo.

20 En aún 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 de amatoxina de la presente invención con un resto de unión a dianas que comprende un grupo nucleófilo, particularmente una amina primaria.

25 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una molécula de conjugación de amatoxina de la presente invención, que comprende la etapa de (i) hacer reaccionar una amatoxina con una molécula de grupo de unión Y-L-X, en la que Y es un resto que puede reaccionar con el átomo de N en 1' del aminoácido 4 de la amatoxina, y en la que X es un grupo saliente que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas, particularmente por una amina primaria.

30 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una molécula de conjugación de amatoxina de la presente invención, que comprende la etapa de (i) hacer reaccionar una amatoxina con una molécula de grupo de unión Y-L-Z, en la que Y es un resto que puede reaccionar con el átomo de N en 1' del aminoácido 4 de la amatoxina, y en la que Z es un resto que puede convertirse es un grupo saliente X, que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas, particularmente por una amina primaria.

35 En determinadas realizaciones, la amatoxina se hace reaccionar con una molécula de grupo de unión Y-L-X o Y-L-Z, respectivamente, en las que Y se selecciona del grupo que consiste en: O-Tos (O-Tos = tosilato); I; Br y O-Tf (O-Tf = triflato). En determinadas de tales realizaciones, la amatoxina se trata con Y-L-X o Y-L-Z, respectivamente, en presencia de una base, particularmente KO^tBu, LiOH o NaH, en un disolvente, particularmente en un disolvente aprótico polar tal como DMF, DMSO o NMP.

40 En determinadas realizaciones, el grupo Z es un grupo amino primario protegido, particularmente NH-C(=O)OtBu. En tales realizaciones particulares, la amina primaria protegida en primer lugar se desprotege y luego se activa mediante un derivado de ácido carbónico, tal como carbonato de dihidroxisuccinimidilo (DSC).

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de amatoxina-grupo de unión de fórmula I, en la que R1 a R4 son tal como se definieron anteriormente; y en la que R5 = L-Z; en el que L es un grupo de unión y en el que Z es un resto que puede convertirse en un grupo saliente X, que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas, particularmente por una amina primaria.

50

Ejemplos

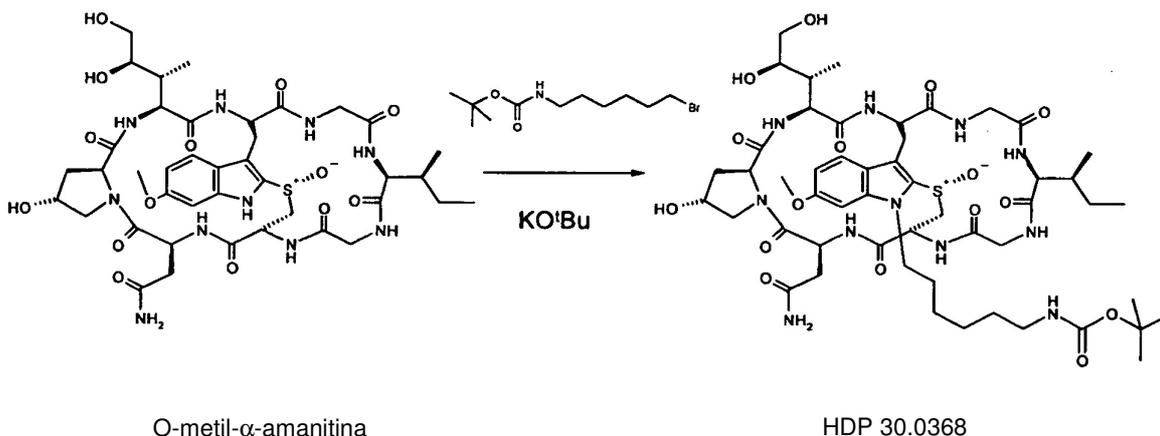
En lo que sigue, se explica la invención con más detalle mediante ejemplos:

55 EJEMPLO 1

Síntesis de grupo de unión-amanitinas en N1'

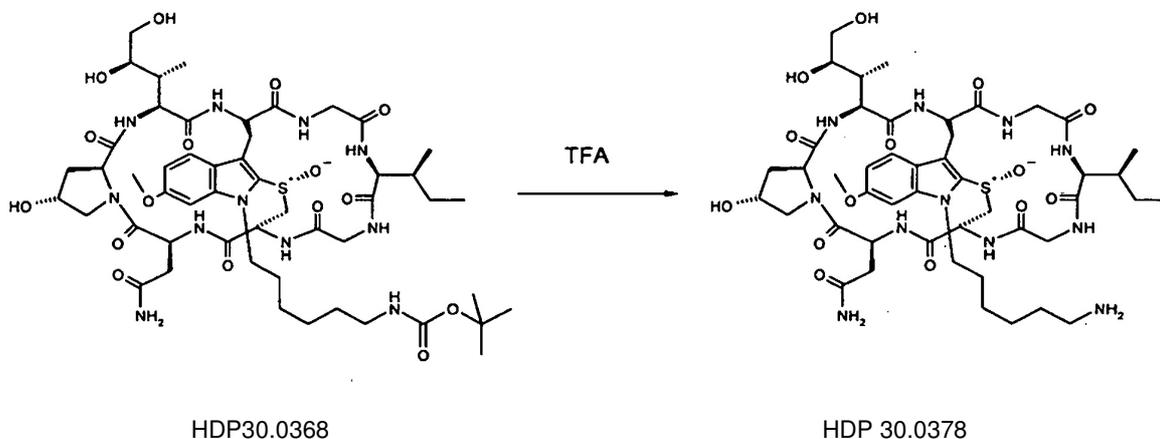
1.1 Preparación de N1'-6-aminohehil-6'-O-metil- α -amanitina (HDP 30.0378)

60



Se disolvieron 4,86 mg (5,21 μ mol) de O-metil- α -amanitina en 500 μ l de DMSO seco. Bajo argón, se añadieron 11,68 mg (41,67 μ mol) de bromuro de Boc-aminohexilo y 100 μ l de una disolución 52,1 mM de *t*-butanolato de potasio en DMSO. Se añadieron porciones adicionales de *t*-butanolato de potasio de la disolución madre 5,21 mM: 50 μ l a las 1,5 h; 50 μ l a las 4 h y 50 μ l a las 6 h. Tras 19 h, se añadieron 100 μ l de *t*-butanolato de potasio y 11,96 mg (41,67 μ mol) de bromuro de Boc-aminohexilo. Tras 21 h, se extinguió la mezcla de reacción con 104 μ l de una disolución de ácido acético 100 mM en DMSO. Se purificó el producto bruto en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 26,0 ml/min, detección a λ = 295 nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 100% de A; 5-20 min al 0% de A; 20-25 min al 0% de A; 25-27 min al 100% de A; 27-35 min al 100% de A; se recogió la fracción con el tiempo de retención de 19,2-20,9 min y se evaporaron los disolventes para dar un sólido.

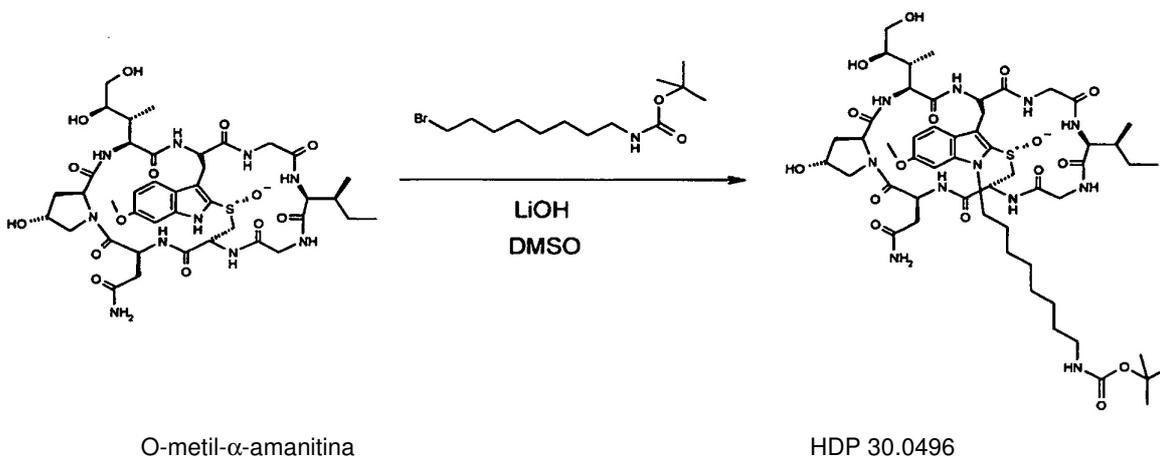
4,81 mg (81%) de HDP 30.0368; EM: 1133 ($M+H^+$).



Se disolvieron 4,75 mg (4,19 μ mol) de HDP 30.0368 en 200 μ l de ácido trifluoroacético y se agitaron durante 2 min. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad a la temperatura ambiental y se evaporó conjuntamente con 1000 μ l de tolueno y 10000 μ l de acetonitrilo. Se purificó el producto bruto en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 26,0 ml/min, detección a λ = 295 nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 100% de A; 5-20 min al 0% de A; 20-25 min al 0% de A; 25-27 min al 100% de A; 27-35 min al 100% de A; se recogió la fracción con el tiempo de retención de 14,9-15,5 min y se evaporaron los disolventes y se liofilizaron para dar un polvo.

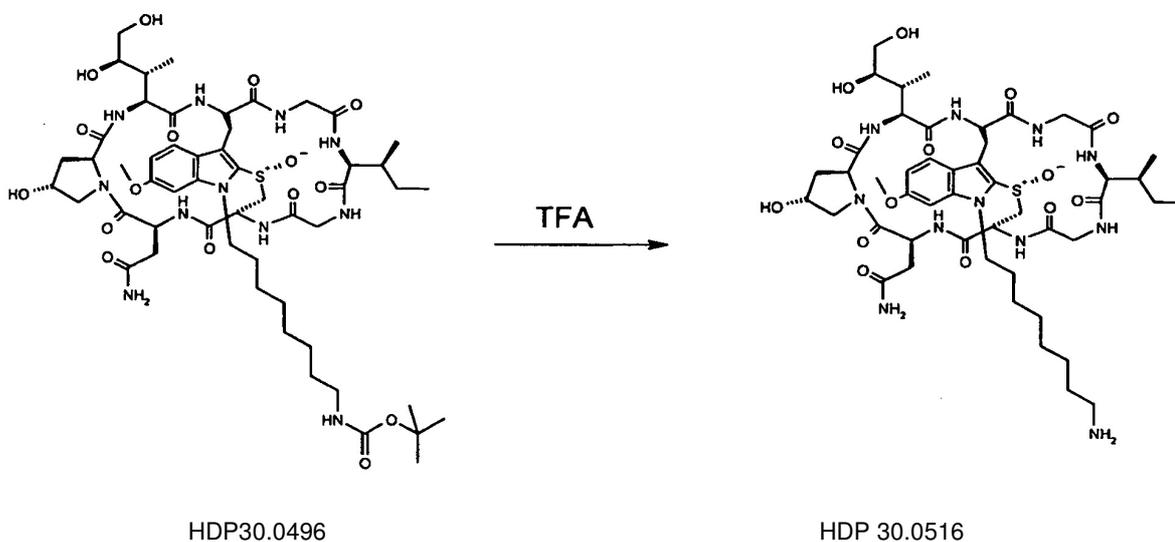
1,54 mg (32%) de HDP 30.0378; EM: 1033 ($M+H^+$).

1.2 Preparación de N1'-8-aminooctil-6'-O-metil- α -amanitina (HDP 30.0516)



- Se disolvieron 12,43 mg (13,32 μmol) de O-metil- α -metilamanitina en 750 μl de DMSO seco. Se añadieron 40,00 mg (129,76 μmol) de N-Boc-8-amino-bromooctano y 120 μl de una disolución de LiOH 0,1 M en DMSO/agua 1:1. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón. Tras 18 h, se añadieron 80 μl de LiOH adicionales seguidos por 40 μl a las 36 h, 50 μl a las 39 h y 80 μl a las 44 h después. Se eliminaron el DMSO y el agua a alto vacío y se purificó el residuo en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 230$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A; se recogió la fracción con el tiempo de retención de 37,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

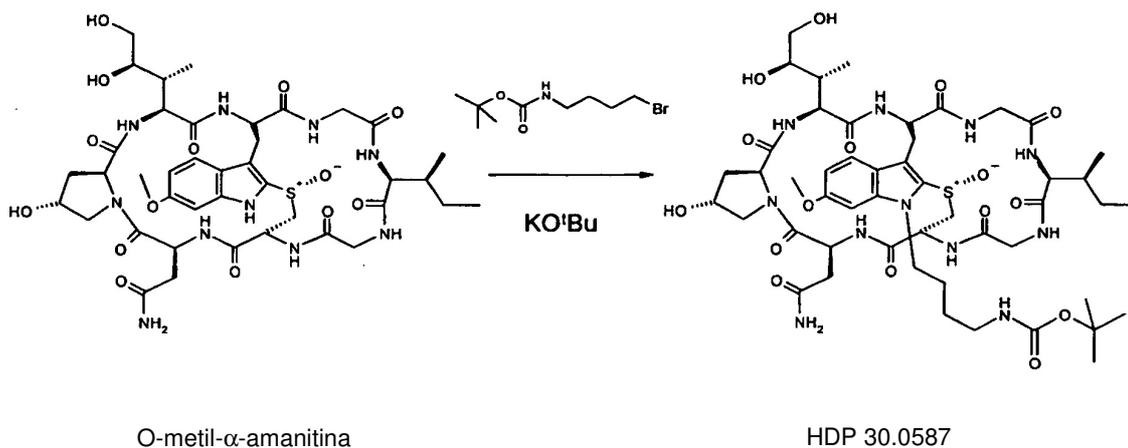
3,96 mg (26%) de HDP 30.0496 como un polvo blanco. EM: 1160 ($\text{M}+\text{H}^+$).



- Se disolvieron 3,96 mg (3,41 μmol) de HDP 30.0496 en 300 μl de ácido trifluoroacético y se agitaron durante 2,5 min a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con 1000 μl de tolueno y se evaporó hasta sequedad a la temperatura ambiental. Se evaporó conjuntamente el residuo dos veces con el mismo volumen de tolueno. Se purificó el residuo en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 230$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A; se recogió la fracción con el tiempo de retención de 21,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

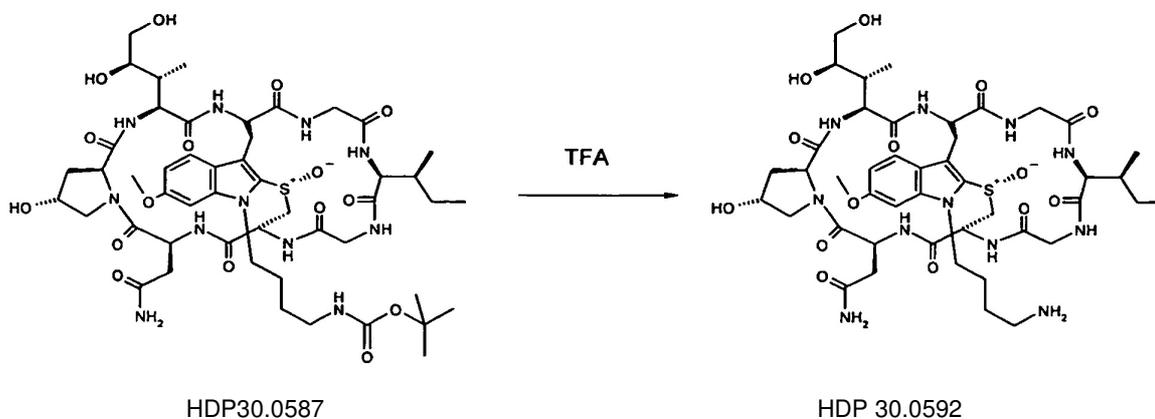
2,66mg (74%) de HDP 30.0516 como un polvo blanco. EM: 1060 ($\text{M}+\text{H}^+$); 1083 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

1.3 Preparación de N1'-6-aminobutil-6'-O-metil- α -amanitina HDP 30.0592



Se disolvieron 11,88 mg (12,74 μ mol) de O-metil- α -amanitina en 500 μ l de DMSO seco. Bajo argón, se añadieron 20,00 mg (79,32 μ mol) de bromuro de Boc-aminobutilo y 83,4 μ l de una disolución 0,25 mM de *t*-butanolato de potasio. Se añadieron porciones adicionales de 20,00 mg (79,32 μ mol) de bromuro de Boc-aminobutilo y 83,4 μ l de *t*-butanolato de potasio cada hora durante el periodo de reacción. Se extinguió la mezcla de reacción con 100 μ l de ácido acético tras 8 h. Se purificó el producto bruto en una HPLC con LaPrep: columna: Phenomenex Luna C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua, flujo: 15,0 ml/min, detección a λ = 290 nm. Disolvente A: el 100% de agua. Disolvente B: el 100% de metanol. Gradiente: 0 min al 95% de A; 0-5 min al 50% de A; 5-10 min al 30% de A; 10-20 min al 20% de A; 20-45 min al 5% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 16,5 min y se evaporaron los disolventes.

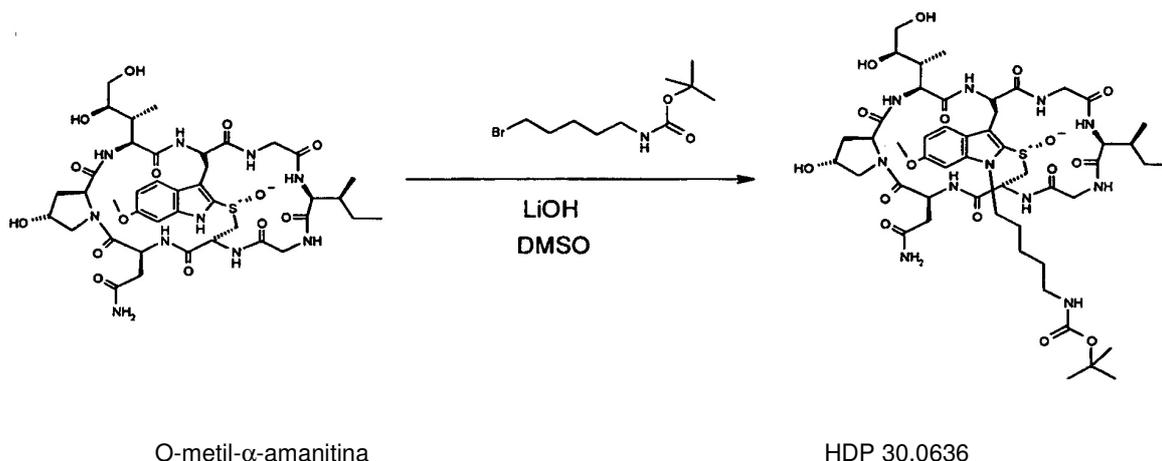
5,10 mg (36%) de HDP 30.0587; EM: 1104,5 ($M+H^+$).



15 Se disolvieron 5,10 mg (4,61 μ mol) de HDP 30.0587 en 1000 μ l de ácido trifluoroacético y se agitaron durante 2 min. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad a la temperatura ambiental y se secó a vacío. Se purificó el producto bruto en una HPLC con LaPrep: columna: Phenomenex Luna C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua, flujo: 15,0 ml/min, detección a λ = 290 nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 5% de agua: el 95% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0 min al 100% de A; 0-5 min al 50% de A; 5-10 min al 30% de A; 10-20 min al 20% de A; 20-45 min al 0% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 10,0 min y se evaporaron los disolventes.

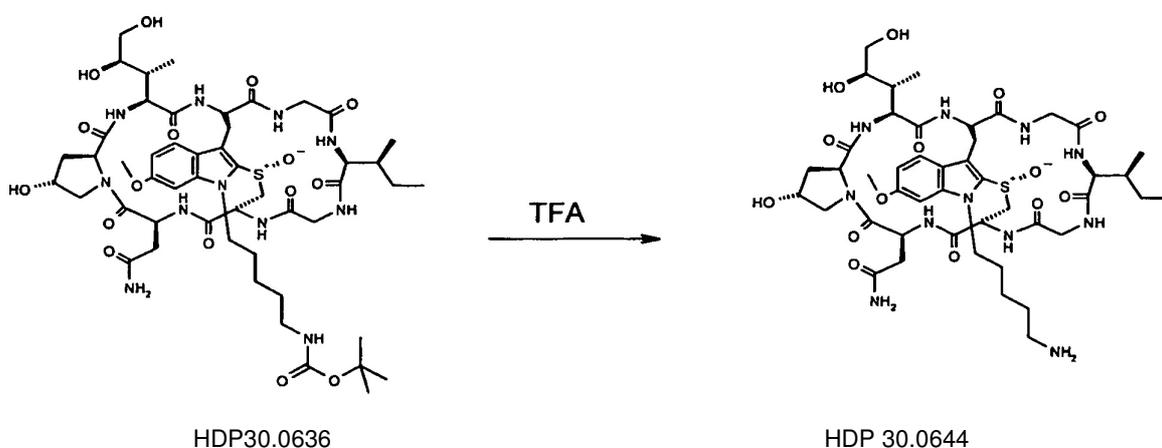
3,48 mg (75%) de polvo blanco de HDP 30.0592 EM: 1004,4 ($M+H^+$).

25 1.4 Preparación de N1'-6-aminopentil-6'-O-metil- α -amanitina HDP 30.0644



Se disolvieron 8,40 mg (9,00 μmol) de O-metil- α -metilamanitina en 400 μl de DMSO seco. Se añadieron 29,00 mg (108,94 μmol) de N-Boc-5-aminobromopentano y 14,20 μl de una disolución de LiOH 1 M en agua. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón. Tras 4 h, se añadieron 7,10 μl de LiOH adicionales. Se extinguió la mezcla con 100 μl de ácido acético tras 6 h, y se eliminaron el DMSO y el agua a alto vacío. Se purificó el residuo en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua, flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol. Disolvente B: el 5% de agua: el 95% de metanol. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 30 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

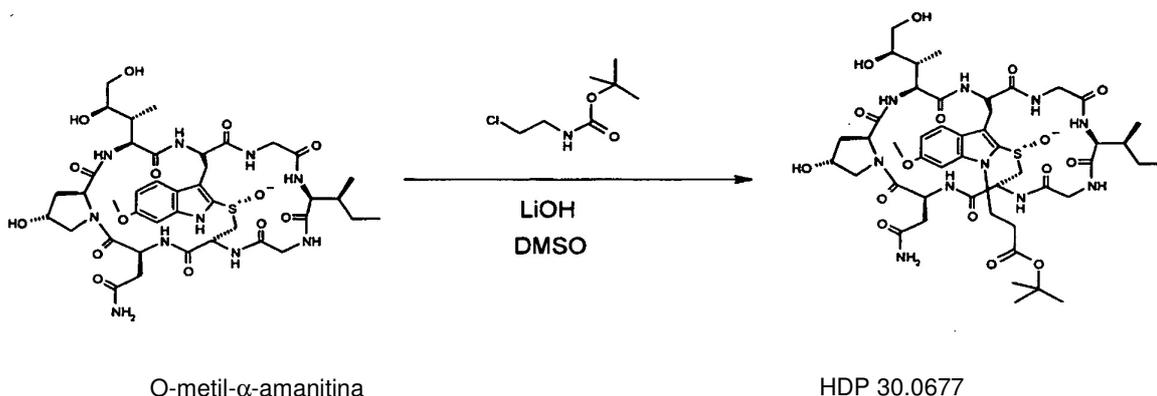
Se obtuvo HDP 30.0636 como un polvo blanco. EM: 1118,5 ($\text{M}+\text{H}^+$). Se usó el producto para la siguiente etapa.



Se disolvió HDP 30.0636 en 400 μl de ácido trifluoroacético y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con 1000 μl de tolueno y se evaporó hasta sequedad a la temperatura ambiental. Se evaporó conjuntamente el residuo sólido con el mismo volumen de tolueno (2 veces) y se purificó en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 18,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

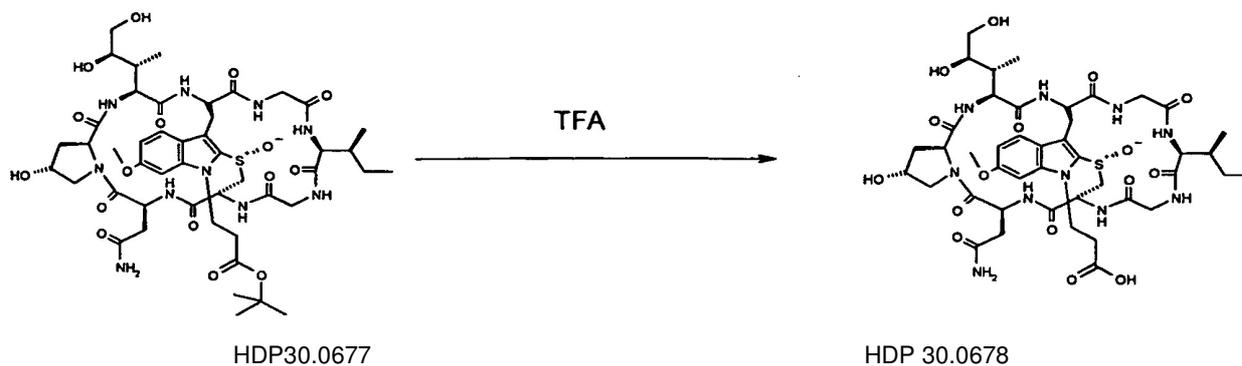
0,51 mg de polvo blanco (6%, rendimiento global) de HDP 30.0644. EM: 1018,4 ($\text{M}+\text{H}^+$).

25 1.5 Preparación de N1-*t*-butilpropionil-6-O-metil- α -amanitina HDP 30.0678



Se disolvieron 7,04 mg (7,55 μ mol) de O-metil- α -metilamanitina en 500 μ l de DMSO seco. Se añadieron 14,10 μ l de una disolución de LiOH 1 M en agua. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 5 min y se añadieron 20 μ l de éster t-butílico del ácido 1-cloropropiónico. Tras 1 h, se añadieron 20,00 μ l de LiOH y 20,00 μ l de éster t-butílico del ácido 1-cloropropiónico adicionales. Se extinguió la mezcla con 100 μ l de ácido acético tras 2 h. Se eliminaron el DMSO y el agua a alto vacío y se purificó el residuo en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua, flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol. Disolvente B: el 5% de agua: el 95% de metanol. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 26,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

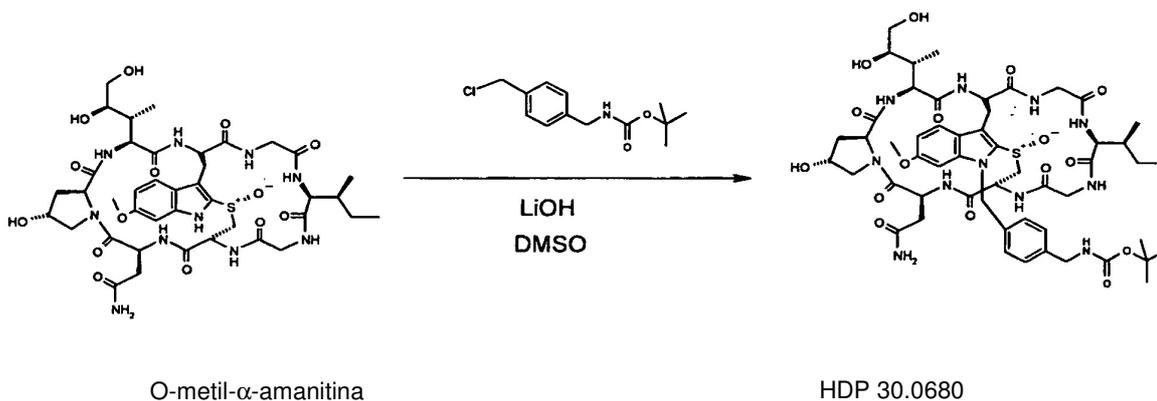
Se obtuvo HDP 30.0677 como un sólido blanco. EM: 1047,4 ($M+H^+$). Se usó el residuo para la siguiente etapa.



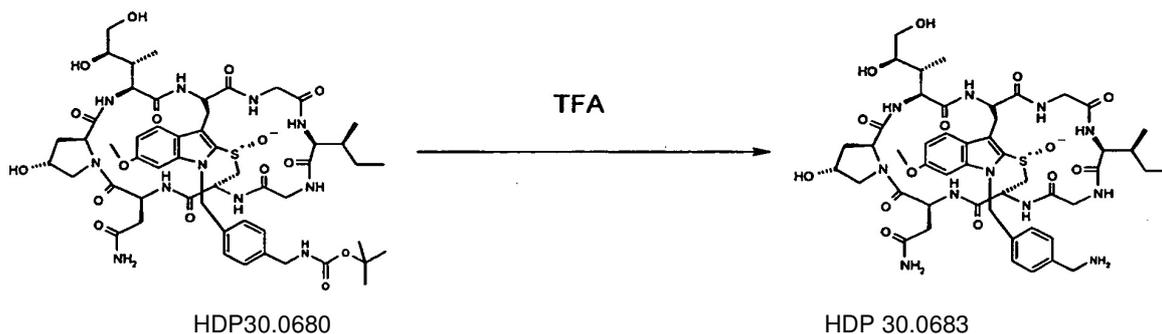
Se disolvió HDP 30.0677 en 500 μ l de ácido trifluoroacético y se agitó durante 4 min a temperatura ambiente. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad a la temperatura ambiental. Se evaporó conjuntamente el residuo dos veces con 5 ml de tolueno. Se purificó el residuo blanco en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 18,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

1,90 mg (25%) de polvo blanco de HDP 30.0678. EM: 991,3 ($M+H^+$).

1.6 Preparación de N1'-4-Boc-aminometilbencil-6'-O-metil- α - amanitina HDP 30.0683



Se disolvieron 8,90 mg (9,54 μmol) de O-metil- α -metilamanitina en 500 μl de DMSO seco. Se añadieron 21,4 μl de una disolución de LiOH 1 M en agua. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 10 min y se añadieron 20,0 mg (78,40 μmol) de cloruro de 4-Boc-aminobencilo de una vez. Tras 18 h, se extinguió la mezcla de reacción con 100 μl de ácido acético. Se eliminaron el DMSO y el agua a alto vacío y se purificó el residuo en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua, flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol. Disolvente B: el 5% de agua: el 95% de metanol. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 34,0 min y se evaporaron los disolventes a vacío, lo que dio HDP 30.0680 como un residuo blanco. EM: 1152,5 ($\text{M}+\text{H}^+$). Se usó el producto para la siguiente etapa.



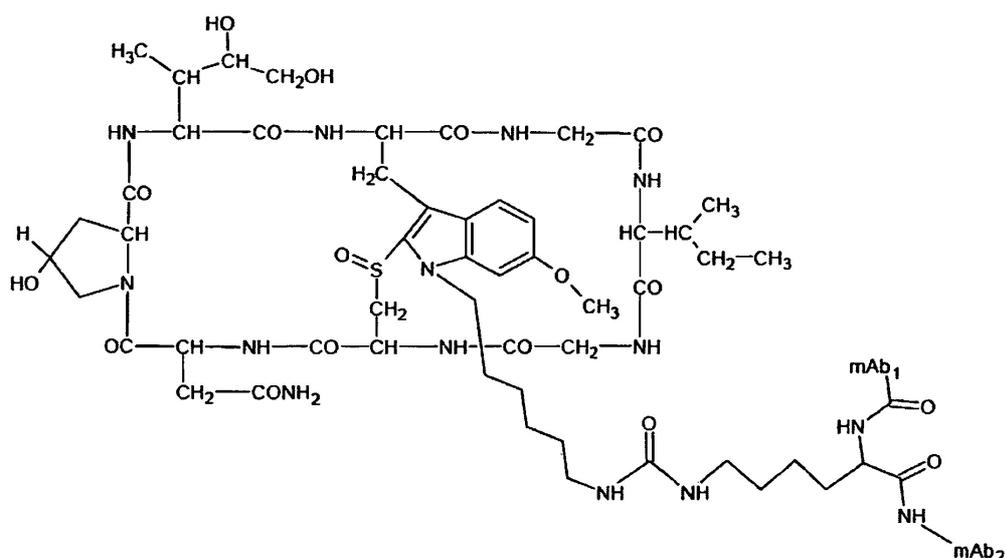
Se disolvió HDP 30.0680 en 500 μl de ácido trifluoroacético y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente y se evaporó hasta sequedad a la temperatura ambiental. Se evaporó conjuntamente el residuo dos veces con 4 ml de tolueno. Se purificó el polvo blanco en una HPLC con LaPrep: columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 x 20 mm, con metanol/agua (el 0,05% de TFA), flujo: 10,0 ml/min, detección a $\lambda = 290$ nm. Disolvente A: el 95% de agua: el 5% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Disolvente B: el 10% de agua: el 90% de metanol, el 0,05% de ácido trifluoroacético. Gradiente: 0-5 min al 80% de A; 5-10 min al 50% de A; 10-20 min al 30% de A; 20-50 min al 20% de A. Se recogió la fracción con el tiempo de retención de 18,4 min y se evaporaron los disolventes a vacío.

3,15 mg (31%) de HDP 30.0683 como un polvo blanco. EM: 1052,4 ($\text{M}+\text{H}^+$).

EJEMPLO 2

Síntesis de conjugado de amatoxina

Síntesis de conjugado de HDP 30.0378. Her-DSC-30.0378 [2.8]



Se disolvió 1,0 mg de HDP 30.0378 en 100 μ l de dimetilformamida (DMF) seca. Bajo argón y con agitación a temperatura ambiente, se añadieron 10,4 μ l de una disolución de carbonato de dihidroxisuccinimidilo (DSC) en DMF (2,56 mg en 100 μ l de DMF) y 2,1 ml de trietilamina de una vez. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras 12 h, se añadieron 30 ml de dietil éter frío. Se recogió el precipitado y se lavó varias veces con dietil éter y se secó a vacío. Se llevó el sólido restante a 200 μ l de DMF = disolución A. Se disolvieron 12,0 mg de Herceptin 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 de Herceptin y amanitina-grupo de unión a 4°C durante 14 h y se separó mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-25 (columna XK-16; 2 ml/min). Se sometió a lavado previo la columna G-25 con 500 ml de disoluciones de PBS, pH = 7,4. Se detectó la fracción del conjugado Her-DSC-30.0378 mediante absorción UV. Se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). Se determinó la carga útil de amanitina del Herceptin mediante determinación de la absorción UV a $\lambda = 280$ nm y $\lambda = 310$ nm. Se calculó una carga útil de toxina de 2,8 moléculas de amanitina por cada molécula de Herceptin.

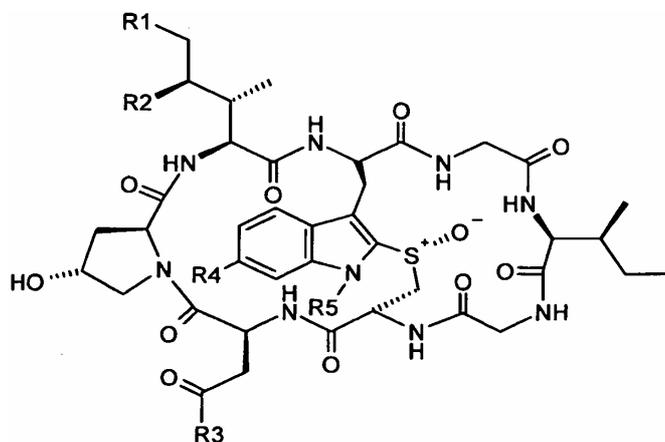
EJEMPLO 3

Citotoxicidad de Her-DSC-30.0378 [2.8] en una línea celular tumoral positiva para HER2 *in vitro*

Se evaluó la actividad citotóxica de Her-DSC-30.0378 [2.8] con la línea celular tumoral positiva para HER2, SK-OV-3 (ovario) y un ensayo de incorporación de BrdU quimioluminiscente (Roche Diagnostics) *in vitro*. Se determinó la viabilidad celular tras incubación durante 72 h con diferentes concentraciones de Her-DSC-30.0378 [2.8] a 37°C y al 5% de CO₂ mediante medición de células fijadas y permeabilizadas con un anticuerpo anti-BrdU-HRP en un lector de microplacas Optima de BMG Labtech. Se calculó el valor de CE₅₀ de la curva de dosis-respuesta mediante el software Graphpad Prism 4.0. La CE₅₀ para Her-DSC-30.0378 [2.8] con las células SK-OV-3 fue de $4,1 \times 10^{-11}$ M. (véase la figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de amatoxina de fórmula I



Fórmula I

5

en la que:

R1 = H u OH;

10 R2 = H u OH;

R3 = NH₂ u OH;

15 R4 = OH u O-alquilo C₁₋₆; y

R5 = L-T; en el que L es un grupo de unión y T es un resto de unión a dianas.

20

2. Conjugado de amatoxina según la reivindicación 1, en el que el grupo de unión se conecta al resto de unión a dianas mediante un resto urea.

3. Conjugado de amatoxina según la reivindicación 2, en el que el resto de unión a dianas se conecta al grupo de unión L mediante un grupo amino presente en el resto de unión a dianas, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto urea.

25

4. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que el grupo de unión tiene una longitud de entre 1 y 8 átomos, particularmente entre 1 y 6, más particularmente entre 1 y 4, y lo más particularmente entre 2 y 4 átomos.

30

5. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que el grupo de unión L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquenileno, heteroalquenileno, alquinileno, heteroalquinileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o heteroaralquileo, opcionalmente sustituido.

35

6. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que el grupo de unión L comprende un resto seleccionado de uno de los siguientes restos: un resto disulfuro, éter, amina, éster, carboxamida, uretano y urea.

40

7. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que el resto de unión a dianas se une específicamente a un epítipo que está presente en una célula tumoral, particularmente en el que el resto de unión a dianas se une específicamente a un epítipo de una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM).

8. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que el resto de unión a dianas se selecciona del grupo que consiste en:

45

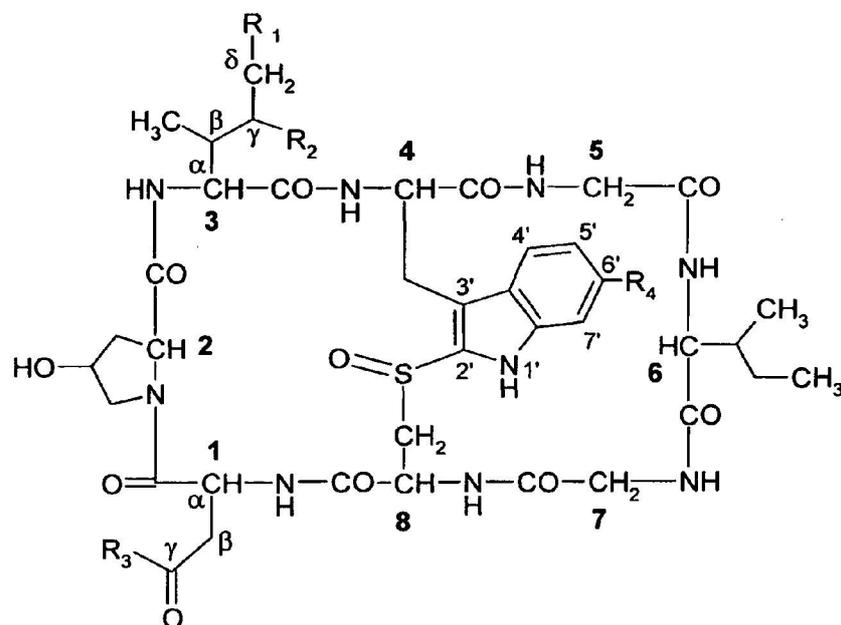
(i) anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo; particularmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo seleccionado de: un díacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano;

(ii) proteína similar a anticuerpo; y

(iii) aptámero de ácido nucleico.

- 5 9. Conjugado de amatoxina según la reivindicación 8, en el que el resto de unión a dianas es un fragmento de unión a antígenos seleccionado del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla y Fv con enlaces disulfuro (dsFv).
- 10 10. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como medicamento.
- 10 11. Conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, particularmente en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de páncreas, 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.
- 15 12. Composición farmacéutica que comprende un conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y que comprende además uno o más diluyentes, portadores, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, disgregantes, adsorbentes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.
- 20 13. Molécula de conjugación de amatoxina de fórmula I, en la que R1 a R4 son tal como se definen en la reivindicación 1; y en la que R5 = L-X; en el que L es un grupo de unión y X es un grupo saliente que puede remplazarse por un grupo nucleófilo de un resto de unión a dianas, particularmente en el que X es un grupo saliente que puede remplazarse por una amina primaria.
- 25 14. Molécula de conjugación de amatoxina según la reivindicación 13, 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-norborneno-2,3-dicarboximid-1-ilo), -1-ftalimidiloxilo, -1-benzotriazoliloxilo, -1-(7-aza-benzotriazolil)oxilo y -N-imidazolilo.
- 30 15. Método para sintetizar un conjugado de amatoxina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la etapa de hacer reaccionar una molécula de conjugación de amatoxina según la reivindicación 13 ó 14 con un resto de unión a dianas que comprende un grupo nucleófilo, particularmente en el que dicho grupo nucleófilo es una amina primaria.

Fig. 1



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

Fig. 2

