

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 745**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 7/52 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 47/62 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/EP2011/004875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12041504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11763857 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2621536**

54 Título: **Conjugados de amatoxina**

30 Prioridad:

30.09.2010 EP 10012573

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

29.01.2018

73 Titular/es:

**HEIDELBERG PHARMA RESEARCH GMBH
(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 2 651 745 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

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 diana, por ejemplo un anticuerpo, conectados a través de un conector que comprende un resto de urea, que son útiles en el tratamiento del cáncer. En un aspecto más la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de este tipo.

Antecedentes de la invención

10 Las amatoxinas son péptidos cíclicos formados por 8 aminoácidos. Se pueden aislar a partir de hongos *Amanita phalloides* o se pueden preparar de forma sintética. Las amatoxinas inhiben de forma específica la ARN polimerasa II dependiente de ADN de células de mamífero, y por lo tanto también la transcripción y biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula produce la parada del crecimiento y la proliferación. Aunque no está unido de forma covalente, 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 improbable la recuperación de una célula afectada. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado tiempo, la célula sufrirá muerte celular programada (apoptosis).

El uso de amatoxinas tales como restos citotóxicos para terapia tumoral ya se había explorado en 1981 mediante el acoplamiento de un anticuerpo anti-Thy 1.2 a α -amanitina usando un conector unido al anillo de indol del Trp (aminoácido 4; véase la Figura 1) por medio de diazotación (Davis y Preston, Science 1981, 213, 1385-1388).

20 La solicitud de patente EP 1 859 811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describió conjugados, en los que el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina de la β -amanitina se acoplaba directamente, es decir, sin una estructura conectora, a albúmina o a los anticuerpos monoclonales HEA125, OKT3, o PA-1. Además, se mostró el efecto inhibitorio de estos conjugados en 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 conectores, incluyendo conectores que comprenden elementos tales como restos de amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo y similares, pero las construcciones de ese tipo realmente no se mostraban, y no se proporcionaban más detalles, tales como sitios de unión a las Amatoxinas. El documento de patente WO 2007/121326 A2 desvela un conjugado que comprende un oligonucleótido que forma estructuras tríplex (TFO) está unido mediante enlace covalente al átomo γ -C de la beta-amanitina por medio de un enlace que contiene amida.

30 Se sabe que las amatoxinas son relativamente no tóxicas cuando se acoplan a vehículos de biomoléculas grandes, tales como moléculas de anticuerpo, y que ejercen su actividad citó tóxica solamente después de que el vehículo de la biomolécula se haya escindido. En vista de la toxicidad de las amatoxinas, en particular para las células hepáticas, es de máxima importancia que los conjugados de amatoxina para terapia tumoral dirigida permanezcan altamente estables después de su administración en plasma, y que la liberación de la amatoxina se produzca después de la internalización en las células diana. En este contexto, las 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

40 Por lo tanto, en la técnica anterior había una gran necesidad de conjugados de resto de unión a diana y amatoxina que fueran estables en plasma, de modo que se minimicen los efectos secundarios nocivos para las células diana.

Sumario de la invención

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

45 (i) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;
 (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
 (iii) el átomo δ' C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo δ' C del aminoácido 4 de la amatoxina;

50 en cada caso en el que el conector L está conectado al resto de unión a diana por medio de un resto de urea.

En un segundo aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación a amatoxina que comprende un conector L conectado a una amatoxina por medio de

- 5 (i) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;
 (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
 (iii) el átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina;

- 10 en cada caso en el que el conector L comprende un derivado del ácido carbámico $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en el que X es un grupo saliente que se puede sustituir con una amina primaria de un resto de unión a diana.

En otro aspecto más, 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 a amatoxina de la presente invención con un resto de unión a diana que comprende un grupo amino primario.

15 **Breve descripción de las figuras**

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

- 20 La **Fig. 2** muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector en células SKOV-3 en un ensayo de BrdU después de incubación durante 72 h.

La **Fig. 3** muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector en células SK-BR-3 en un ensayo de BrdU después de incubación durante 72 h.

- 25 La **Fig. 4** muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector en células NCI-N87 en un ensayo de BrdU después de incubación durante 72 h.

La **Fig. 5** muestra la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector en células MDA-MB231 en un ensayo de BrdU después de incubación durante 72 h.

- 30 La **Fig. 6** y la **Fig. 7** muestran la cantidad de amanitina liberada a partir de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector después de incubación en plasma hasta 14 días.

La **Fig. 8** muestra una comparación de la actividad citotóxica de diferentes conjugados de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector en células SKOV-3 en un ensayo de BrdU antes y después de incubación en plasma.

- 35 La **Fig. 9** muestra una comparación de la actividad de dos conjugados diferentes de amanitina y herceptin usando diferentes restos de conector *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de SKOV-3.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados tal como normalmente lo entiende alguien con una experiencia habitual en la materia.

- 40 Preferentemente, los términos usados en el presente documento se definen 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).

A través de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el término "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de ningún número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

- 45 A través del texto de la presente memoria descriptiva se mencionan varios documentos.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle. En los párrafos que siguen a continuación se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto definido de ese modo se puede combinar con otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente de otro modo. En particular, cualquier característica indicada como preferente o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características indicadas como preferentes o ventajosas.

- 50 como preferentes o ventajosas.

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

- 5 (iv) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;
 (v) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
 (vi) el átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina;

en cada caso en el que el conector L está conectado al resto de unión a diana por medio de un resto de urea.

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

La expresión "resto de unión a diana", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que se pueda unir de forma específica a una molécula diana o epítipo diana. Los restos de unión a diana preferentes en el contexto de la presente solicitud son (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; (ii) proteínas similares a anticuerpo; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a diana" adecuados para su uso en la presente invención por lo general tienen una masa molecular de 40 000 Da (40 kDa) o superior.

Como se usa en el presente documento, se considera que un primer compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) se "une de forma específica" a un segundo compuesto (por ejemplo, un antígeno, como una proteína diana), si éste tiene una constante de disociación K_D con respecto a dicho compuesto de 100 μ M o inferior, preferentemente 50 μ M o inferior, preferentemente 30 μ M o inferior, preferentemente 20 μ M o inferior, preferentemente 10 μ M o inferior, preferentemente 5 μ M o inferior, más preferentemente 1 μ M o inferior, más preferentemente 900 nM o inferior, más preferentemente 800 nM o inferior, más preferentemente 700 nM o inferior, más preferentemente 600 nM o inferior, más preferentemente 500 nM o inferior, más preferentemente 400 nM o inferior, más preferentemente 300 nM o inferior, más preferentemente 200 nM o inferior, incluso más preferentemente 100 nM o inferior, incluso más preferentemente 90 nM o inferior, incluso más preferentemente 80 nM o inferior, incluso más preferentemente 70 nM o inferior, incluso más preferentemente 60 nM o inferior, incluso más preferentemente 50 nM o inferior, incluso más preferentemente 40 nM o inferior, incluso más preferentemente 30 nM o inferior, incluso más preferentemente 20 nM o inferior, e incluso más preferentemente 10 nM o inferior.

30 En el contexto de la presente solicitud las expresiones "molécula diana" y "epítipo diana", respectivamente, se refieren a un antígeno y a un epítipo de un antígeno, respectivamente, que se unen de forma específica mediante un resto de unión a diana. Preferentemente 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 creciente y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de células tumorales. Preferentemente, dicho antígeno o epítipo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales, pero no en la superficie de células no tumorales. En realizaciones en particular, el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo de HER-2/neu o molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). En otras realizaciones, dicho antígeno o epítipo se expresa preferentemente en células implicadas en enfermedades autoinmunes. En las realizaciones de este tipo en particular, el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo del receptor IL-6 (IL-6R).

La expresión "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo", 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 sitios de unión a antígeno que se unen de forma inmunoespecífica a un antígeno. También están comprendidas proteínas similares a la inmunoglobulina que seleccionan a través de clínicas que incluye, por ejemplo, presentación de fagos para unirse de forma específica 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 antígeno de los mismos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multispecíficos, humanos, humanizados (en particular injertado son CDR), des-inmunizados, o quiméricos, anticuerpos de una sola cadena (por ejemplo, scFv), fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab')₂, fragmentos producidos con 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 para anticuerpos de la invención), y anticuerpos de unión a epítipo de cualquiera de los mencionados anteriormente.

55 En algunas realizaciones los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo de unión antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, los Fv de una sola

cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, Fv unidos por enlaces disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprende en cualquiera de un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de una sola cadena, pueden comprender el dominio o dominios variables solos o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios CL, CH1, CH2, y CH3. En la invención tal vez están incluidos los fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de dominio o dominios variables con una región bisagra, dominios CL, CH1, CH2, y CH3.

Los anticuerpos que se pueden usar en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son de origen humano, roedor (por ejemplo, ratón, rata, cobaya, o conejo), pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro. En particular es preferente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. 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 de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe por ejemplo en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.939.598 de Kucherlapati di Jakobovits.

La expresión "proteína similar a anticuerpo" se refiere a una proteína que se ha modificado mediante ingeniería (por ejemplo, mediante mutagénesis de bucles) para unirse de forma específica a una molécula diana. Por lo general, una proteína similar a anticuerpo de este tipo comprende al menos un bucle de Péptido variable unido a ambos extremos de un armazón de proteína. Esta doble limitación estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína similar a anticuerpo hasta niveles comparables con los de un anticuerpo. La longitud del bucle de péptido variable por lo general consta de 10 a 20 aminoácidos. La proteína de armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Preferentemente, la proteína de armazón es una proteína globular pequeña. Las proteínas similares anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, aficuerpos, anticalinas, y proteínas de repetición de anquirina diseñadas (para una revisión véase: Binz *et al.* 2005). Las proteínas similares a anticuerpos se pueden obtener a partir de bibliotecas de mutantes grandes, por ejemplo se pueden seleccionar a partir de bibliotecas de presentación de fagos grandes y se pueden aislar por analogía a la anticuerpos regulares. Además, las proteínas de unión similares a anticuerpos se pueden obtener mediante mutagénesis combinatoria de restos con la superficie expuesta en proteínas globulares.

La expresión "aptámero de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha modificado mediante ingeniería a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse 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.

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, que además contiene al menos un grupo químico no presente en el compuesto y/o tiene deficiencia de al menos un o que está presente en el compuesto. El compuesto con el que se compara el derivado se conoce como compuesto "precursor". Por lo general, un "derivado" se puede producir a partir del compuesto precursor en una o más etapas de reacción química.

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 compuesto "precursor". Las actividades mencionadas anteriormente incluyen, pero no se limitan a: actividad de unión a otro compuesto; actividad inhibitoria, por ejemplo actividad de inhibición enzimática; efectos tóxicos; actividad de activación, por ejemplo actividad de activación enzimática. No es necesario que el análogo presente una actividad de este tipo en la misma medida que el compuesto precursor. Un compuesto Se contempla como un análogo dentro del contexto de la presente solicitud, se presenta la actividad pertinente hasta un grado de al menos un 1 % (más preferentemente al menos un 5 %, más preferentemente al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 40 %, and más preferentemente al menos un 50 %) de la actividad del compuesto precursor. Por lo tanto, un "análogo de una amatoxina", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que está relacionado estructuralmente con uno cualquiera de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico como se muestra en la Fig. 1 y que presenta al menos un 1 % (más preferentemente al menos un 5 %, más preferentemente al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 40 %, and más preferentemente al menos un 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 actividad inhibitoria mayor frente a la ARN polimerasa II de mamífero que uno cualquiera de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico. La actividad inhibitoria se podría medir mediante la determinación de la concentración a la que se produce un 50 % de inhibición (valor de CI_{50}). La actividad inhibitoria frente a la ARN polimerasa II de mamífero se puede determinar 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. Por lo general, un "análogo semisintético" de la presente invención se sintetizó partiendo de un compuesto aislado a partir de un hongo de la familia Amanita. Por el contrario, un "análogo sintético" se refiere a un análogo sintetizado mediante la denominada síntesis total a partir de componentes básicos pequeños (por lo general petroquímicos). Normalmente, esta síntesis total se realiza sin la ayuda de procesos biológicos.

Como se usa en el presente documento, un "conjugado de aptámero" se refiere a un conjugado de resto de unión a diana y toxina en el que el resto de unión a diana es un aptámero de ácido nucleico de acuerdo con la alternativa (iii) mencionada anteriormente.

Un "conector" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula que se conecta a dos componentes, cada uno estando unido a un extremo del conector, y que aumenta la distancia entre dos componentes y alivia la interferencia estérica entre estos componentes, de modo que en el presente caso entre el resto de unión a diana y la amatoxina. En ausencia de un conector, una unión directa de la amatoxina al resto de unión a diana puede disminuir la capacidad de la amatoxina para interactuar con la ARN polimerasa II. En realizaciones en particular, un conector obtiene una cadena continua con 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, o 30 átomos) en su estructura principal, es decir la longitud del conector se define como la conexión más corta tal como se mide mediante el número de átomos o enlaces entre el resto de amatoxina y el resto de unión a diana, en el que un lado de la estructura principal del conector ha reaccionado con la amatoxina y, el otro lado con un resto de unión a diana. En el contexto de la presente invención, un conector es preferentemente un grupo alquileo C₁₋₂₀, heteroalquileo C₁₋₂₀, alquenileno C₂₋₂₀, heteroalquenileno C₂₋₂₀, alquinileno C₂₋₂₀, heteroalquinileno C₂₋₂₀, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo, o un grupo heteroaralquileo, opcionalmente sustituido. El conector puede contener uno o más elementos estructurales tales como restos de carboxamida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, hidrocarburo. El conector también puede contener combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el conector más de una vez, por ejemplo dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, o seis veces. En algunas realizaciones el conector puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el conector se tiene que unir ya sea en una sola etapa o en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y al resto de unión a diana. Con este fin el conector portará dos grupos, preferentemente en un extremo proximal y distal, que puede (i) formar un enlace covalente con un grupo presente en uno de los componentes a unir, preferentemente un grupo activado en una amatoxina o el péptido de unión a diana o (ii) que está activado o se puede activar para formar un enlace covalente con un grupo en una amatoxina. Por consiguiente, es preferente que los grupos químicos estén en el extremo distal y proximal del conector, 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 formados 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), y además incluye todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos formados a partir de componentes básicos de acuerdo con la estructura principal de los compuestos naturales (cíclicos, 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 el resto de sulfóxido de tioéter está sustituido por un sulfuro, sulfona, o por átomos distintos al azufre, por ejemplo un átomo de carbono al igual que en un carba-análogo de amanitina, en cada caso en el que cualquier derivado o análogo de este tipo es funcionalmente activo mediante la inhibición de la ARN polimerasa II de mamífero.

Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsi péptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamífero. Las amatoxinas preferentes son las que tienen un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o un grupo de captura de tiol) que se puede hacer reaccionar con moléculas conectoras por restos de unión a diana como se ha definido anteriormente. Las amatoxinas que son en particular adecuadas para los conjugados de la presente invención son α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, y ácido amanulínico como se muestra en la Fig. 1 así como sales, derivados químicos, análogos semisintéticos, y análogos sintéticos de los mismos. Las amatoxinas particularmente preferentes para su uso en la presente invención son α -amanitina, β -amanitina, y amaninamida.

En el contexto de la presente invención la expresión "conectado al resto de unión a diana por medio de un resto de urea" se refiere a una conexión entre el conector y el resto de unión a diana, en la que el resto de unión a diana está directamente unido al conector por medio de un grupo -NH-C(O)-NH-.

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

amatoxina- γ C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
 amatoxina- δ C-O-C(O)-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
 amatoxina- δ C-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
 amatoxina- δ C-O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana; y
 amatoxina-6'C-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana.

En realizaciones de la presente invención en particular, el resto de unión a diana está conectado al conector L por medio de un grupo amino presente en el resto de unión a diana, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto de urea.

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

En realizaciones de la presente invención en particular, el conector L comprende uno o más grupos, en particular uno, dos o tres grupos, seleccionados entre el listado de: grupo alquileo, alquenileo, alquinileo, cicloalquileo, heteroalquileo, heteroalquenileo, heteroalquinileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo, y un grupo heteroaralquileo, en el que cada grupo opcionalmente puede estar independientemente sustituido.

El término "alquileo" se refiere a grupos hidrocarburos saturados de cadena lineal divalentes que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, incluyendo grupos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, los grupos alquileo pueden ser grupos alquileo inferior. La expresión "alquileo inferior" se refiere a grupos alquileo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, y en ciertas realizaciones de 1 a 5 o de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquileo incluyen, pero no se limitan a, metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂-CH₂-), n-propileno, n-butileno, n-pentileno, y n-hexileno.

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

Como se usa en el presente documento, "cicloalquileo" pretende hacer referencia a un anillo divalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que un anillo de este tipo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, y en el que un anillo de este tipo está totalmente saturado, y el término "cicloalquenileo" pretende hacer referencia a un anillo divalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que un anillo de este tipo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, y en el que un anillo de este tipo está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno). Los ejemplos de cicloalquileos incluyen, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno, y cicloheptileno. Los ejemplos de cicloalquenileos incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenileno y ciclohexenileno.

Como se usa en el presente documento, los términos "heterocicloalquileo" y "heterocicloalquenileo" pretende hacer referencia a un anillo divalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, en el que un anillo de este tipo tiene entre 3 y aproximadamente 12 átomos, y en el que un anillo de este tipo consta de átomos de carbono y al menos un heteroátomo, en particular al menos un heteroátomo seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en N, O y S, con heterocicloalquileo haciendo referencia a un anillo de este tipo que está totalmente saturado, y heterocicloalquenileo haciendo referencia a un anillo que está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno o heteroarileno).

El término "arileno" pretende indicar un anillo o sistema de anillos divalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico, en el que un anillo o sistema de anillos de este tipo tiene entre 3 y 20 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, anillo o sistema de anillos que consta de un resto aromático como se define mediante la regla de $4n+2$ π electrones, incluyendo fenileno.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarileno" se refiere a un anillo o sistema de anillos divalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico, en el que un anillo o sistema de anillos de este tipo tiene entre 3 y 20 átomos, anillo o sistema de anillos que consta de un resto aromático como se define mediante la regla de $4n+2$ π electrones 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 conector está sustituido con una selección del grupo o grupos indicados, con la

condición de que la valencia normal indicada del átomo, o que el átomo apropiado del grupo que está sustituido, no se supere, y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. La expresión "opcionalmente sustituido" pretende indicar que el conector está sin sustituir o sustituido, como se define en el presente documento, con uno o más sustituyentes, como se define en el presente documento. Cuando un sustituyente es un grupo ceto (u oxo, es decir =O), un grupo tio o imino y a continuación dos hidrógenos en el átomo de la estructura principal del conector están sustituidos. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, acilo, aroilo, heteroarilo, carboxilo, alcoxi, ariloxi, aciloxi, aroiloxi, heteroariloxi, alcoxicarbonilo, halógeno, (tio)éster, ciano, fosforilo, amino, imino, (tio)amido, sulfhidrilo, alquiltio, aciltio, sulfonilo, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, nitro, azido, haloalquilo, incluyendo perfluoroalquilo (tal como trifluorometilo), haloalcoxi, alquilsulfanilo, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonoamino, fosforilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, alquilcarboxi, alquilcarboxiamida, oxo, hidroxilo, mercapto, amino (opcionalmente mono- o di-sustituido, por ejemplo con alquilo, arilo, o heteroarilo), imino, carboxamida, carbamoilo (opcionalmente mono- o di-sustituido, por ejemplo con alquilo, arilo, o heteroarilo), amidino, aminosulfonilo, acilamino, aroilamino, (tio)ureído, (ariltio)ureído, alquil(tio)ureído, cicloalquil(tio)ureído, ariloxi, arilcoxi, o $-O(CH_2)_n-OH$, $-O(CH_2)_n-NH_2$, $-O(CH_2)_n-COOH$, $-(CH_2)_n-COOH$, $-C(O)O(CH_2)_nR$, $-(CH_2)_nN(H)C(O)OR$, o $-N(R)S(O)_2R$ en los que n es 1-4 y R se selecciona independientemente entre hidrógeno, -alquilo, -alquenilo, -alquinilo, -cicloalquilo, -cicloalquenilo, -(heterocicloalquilo unido a C-), -(heterocicloalquenilo unido a C-), -arilo, y -heteroarilo, siendo permitidos múltiples grados de sustitución. Las personas con experiencia en la materia entenderán que los sustituyentes, tales como heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, etc., o grupos funcionales tales como -OH, -NHR etc., pueden estar sustituidos por sí mismos, si fuera apropiado. Las personas con experiencia en la materia también entenderán que los restos excluidos por sí mismos también se pueden sustituir cuando sea apropiado.

En realizaciones de la presente invención en particular, el conector L, en particular el conector L como se muestra en la sección [0042] o en la sección [0081], comprende m grupos seleccionados entre el listado de: grupo alquilenilo, alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, heteroalquileno, heteroalquenileno, heteroalquinileno, heterocicloalquileno, arileno, heteroarileno, aralquileno, y un grupo heteroaralquileno, en el que cada grupo opcionalmente puede estar independientemente sustituido, el conector comprende adicionalmente n restos seleccionados independientemente entre uno de los siguientes restos: un disulfuro (-S-S-), un éter (-O-), un tioéter (-S-), una amina (-NH-), un éster (-O-C(=O)- o -C(=O)-O-), una carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un uretano (-NH-C(=O)-O- o -O-C(=O)-NH-), y un resto de urea (-NH-C(=O)-NH-), en los que $m = n + 1$. En realizaciones en particular, m es 2 y n es 1, o m es 3 y n es 2. En realizaciones en particular, el conector comprende 2 o 3 grupos alquilenilo sin sustituir, y 1 o 2, respectivamente, restos disulfuro, éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, uretano o urea que se unen a los grupos alquilenilo sin sustituir.

En realizaciones en particular, el conector L, en particular el conector L como se muestra en la sección [0042], es una cadena lineal de entre 2 y 20 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, en particular entre 2 y 16 átomos, más en particular entre 5 y 14 átomos, e incluso más en particular entre 6 y 12 átomos. En realizaciones en particular, al menos un 60 % de los átomos en la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones en particular, los átomos en la cadena lineal están unidos mediante enlaces sencillos e.

En realizaciones en particular, los átomos de C en la cadena lineal son independientemente parte de grupos metileno opcionalmente sustituido (-CH₂-). En las realizaciones de este tipo en particular, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente entre halógeno y alquilo C₁₋₆, en particular metilo.

En realizaciones en particular, el conector L, en particular el conector L como se muestra en la sección [0042] o en la sección [0081], se selecciona entre el siguiente grupo de conectores:

45 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_3-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_4-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_5-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_6-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_7-$ lado de resto de unión a diana
 50 lado de amatoxina: $-(CH_2)_8-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_9-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_{10}-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_{11}-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_{12}-$ lado de resto de unión a diana
 55 lado de amatoxina: $-(CH_2)_{16}-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_3-S-S-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_3-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_3-S-S-(CH_2)_3-$ lado de resto de unión a diana
 60 lado de amatoxina: $-(CH_2)_4-S-S-(CH_2)_4-$ lado de resto de unión a diana

lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-CMe_2-S-S-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-S-S-CMe_2-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana
 lado de amatoxina: $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ lado de resto de unión a diana

En realizaciones de la presente invención en particular el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo que está presente en una célula tumoral.

En realizaciones de la presente invención en particular el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo de Her-2/neu o molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM).

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

En realizaciones de la presente invención en particular el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se seleccionan entre un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo deshumanizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

En realizaciones de la presente invención en particular el fragmento de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, $F(ab')_2$, Fd, Fv, Fv de una sola cadena, y Fv unidos por enlaces disulfuro (dsFv).

En realizaciones en particular, el anticuerpo es herceptin o HEA125, o un fragmento de anticuerpo que comprende el fragmento de unión a antígeno de herceptin o HEA125.

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

En realizaciones de la presente invención en particular, el conjugado es para uso como un medicamento.

En realizaciones de la presente invención en particular, el conjugado es para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona entre el 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, linfoma maligno.

Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a cualquier mamífero o ave que se pueda beneficiar de un tratamiento con el conjugado de resto de unión a diana y toxinas descritos en el presente documento. Preferentemente, un "paciente" se selecciona entre el 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. Es particularmente preferente que el "paciente" sea un ser humano.

Como se usa en el presente documento, "tratar", "que trata" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno se refiere a conseguir uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o trastornos que se están tratando; (c) inhibir el empeoramiento de síntomas característicos del trastorno o trastornos que se están tratando; (d) limitar o prevenir la reaparición del trastorno o trastornos en pacientes que previamente han tenido el trastorno o trastornos; y (e) limitar o prevenir la reaparición de síntomas en pacientes que previamente eran sintomáticos para el trastorno o trastornos.

Como se usa en el presente documento, el tratamiento puede comprender la administración de un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a un paciente, en el que la "administración" incluye administración *in vivo*, así como administración directamente a tejido *ex vivo*, tal como injertos de venas.

En realizaciones en particular, 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 conseguir la finalidad pretendida. La cantidad eficaz de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la vía de administración, el tamaño y especie del animal que recibe el agente terapéutico, y la finalidad

de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual la puede determinar de forma empírica un experto en la materia de acuerdo con métodos establecidos en la técnica.

5 En un segundo aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la presente invención, que comprende adicionalmente uno o más diluyentes, vehículos, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un estado gubernamental o enumerado en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más en particular en seres humanos.

10 En realizaciones en particular, la composición farmacéutica se usa en forma de un medicamento administrado por vía sistémica. Esto incluye agentes parenterales, que comprenden, entre otros, agentes inyectables e infusiones. Los agentes inyectables se formulan en forma de ampollas o como los denominados agentes 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 agentes inyectables se puede realizar 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 en forma de una suspensión de cristales, soluciones, nanopartículas o sistemas dispersos coloidales tales como, por ejemplo hidrosoles.

20 Las formulaciones inyectables se pueden producir adicionalmente en forma de concentrados, que se pueden disolver o dispersar con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también se puede preparar en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposómicas y microemulsiones. Al igual que los agentes inyectables, también se pueden preparar formulaciones de infusión en forma de concentrados para su dilución. Las formulaciones inyectables también se pueden aplicar en forma de inclusiones permanentes tanto en terapia en el paciente como en terapia ambulatoria, por ejemplo por medio de mini-bombas.

25 Es posible añadir a formulaciones de fármaco parenteral, por ejemplo, albúmina, plasma, agente de expansión, sustancias de superficie activa, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias formadoras de complejos o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción del conjugado de resto de unión a diana y toxinas de la invención a proteínas copolímeros o también se pueden añadir con el objeto de reducir la adsorción del conjugado de resto de unión a diana y toxinas de la invención a materiales tales como instrumentos de inyección o materiales de envasado, por ejemplo, plástico o vidrio.

30 Los conjugados de resto de unión a diana y toxina de la invención se pueden unir a microvehículos o nanopartículas en compuestos precursores tales como, por ejemplo, a partículas finamente dispersas basadas en poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéter uretanos. Las formulaciones parenterales También se puede modificar como preparaciones de depósito, por ejemplo basándose en el "principio de múltiples unidades", si los conjugados de resto de unión a diana y toxina de la invención se introducen en forma finamente dispersa, dispersa y suspendida, respectivamente, o como una suspensión de cristales en el medicamento o basándose en el "principio de una sola unidad" si el conjugado de resto de unión a diana y toxina de la invención está introducido en una formulación, por ejemplo en un comprimido o una varilla que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de una sola unidad o de múltiples unidades a menudo consisten en los denominados polímeros biodegradables tales como por ejemplo poliésteres de ácido láctico y ácido glicólico, poliéter uretanos, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

45 Los adyuvantes y vehículos añadidos durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas como agentes parenterales son preferentemente *aqua sterilisata* (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor del pH tales como, por ejemplo ácidos orgánicos o inorgánicos o bases así como sales de los mismos, sustancias de taponamiento para ajustar los valores del pH, sustancias para isotonización tales como por ejemplo cloruro sódico, hidrogenocarbonato sódico, glucosa y fructosa, agentes tensioactivos y de superficie activa, respectivamente, y emulsionantes tales como, por ejemplo ésteres parciales de ácidos grasos de polioxietileno y sorbitán (por ejemplo, Tween®) o, por ejemplo ésteres de ácido graso de polioxietilenos (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos tales como, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como, por ejemplo oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®) así como adyuvantes poliméricos tales como, por ejemplo gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos tales como, por ejemplo propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos tales como, por ejemplo citrato y urea, conservantes tales como, por ejemplo éster de hidroxipropil y éster de metilo del ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes tales como por ejemplo sulfito sódico y estabilizantes tales como por ejemplo EDTA.

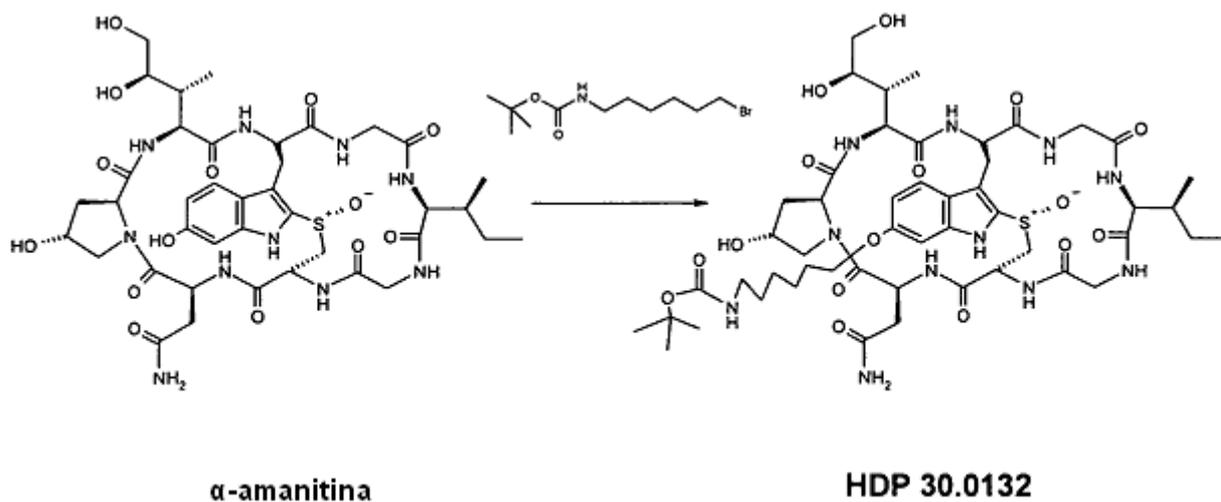
55 Cuando las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan como suspensiones en una realización preferente se añaden agentes espesantes para evitar la sedimentación de los conjugados de resto de

- unión a diana y toxina de la invención o, agentes tensioactivos y polielectrolitos para asegurar la nueva capacidad de suspensión de sedimentos y/o agentes formadores de complejos tales como, por ejemplo, EDTA. También es posible conseguir complejos del principio activo con diversos polímeros. Los ejemplos de los polímeros de este tipo son polietilenglicol, poliestireno, carboximetil celulosa, Pluronic[®] o éster de ácido graso de polietilenglicol y sorbitán.
- 5 Los conjugados de resto de unión a diana y toxina de la invención también se pueden incorporar en formulaciones líquidas en forma de compuestos de inclusión por ejemplo con ciclodextrinas. En realizaciones en particular los agentes de dispersión se pueden añadir como adyuvantes adicionales. Para la producción de liofilizados se pueden añadir agentes formadores de armazón tales como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, PVP o Variedades de gelatina.
- 10 En un aspecto más la presente invención se refiere a un método para tratar 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 con necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un conjugado o composición farmacéutica de la presente invención.
- 15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de conjugación a amatoxina como un compuesto intermedio para la síntesis de los conjugados de la presente invención, en el que la molécula de conjugación a amatoxina comprende un conector L conectado a una amatoxina por medio de
- (i) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;
- (ii) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
- 20 (iii) el átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina;
- en cada caso en el que el conector L comprende un derivado del ácido carbámico -NH-C(O)-X, en el que X es un grupo saliente que se puede sustituir con una amina primaria de un resto de unión a diana.
- 25 En una realización, la molécula de conjugación a amatoxina tiene una estructura seleccionada entre una de las siguientes estructuras:
- (i) amatoxina- γ C(O)-NH-L-NH-C(O)-X;
- (ii) amatoxina- δ C-O-C(O)-L-NH-C(O)-X;
- (iii) amatoxina- δ C-O-L-NH-C(O)-X;
- 30 (iv) amatoxina- δ C-O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-X; y
- (v) amatoxina- $6'$ C-O-L-NH-C(O)-X.
- En ciertas realizaciones, la amatoxina se selecciona entre α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico, o entre sales o análogos de los mismos.
- En ciertas realizaciones, el conector L es un grupo alquileno, heteroalquileno, alquenileno, heteroalquenileno, alquilileno, heteroalquilileno, cicloalquileno, heterocicloalquileno, arileno, heteroarileno, aralquileno, o un grupo heteroaralquileno, opcionalmente sustituido.
- En ciertas realizaciones, el conector L comprende un resto seleccionado entre uno de los siguientes restos: un resto disulfuro, un éter, una amina, un éster, una carboxamida, un uretano, y una urea.
- En ciertas realizaciones, el grupo funcional X se selecciona entre: -^tbutiloxi, -succinimidiloxi, -1-O-succinimidiloxi-3-sulfonato (-Sulfo-NHS), -O-(4-nitrofeniloxi), -O-(3-nitrofeniloxi), -O-(2,4-dinitrofeniloxi), -O-(2,4-dicloro-6-nitrofeniloxi), -pentafluorofeniloxi, -pentaclorofeniloxi, -O-(2,4,5-triclorofeniloxi), -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-ftalimidiloxi, -1-benzotriazoliloxi, -1-(7-aza-benzotriazolil)oxi.), y -N-imidazolilo.
- En otro aspecto más, 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 a amatoxina de la presente invención con un resto de unión a diana que comprende un grupo amino primario.
- 45

Ejemplos

En lo sucesivo, la invención se explica con más detalle con los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Síntesis de Conjugado de Anticuerpo de α -Amanitina y Herceptin Her-DSC-30.01341.1 Síntesis de 6'-NH-boc-(6-aminohexil)- α -amanitina HDP 30.0132

- 5 En una atmósfera de argón y a temperatura ambiente 30,00 mg (32,6 μ moles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 900 μ l de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se añadieron 3,66 mg (32,6 μ moles) de terc-butilato de potasio y 73,18 mg (261,2 μ moles, 8 equiv.) de bromuro de NH-Boc-aminohexilo (Fluka 89171). Después de 6 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se acidificó a pH = 5 con 50 μ l de una solución de ácido acético 0,33 M en DMSO. Los compuestos volátiles se evaporaron en vacío y el residuo se disolvió en 1000 μ l de metanol y se diluyó con 20 ml de éter dietílico. El precipitado se recogió y se absorbió en 1000 μ l de metanol. Esta solución se diluyó con 1000 μ l de agua y se usó para la purificación en una LaPrep-HPLC:

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

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

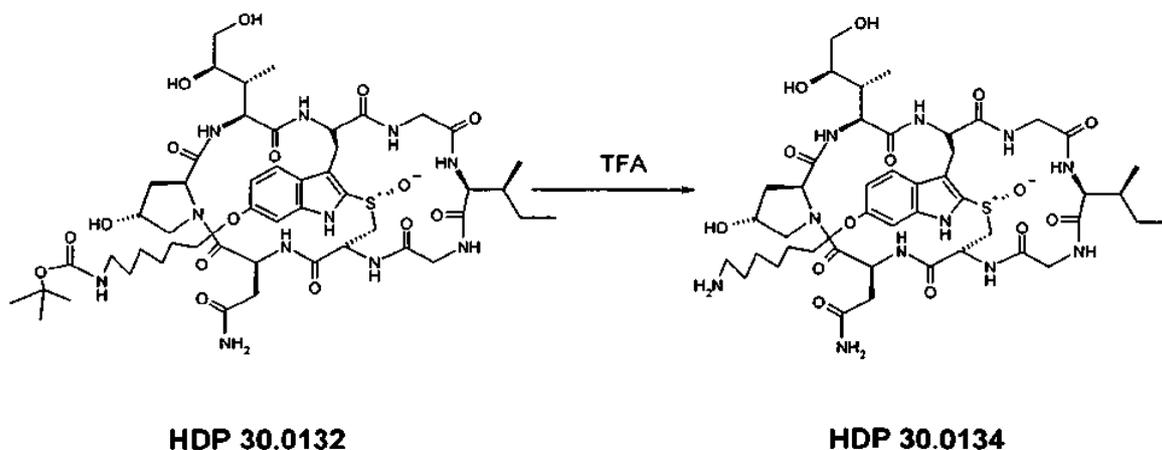
- 15 Disolvente B: 10 % agua: metanol al 90 %: ácido trifluoroacético al 0,05 %

gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-40 min para A al 0 %

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

15,9 mg (rendimiento de un 43 %) de un polvo. MS: 1119 (M+H⁺); 1141 (M+Na⁺)

1.2 Síntesis de 6'-(-6-aminohexil)- α -amanitina HDP 30.0134



5 9,90 mg (8,85 μ moles) de 6'-NH-boc-6-aminohexil- α -amanitina HDP 30,0132 se disolvieron en 250 μ l de ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de 2 min El ácido se retiró en vacío a 20 °C y el residuo se secó. El éter de amanitina en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:

(columna: Kromasil 100-C18, d = 10 mm, 10 μ m, con metanol/agua (TFA al 0,05 %), flujo: 6 ml/min, detección en λ = 295 nm).

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

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

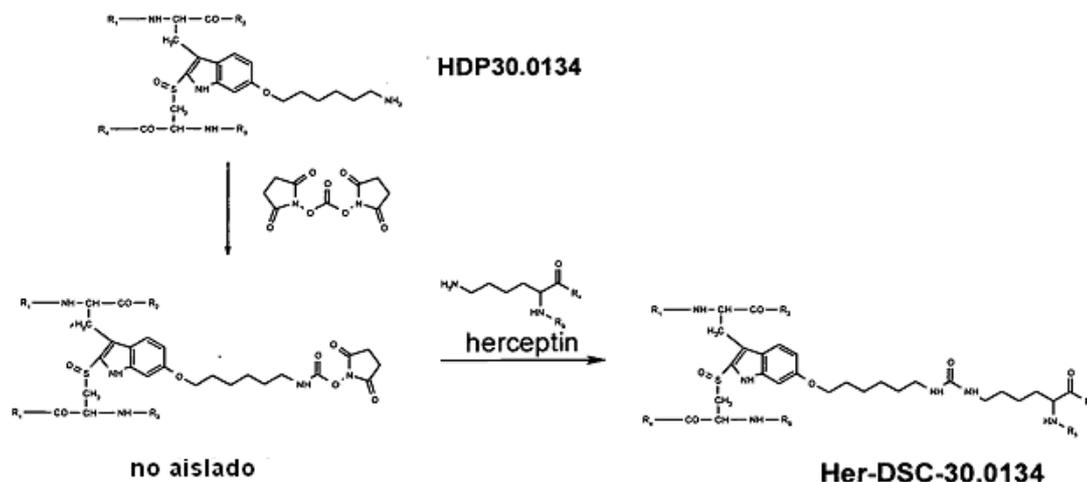
10 Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-25 min para A al 50 %; 25-30 min para A al 0 %; 30-35 min para A al 0 % ; 35-40 min para A al 100 %, 40-45 min para A al 100 %

Las fracciones con el mismo tiempo de retención (14,5 min) se recogieron y los disolventes se evaporaron.

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

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

Esquema 1



En el Esquema 1 (y otros esquemas mostrados en los ejemplos), herceptin se representa mediante una fórmula esquemática que muestra una cadena lateral de lisina con R3 y R4 representando la parte restante de la proteína de anticuerpo de herceptin.

1.3.1 Síntesis del conjugado Her-DSC-30.0134 de 6'-(-6-aminohexil-6-hidroxisuccinimidil)- α -amanitina-Herceptin con diferentes cargas útiles de toxina (Tabla 2)

5,00 mg de 6'-(-6-aminohexil)- α -amanitina HDP 30.0134 se disolvieron en 538 μ l de dimetilformamida seca (DMF). En una atmósfera de argón y agitando a temperatura ambiente se añadieron 18,6 μ l de una solución de dihidroxisuccinimido carbonato (DSC) en DMF (2,56 mg en 100 μ l de DMF) y 10,0 μ l de trietilamina de una vez. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 12 h, se añadieron 60 ml de éter dietílico frío. El precipitado de carbonato de α -amanitina-6'-(-6-aminohexil-6-hidroxisuccinimidilo) se recogió y se lavó varias veces con éter dietílico y se secó en vacío. El sólido restante se recogió en 750 μ l de DMF = solución A.

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

Tabla 2

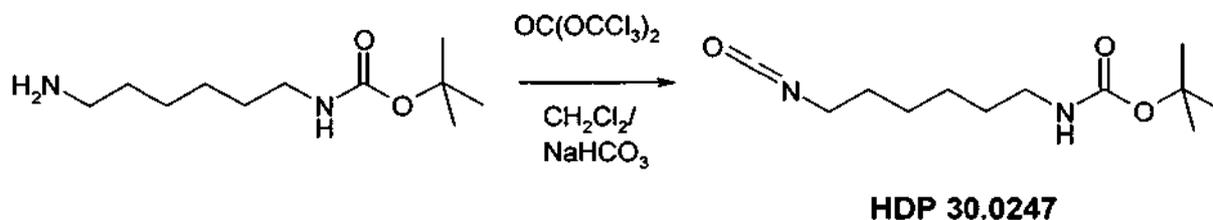
| 3 muestras de la solución de Herceptin se tratan con diferentes cantidades de las soluciones de carbonato de α -amanitin-6'-(-6-aminohexil-6-hidroxisuccinimidilo): | | | |
|--|------------|---|-----------------------|
| Solución A | Solución B | Carga de Herceptin: conector de amanitina | Nombre de la muestra |
| 152 ml | 11,0 ml | 1 : 1,3 | Her-DSC-30.0134 [1.3] |
| 242 ml | 5,0 ml | 1 : 4,3 | Her-DSC-30.0134 [4.3] |
| 290 ml | 3,0 ml | 1 : 7,5 | Her-DSC-30.0134 [7.5] |

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

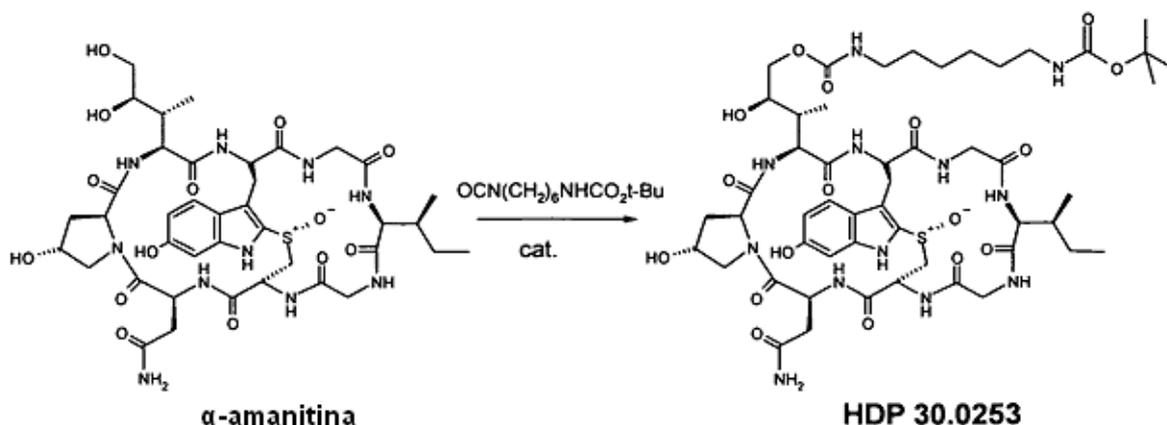
Ejemplo 2

Síntesis del Conjugado Her-DSC-30.0256 de α -Amanitina y Herceptin

2.1 Preparación de 1-Isocianato-6-BocNH-aminohexano HDP 30.0247



2,50 g (11,56 mmoles) de NH-Boc-1,6-hexametilendiamina (Aldrich 79229) se disolvieron en 35 ml de diclorometano. Se añadieron 35 ml de una solución saturada de NaHCO_3 en agua. Después de la adición de 1,143 g (3,85 mmoles) de carbonato de bis-(trichlorometilo (trifosgeno) la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 0 °C durante 30 min. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo tres veces con 15 ml de diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se evaporaron. El residuo oleoso se fraccionó a 150 °C y 59 Pa en un horno Kugelrohr. 2,23 g (80 %) de un aceite transparente MS: 242 (M+).

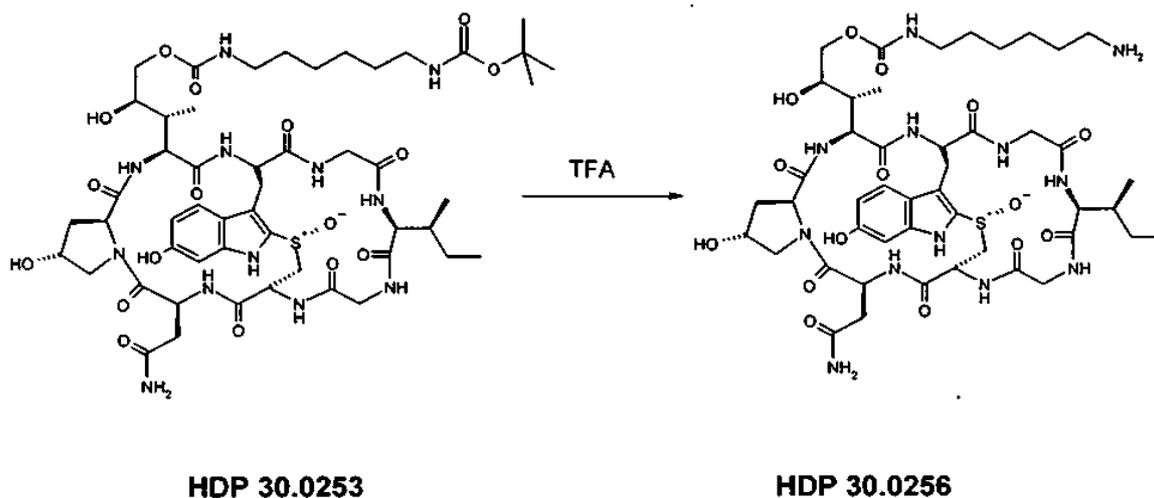
2.2 Síntesis de δ -O-(NH-boc-6-aminohexilcarbamoil)- α -amanitina HDP 30.0253

cat.: dilaurilestannato de dibutilo $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[\text{OCO}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]_2$

5 En una atmósfera de argón se disolvieron 13,43 mg (14,6 μmoles) de α -amanitina secada al vacío en 1000 μl de dimetil formamida seca (DMF). Se añadieron 7,08 mg (29,2 μmoles) de NH-Boc-6-isocianato aminohexano y 18,46 mg (29,2 μmoles) de dilaurilestannato de di-butilo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 23 h se añadieron 13,43 mg (14,6 μmoles) de NH-Boc-6-isocianato aminohexano adicionales. Después de 52 h la mezcla de reacción se hidrolizó con 200 μl de metanol y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en 1200 μl de DMSO y se purificó en una columna de LaPrep-HPLC: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 mm x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0,05 %), flujo: 26 ml/min, detección a $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %.

10 Disolvente B: agua al 5 %: metanol al 95 %. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A al 0 %; 25-27 min para A al 100 %; 27-35 min para A al 100 %. Las fracciones con el mismo tiempo de retención se recogieron y los disolventes se evaporaron.

9,06 mg (rendimiento de un 53 %) de un sólido de color blanco. MS: 1161 ($\text{M}+\text{H}^+$); 1183 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

15 2.3 Síntesis de δ -O-(6-aminohexilcarbamoil)- α -amanitina HDP 30.0256

9,06 mg (7,8 μmoles) de HDP 30.0253 se disolvieron en 250 μl de ácido trifluoroacético y se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se co-evaporó 2 veces con 1,5 ml de acetonitrilo. El sólido se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

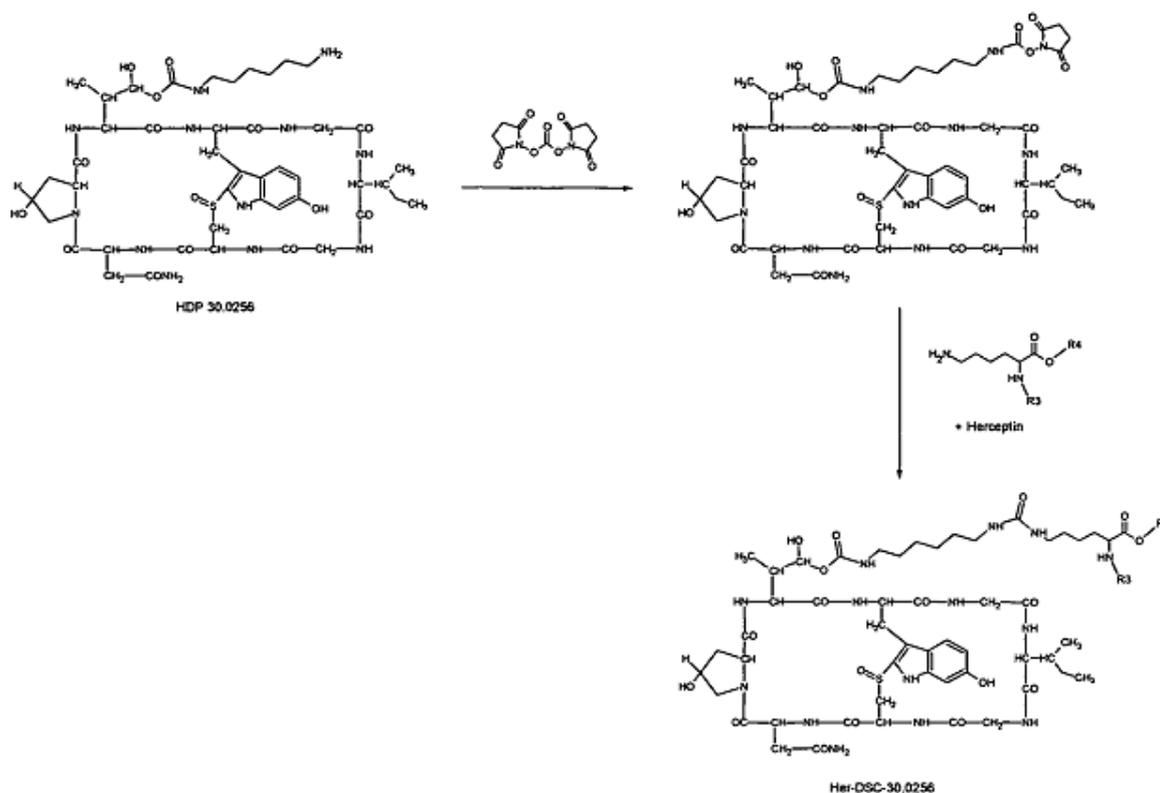
para A al 100 %.

Las fracciones con es tiempo de retención entre 12-17 min se recogieron y se evaporaron hasta un sólido de color blanco.

8,75 mg (rendimiento de un 95 %). MS: (1061 M+H⁺); 1083 (M+Na⁺).

5 2.4 Síntesis del derivado Her-DSC-30.0256 del anticuerpo HDP 30.0256

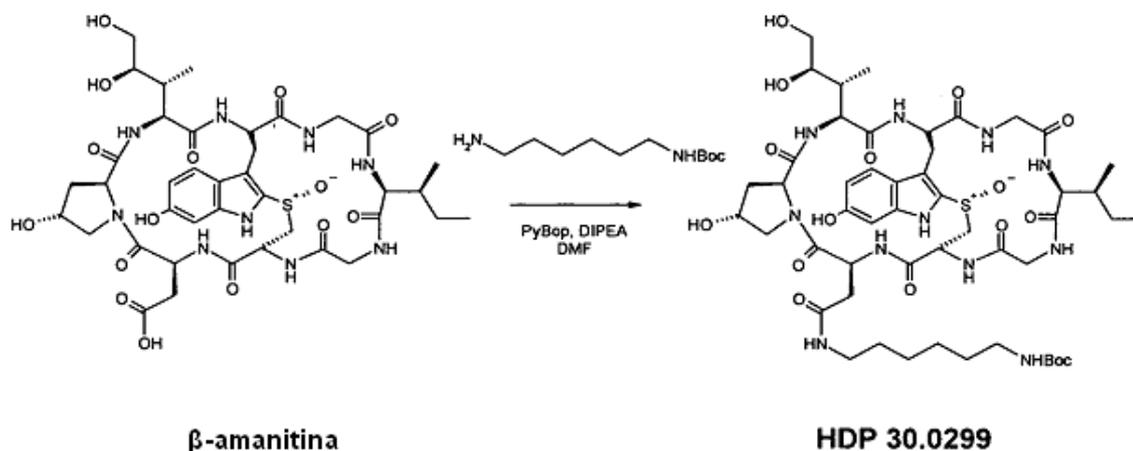
Esquema 2



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

1,00 mg de HDP 30,0256 se disolvió en 108 μ l de dimetilformamida seca (DMF). En una atmósfera de argón y agitando a temperatura ambiente se añadieron 10,0 μ l de una solución de dihidroxisuccinimido carbonato (DSC) en DMF (2,56 mg en 100 μ l de DMF) y 2,0 μ l de trietilamina se añadieron de una vez. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de un período de incubación durante una noche, se añadieron 30 ml de éter dietílico frío. El precipitado se recogió y se lavó varias veces con éter dietílico y se secó en vacío. El sólido restante se recogió en 143 μ l de DMF = solución A. 12,0 mg de Herceptin se disolvieron en 6,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) = solución B. La solución A y la solución B se combinaron. La solución de Herceptin y conector de amanitina se agitó a 4 °C durante 14 h y se separó mediante cromatografía de filtración en gel en columna Sephadex G-25 (columna XK-16; 2 ml/min). La columna G-25 se lavó previamente 500 ml de solución de PBS, pH = 7,4. La fracción del conjugado de Her-DSC-30.0256 se detectó mediante absorción de UV. La concentración de proteína se determinó mediante el Ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). La carga de amanitina de Herceptin se determinó mediante determinación de la absorción UV a $\lambda = 280$ nm y $\lambda = 310$ nm. Se calculó una carga de toxina de 3,3 moléculas de amanitina para cada molécula de Herceptin.

Ejemplo 3

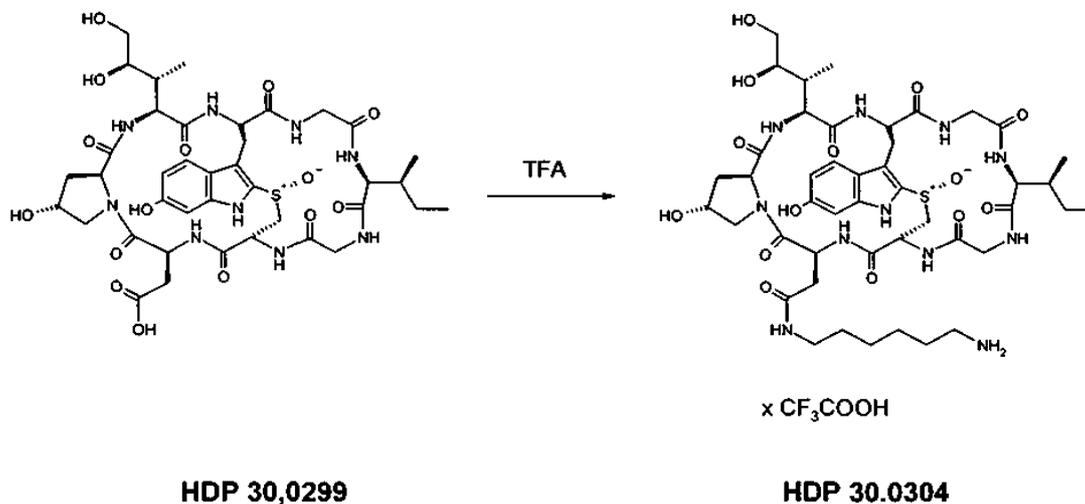
Síntesis del Conjugado de Anticuerpo de β -Amanitin y Herceptin Her-DSC-30.03043.1 Amida de BocNH-hexametilendiamino- β -amanitina HDP 30.0299

- 5 En una atmósfera de argón 4,65 mg (5,05 μ moles) de β -amanitina seca al vacío se disolvieron en 1000 μ l de dimetilformamida seca (DMF). 100 μ l de una solución 0,15 M de BocNH-hexametilendiamina en DMF y 100 μ l de una solución 0,15 M de diisopropiletilamina (DIPEA) en DMF se añadieron a temperatura ambiente. Después de la adición final de 100 μ l de una solución 0,30 M de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) en DMF, la mezcla de reacción se agitó durante 20 h y se hidrolizó con 100 μ l de agua. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad en vacío y el residuo se disolvió en 1000 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). La purificación se realizó en una LaPrep-HPLC:

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

Las fracciones con el mismo tiempo de retención se recogieron y los disolventes se evaporaron.

4,45 mg (rendimiento de un 80 %) de un sólido de color blanco. MS: 1119 M+H⁺; 1141 M+Na⁺.

3.2 Amida de 6'-hexametildiamino- β -amanitina HDP 30.0304

4,14 mg (3,70 μ moles) de amida de BocNH-hexametilendiamino- β -amanitina HDP 30.0299 se disolvieron en 500 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 2 min. El exceso de TFA se evaporó al vacío y el residuo se co-evaporó con 2 porciones de 1000 μ l de acetonitrilo. El sólido restante se purificó en una LaPrep-HPLC:

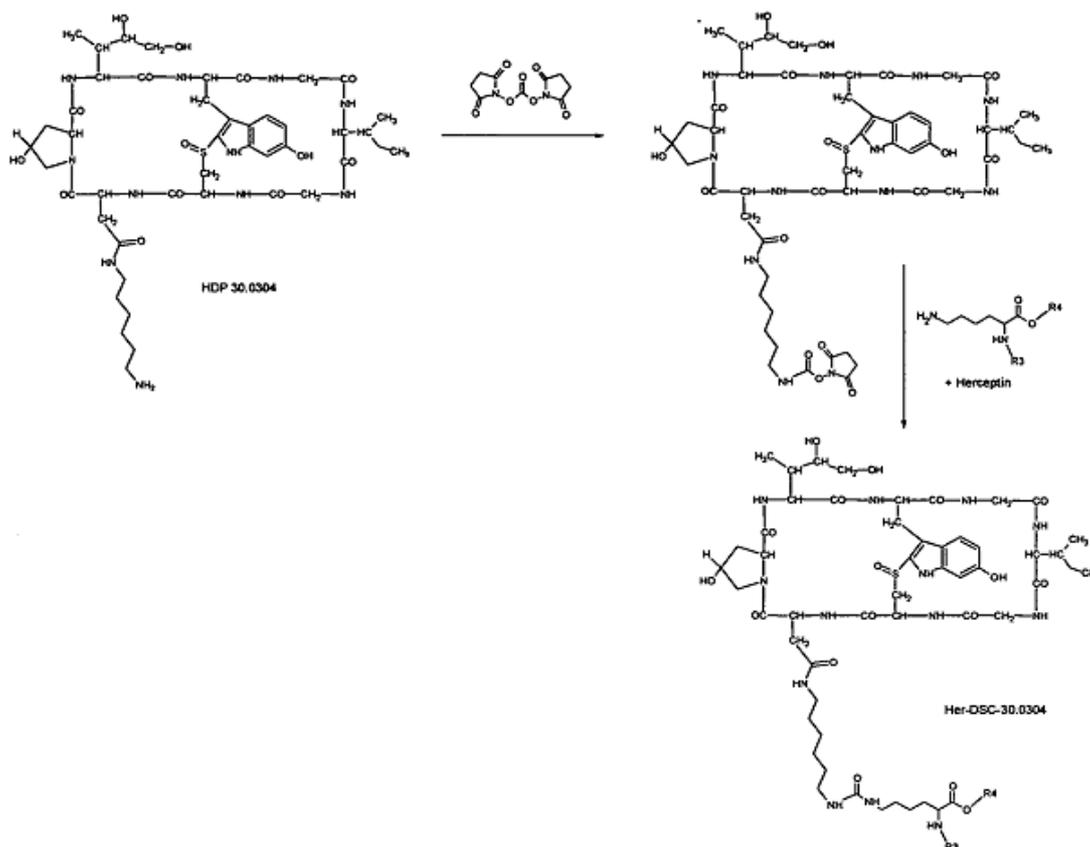
5 columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 mm x 20 mm, con metanol/agua (TFA al 0,05 %), flujo: 26 ml/min, detección a $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %. Disolvente B: agua al 5 %: metanol al 95 %. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A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

10 Las fracciones con el mismo tiempo de retención entre 13,43-14,02 min se recogieron y los disolventes se evaporaron. El residuo se recogió en 2000 μ l de agua y la solución se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó durante una noche.

4,00 mg (rendimiento de un 95 %) de una espuma de color blanco. MS: 1018 (M+H⁺); 1041 (M+Na⁺).

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

Esquema 3



3.3.1 Síntesis del conjugado del anticuerpo HDP-30.0304 Herceptin Her-DSC-30.0304 [4.7]

15 1,33 mg de HDP 30.0304 se disolvieron en 144 μ l de dimetilformamida seca (DMF). En una atmósfera de argón y agitando a temperatura ambiente se añadieron 13,4 μ l de una solución de dihidroxisuccinimido carbonato (DSC) en DMF (2,56 mg en 100 μ l de DMF) y 2,6 μ l trietilamina de una vez. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 12 h, se añadieron 30 ml de éter dietílico frío. El precipitado se recogió y se lavó varias veces con éter dietílico y se secó en vacío. El sólido restante se recogió en 200 μ l de DMF = solución A. 12,0 mg de

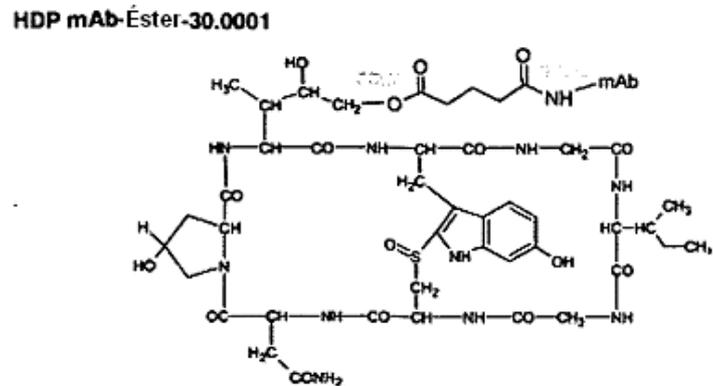
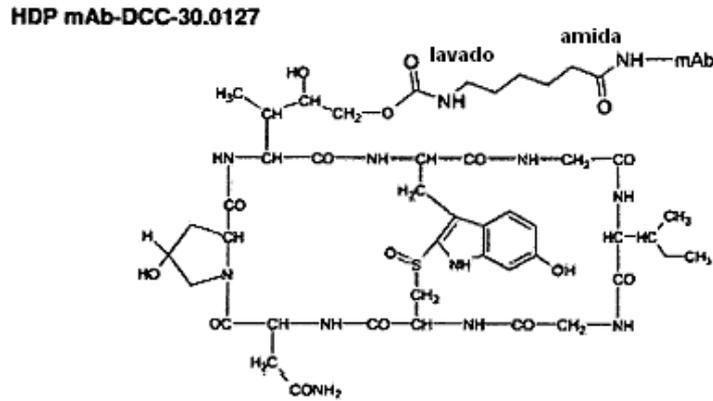
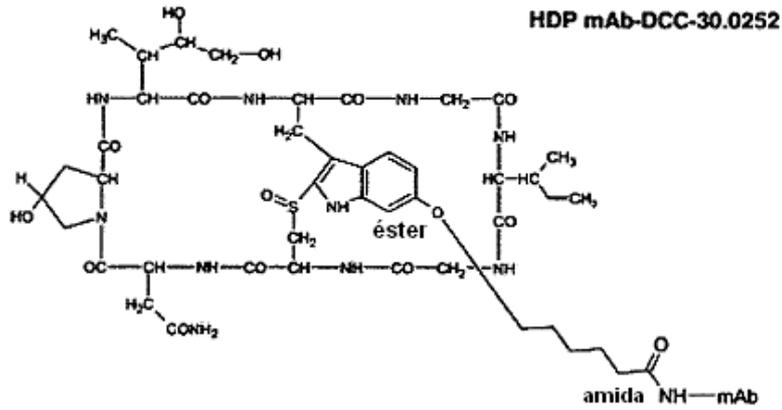
20 Herceptin se disolvieron en 4,0 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,4) = solución B. La solución A y la solución B se combinaron. La solución de Herceptin y conector de amanitina se agitó a 4 $^{\circ}$ C durante 14 h y se separó mediante cromatografía de filtración en gel en columna Sephadex G-25 (XK-16 columna; 2 ml/min).

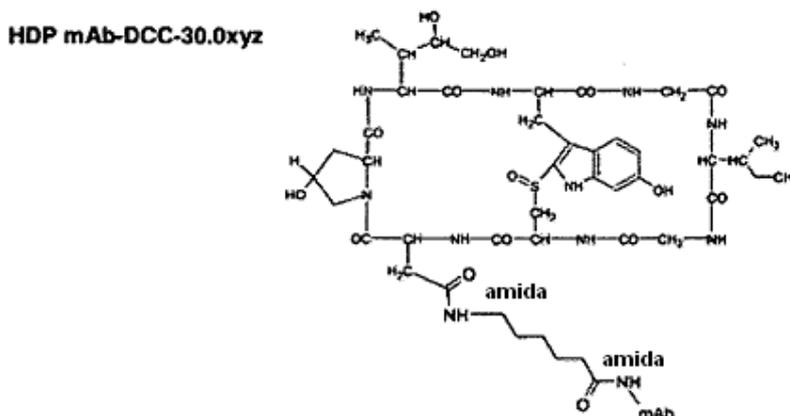
La columna G-25 se lavó previamente con 500 ml de soluciones de PBS, pH = 7,4. La fracción del conjugado de Her-DSC-30.0304 se detectó mediante absorción de UV. La concentración de proteína se determinó mediante el Ensayo RotiQuant (Carl Roth; Alemania). La carga de amanitina de Herceptin se determinó mediante la determinación de la absorción de 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 Herceptin.

5

Ejemplo Comparativo 4

Otras estructuras de conjugados de Amanitina-Herceptin





Ejemplo 5

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

- 5 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 se evaluó 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 negativas para HER2, MDA-MB231 (mama) y un ensayo de incorporación de BrdU quimioluminiscente (Roche Diagnostics) *in vitro*. La viabilidad celular se determinó después de 72 h a 96 h de incubación con diferentes concentraciones de conjugados de Herceptin-Amanitina a 37 °C y CO₂ al 5 % por medición de células fijadas y permeabilizadas con un anticuerpo anti-BrdU-HRP en un lector de microplacas Optima de BMG Labtech. Los valores de la CE₅₀ de curvas de dosis-respuesta se calcularon mediante el software Graphpad Prism 4.0 (véanse las Figuras 2 - 5).

Estabilidad de conjugados de Herceptin-Amanitina en plasma *in vitro*

5.1 Liberación de amanitina después de incubación en plasma

- 15 Los conjugados de Herceptin-Amanitina 35 µM se incubaron hasta 14 días en plasma de ratón en un baño de agua a 37 °C. Las muestras se recogieron en diferentes momentos y se analizaron para compuestos liberados de amanitina de molécula pequeña mediante un método de ELISA. Por lo tanto, la amanitina liberada y metabolitos de amanitina se extrajeron en diferentes momentos con EtOH al 80 %. Las soluciones se aclararon mediante centrifugación a 10.000 g durante 5 min y los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C. Una placa de micropocillos Lumitrac (Greiner) de color blanco se revistió con antisuero anti-amanitina de conejo durante una noche a 4 °C. La placa se bloqueó con BSA al 3 % en PBS durante 1 h a 37 °C y se lavó tres veces con Tween al 0,05 %/PBS. Las muestras de amanitina y soluciones de amanitina con concentraciones definidas se mezclaron con biotilil-amanitina 1 nM en BSA al 1 %/PBS y se incubaron en pocillos revestidos durante 1 h a 37 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con Tween al 0,05 %/PBS. La solución de reserva de estreptavidina-HRP (Sigma-Aldrich) (1 mg/ml en PBS) se diluyó a 1 : 1000 en BSA al 3 %/PBS y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Después de incubación durante 1 h a 37 °C, los pocillos se lavaron tres veces con Tween al 0,05 %/PBS. Se añadieron 50 µl de una solución de luminol (Applichem) a cada pocillo y la señal de luminiscencia se midió con un lector Optima de BMG Labtech. Las cantidades de compuestos de amanitina liberados se calcularon mediante regresión lineal (véanse las Figuras 6 - 7).

5.2 Actividad citotóxica después de incubación en plasma

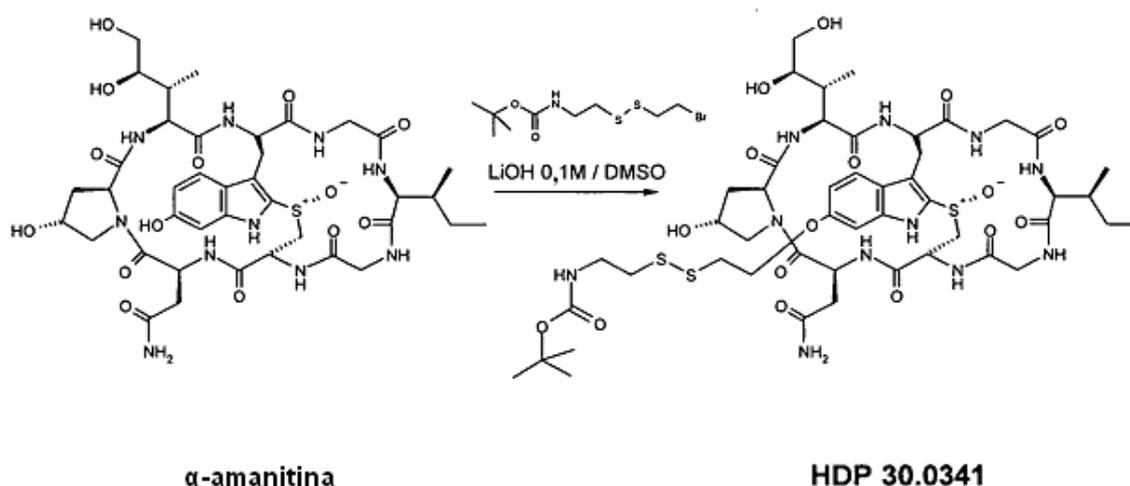
- 30 Los conjugados de Herceptin-Amanitina se incubaron hasta 11 días en plasma humano en un baño de agua a 37 °C. Las muestras se recogieron en diferentes momentos y se analizaron para la potencia citotóxica restante en células SKOV-3 positivas para HER2 mediante un ensayo de incorporación de BrdU quimioluminiscente (Roche Diagnostics) *in vitro*. La viabilidad celular se determinó después de un periodo de incubación de 72 h con diferentes concentraciones de conjugados de Herceptin-Amanitina a 37 °C y CO₂ al 5 % por medición de células fijadas y permeabilizadas con un anticuerpo anti-BrdU-HRP en un lector de microplacas Optima de BMG Labtech. Los valores de la CE₅₀ de curvas de dosis-respuesta se calcularon mediante el software Graphpad Prism 4.0 (véase la Figura 8).

Actividad antitumoral conjugados de Herceptin-Amanitina en modelos de xenoinjerto de ratón con células cancerosas positivas para HER2

- 5 Se adquirieron ratones atímicos BALB/c nu/nu hembra intactos de seis semanas de edad (Janvier) y se dividieron de forma aleatoria en tres grupos de ocho ratones cada uno. Se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células SKOV-3 por vía s.c. en el costado de cada ratón. Los conjugados de Herceptin-Amanitina se inyectaron una vez por vía i.v. a una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al día, 19 días después de la inoculación de tumor, mientras que al grupo de control negativo se le inyectó el vehículo (tampón de NaCl). Se registraron parámetros tales como supervivencia, peso y tamaño del tumor (Véase la 9).

Ejemplo 6

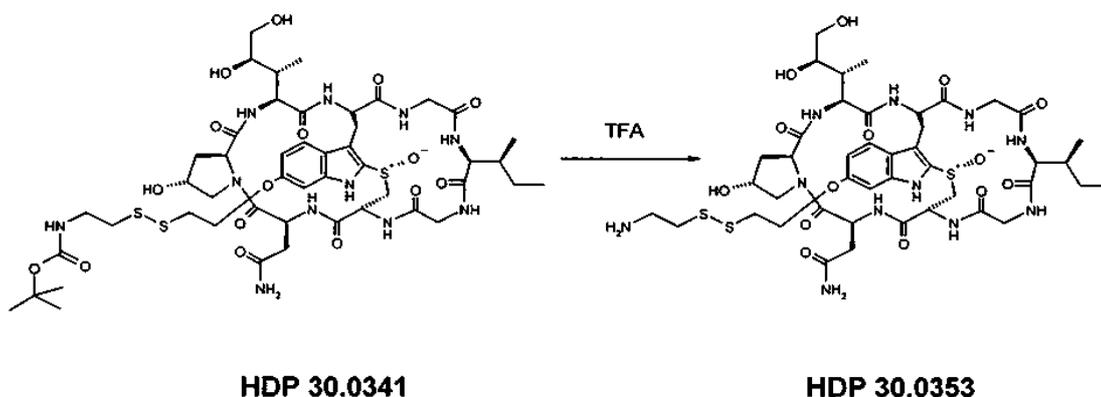
- 10 **Preparación de compuestos de conector de α -amanitina adicionales, HDP 30.0353, HDP 30.0354, HDP 30.0355, HDP 30.0409, HDP 30.0410, HDP 30.0411 y HDP 30.0412**

6.1 Conector de amanitina HDP 30.0353**6.1.1 Síntesis de 6'O-(NH-boc-6-amino-3,4-ditia-hexil)- α -amanitina HDP 30.0341**

- 15 6,78 mg (7,38 μmoles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 500 μl de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadieron 18,67 mg (59,02 μmoles , 8 equiv.) de bromuro de NH-boc-amino-3,4-ditia-hexilo y 73,8 μl (7,38 μmoles , 1 equiv.) de LiOH (0,1 M) en agua / DMSO (1:1) en atmósfera de argón. Después de 1 h, 3,5 h, 4,5 h, 6,5 h y 8 h se añadieron equivalentes adicionales de la solución de LiOH 0,1 M. La mezcla de reacción en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:
- 20 columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05 %), flujo: 6,5 ml/min, detección en $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %. Disolvente B: 10 % agua: metanol al 90 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A al 0 %; 25-27 min para A al 100 %; 27-35 min para A al 100 %.

La fracción con un tiempo de retención de 20,8-21,4 min se recogió y los disolventes se evaporaron en vacío.

- 25 1,29 mg (rendimiento de un 15 %) de un sólido de color blanco. MS: 1154 M+H⁺

6.1.2 Síntesis de 6'-O-(-6-amino-3,4-ditia-hexil)- α -amanitina HDP 30.0353

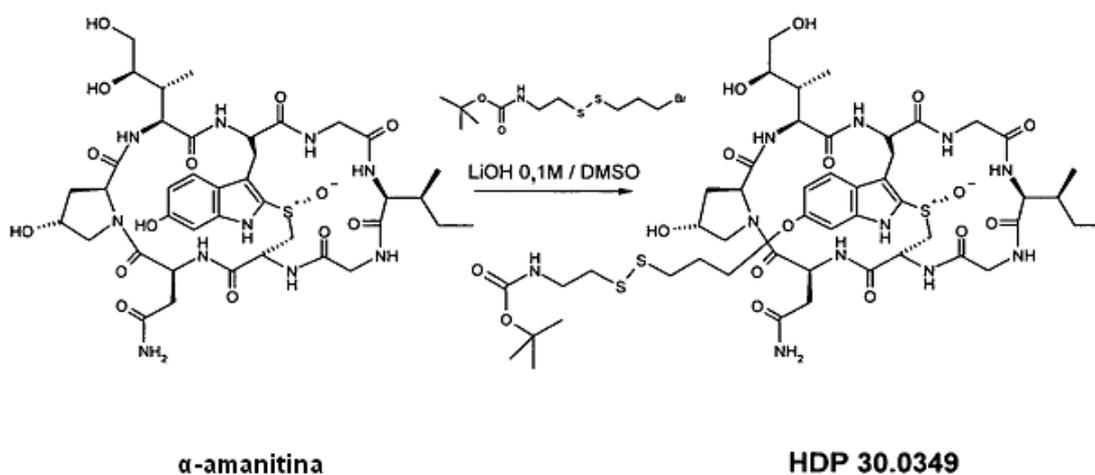
1,29 mg (1,12 μ moles) de 6'-O-(-6-amino-3,4-ditia-hexil)- α -amanitina HDP 30.0341 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente. Después de 1 min el ácido trifluoroacético se diluyó con 1000 μ l de tolueno y se evaporó a sequedad. La temperatura no debería superar 20 $^{\circ}$ C. Este proceso se repitió con 1000 μ l de tolueno y 1000 μ l de acetonitrilo (2 x). El éter de α -amanitina en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

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

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

6.2 Conector de amanitina HDP 30.0354

6.2.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptil)- α -amanitina HDP 30.0349

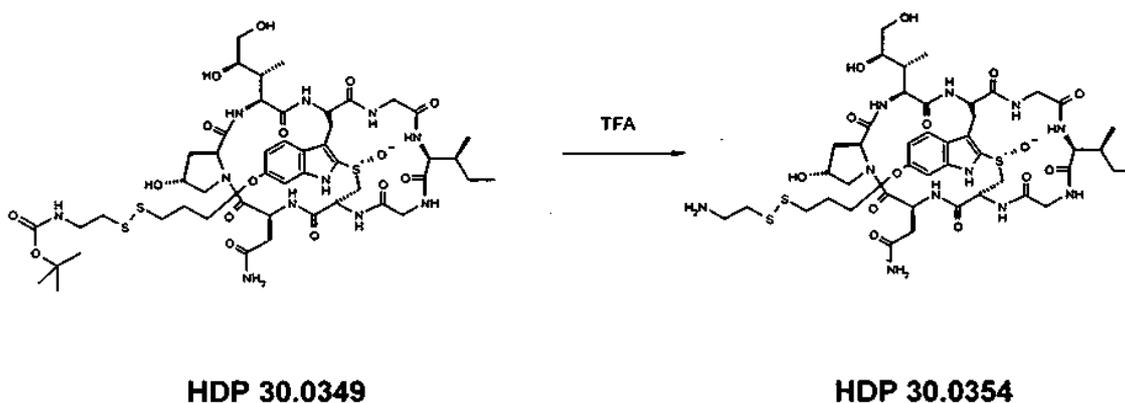
5,67 mg (6,17 μ moles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 250 μ l de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se añadieron 19,00 mg (58,00 μ moles, 9,3 equiv.) de bromuro de NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0345 a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. 61,7 μ l (6,10 μ moles, 1 equiv.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1) se añadieron a once. La mezcla de reacción se agitó durante 3,5 h y se añadieron 10 μ l (13,00 mg; 39,7 μ moles; 6,3 equiv.) de bromuro de NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0345 y 61,7 μ l de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1) adicionales. Después de 8 h la mezcla de reacción en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

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

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

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



- 10 4,83 mg (4,13 μ moles) de 6'O-(NH-boc-7-amino-4,5-ditia-heptil)- α -amanitina HDP 30.0349 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min en atmósfera de argón y se evaporó a sequedad a temperatura ambiente. El residuo se co-evaporó con 1000 μ l de tolueno y 1000 μ l de acetonitrilo. El sólido restante se purificó en una LaPrep-HPLC:

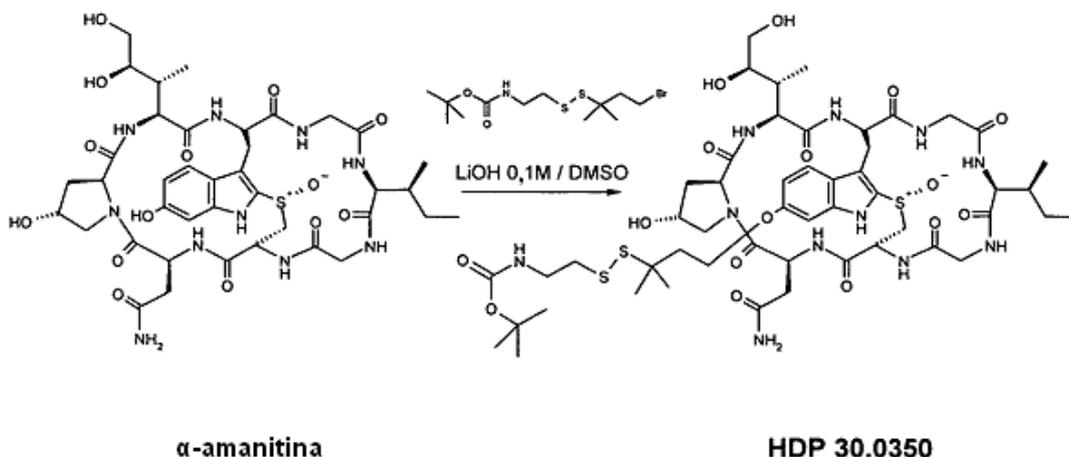
- 15 columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05 %), flujo: 6,5 ml/min, detección en $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %. Disolvente B: 10 % agua: metanol al 90 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %. Gradiente: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

La fracción con un tiempo de retención de 17,1-17,5 min se recogió y se evaporó. El residuo se liofilizó in agua.

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

- 20 **6.3 Conector de amanitina HDP 30.0355**

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



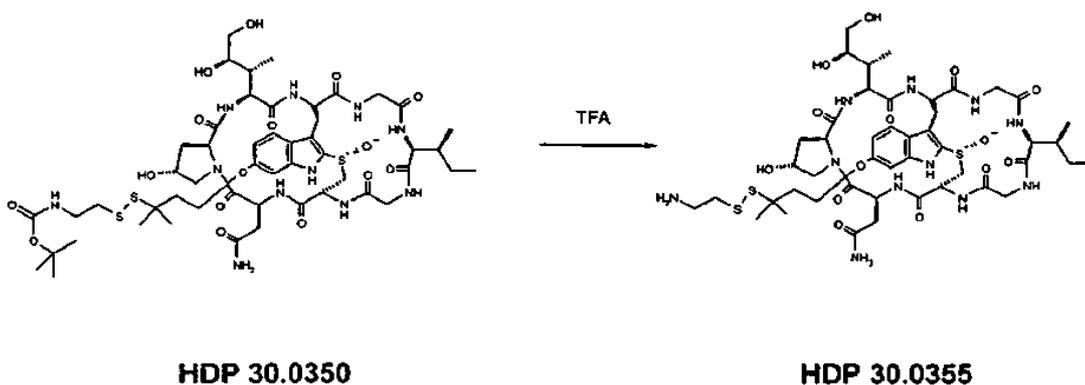
5,67 mg (6,17 μ moles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 250 μ l de dimetilsulfóxido seco (DMSO). En una atmósfera de argón se añadieron 18,00 mg (51,62 μ moles, 9,8 equiv.) de bromuro de NH-boc-7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0348 y 61,7 μ l (6,10 μ moles, 1 equiv.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Después de 2 h la mezcla de reacción se trató repetidamente con 10 μ l (12,00 mg; 34,4 μ moles; 5,6 equiv.) de bromuro de NH-boc-7-amino-3,3-dimetil-4,5-ditia-heptilo HDP 30.0345 y 61,7 μ l de LiOH 0,1 M. Después de 8 h la mezcla se diluyó con DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

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

0,51 mg (rendimiento de un 7 %; rendimiento de un 48 % basándose en la α -amanitina convertida). MS: 1196 M+H⁺

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



0,51 mg (0,43 μ moles) de HDP 30.0350 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 1 min a temperatura ambiente. El ácido trifluoroacético se diluyó con 1000 μ l de tolueno y se evaporó a 20 °C a sequedad. Este proceso se repitió con 1000 μ l de tolueno y 1000 μ l de acetonitrilo (2 x). La mezcla de reacción se purificó en una LaPrep-HPLC:

20

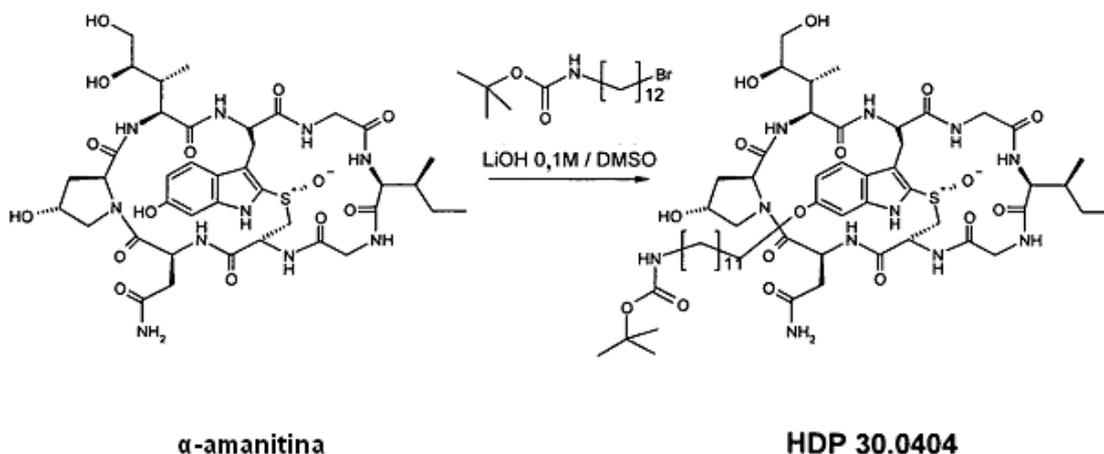
columna: Kromasil 100-C18, 10 μm , 250 mm x 10 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05 %), flujo: 6,5 ml/min, detección en $\lambda = 295 \text{ nm}$. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %. Disolvente B: 10 % agua: metanol al 90 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %.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

- 5 La fracción con un tiempo de retención de 18,2-18,6 min se recogió y los disolventes se evaporaron. El residuo se liofilizó en agua.

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

6.4 Conector de amanitina HDP 30.0409

6.4.1 Síntesis de 6'-O-(NH-boc-12-amino-dodecil)- α -amanitina HDP 30.0404



10

6,67 mg (7,26 μmoles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 250 μl de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se añadieron 21,00 mg (58,10 μmoles , 8 equiv.) NH-boc-12-amino-dodecylbromuro HDP 30.0383 and 72,6 ml (7,26 μmoles , 1 equiv.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). Después de 6 h se añadieron 36,5 μl de LiOH 0,1 M y la mezcla se interrumpió con 72,6 μl de una solución de ácido acético 0,1 M en DMSO dos h más tarde. El producto de reacción en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:

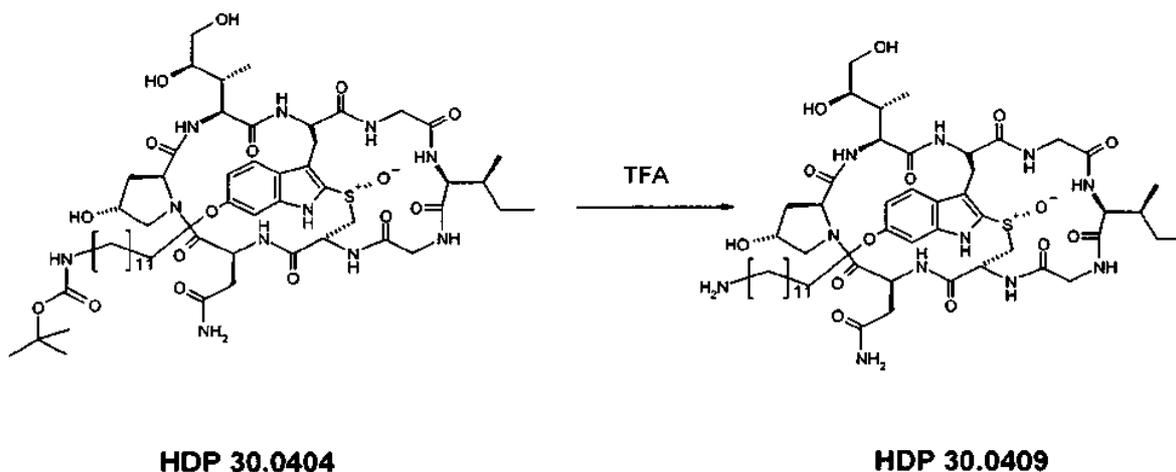
15

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

- 20 La fracción con un tiempo de retención de 22,0-22,7 min se recogió y los disolventes se evaporaron.

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

6.4.2 Síntesis de 6'-O-(12-aminododecil)- α -amanitina HDP 30.0409



5,96 mg (4,96 μ moles) de HDP 30.0404 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó 1 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se co-evaporó con 1000 μ l de tolueno y acetonitrilo y el sólido restante se purificó en una LaPrep-HPLC:

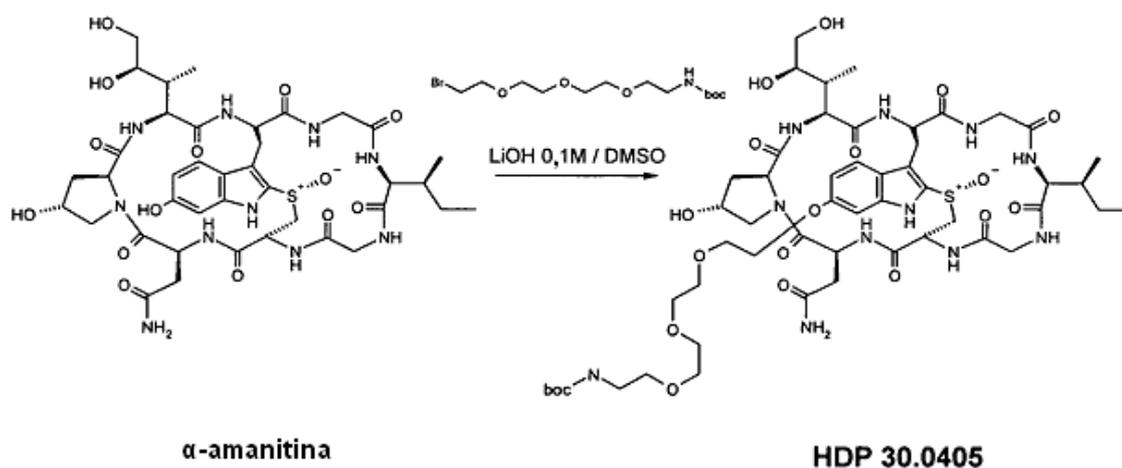
- 5 columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 mm x 20 mm, con acetonitrilo / agua, flujo: 26 ml/min, detección en $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: 5 % acetonitrilo. Disolvente B: agua al 5 %: 95 % acetonitrilo. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A al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

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

- 10 6,03 mg (rendimiento de un 99 %, sal de TFA). MS: 1102 M+H⁺

6.5 Conector de amanitina HDP 30.0410

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



- 15 6,67 mg (7,26 μ moles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 250 μ l de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se añadieron 20,51 mg (58,10 μ moles, 8 equiv.) de bromuro de NH-boc-11-amino-3,6,9-trioxa-undecilo HDP 30.0391 y 72,6 μ l (7,26 μ moles, 1 equiv.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1). La reacción se realizó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Después de un periodo adicional de 6 h, se añadió base de LiOH (0,5 equiv.). La mezcla se inactivó después de 8 h con 72,6 μ l de una solución de ácido acético 0,1 M en DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

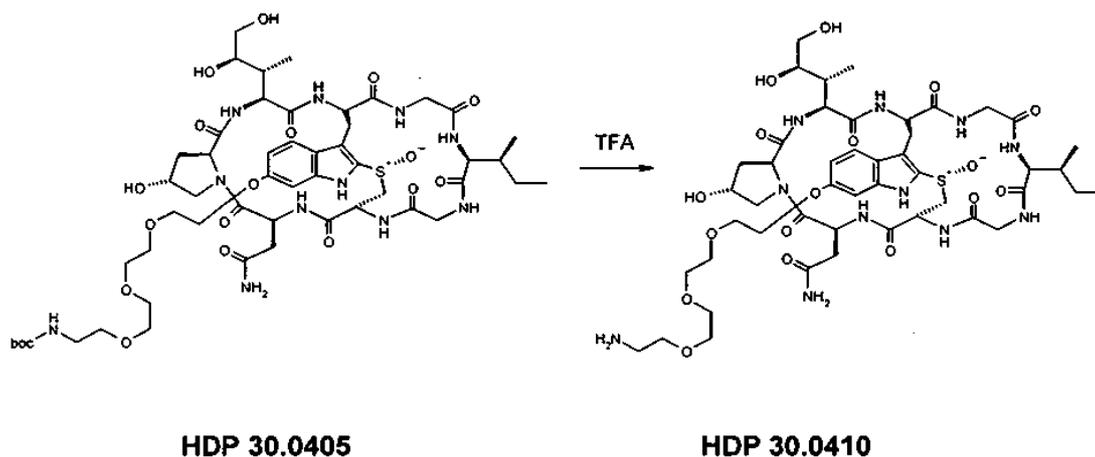
- 20 columna: Kromasil 100-C18, 10 μ m, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05 %), flujo: 26 ml/min, detección en $\lambda = 295$ nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %. Disolvente B: agua al 5 % : metanol al

95 %. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A al 0 %; 25-27 min para A al 100 %; 27-35 min para A al 100 %.

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

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

5 **6.5.2 Síntesis de 6'O-(11-amino-3,6,9-trioxa-undecil)-α-amanitina HDP 30.0410**



4,68 mg (3,92 μmoles) de HDP 30.0405 se disolvieron en 200 μl de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 1 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se co-evaporó con tolueno y acetonitrilo y el sólido en bruto se purificó en una LaPrep-HPLC:

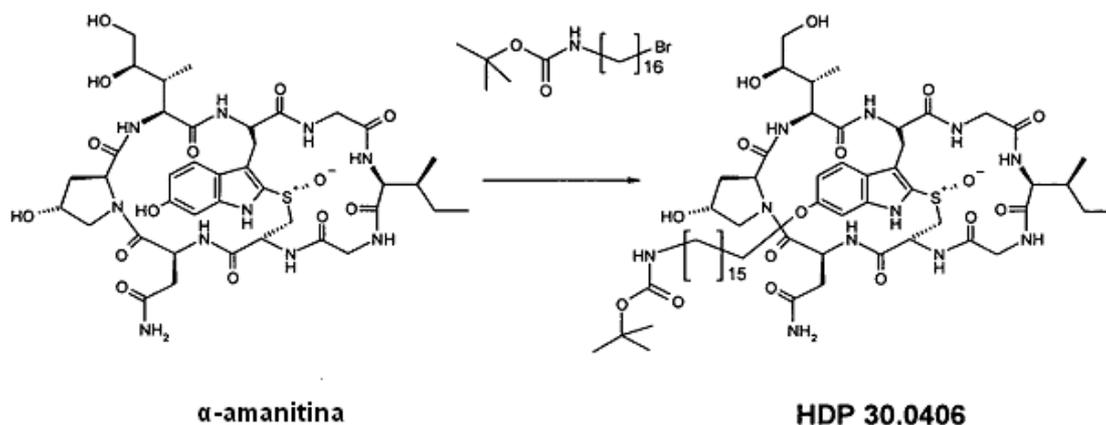
10 columna: Kromasil 100-C18, 10 μm, 250 mm x 20 mm, con metanol / agua (TFA al 0,05 %), flujo: 26 ml/ min, detección en λ = 295 nm. Disolvente A: agua al 95 %: metanol al 5 %. Disolvente B: agua al 5 %: metanol al 95 %. Gradiente: 0-5 min para A al 100 %; 5-20 min para A al 0 %; 20-25 min para A al 0 %; 25-27 min para A al 100 %; 27-35 min para A al 100 %.

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

2,44 mg (rendimiento de un 52 %, sal de TFA). Polvo de color blanco MS: 1102 M+H⁺

6.6 Conector de amanitina HDP 30.0411

6.6.1 Síntesis de 6'O-(NH-boc-16-amino-hexadecil)-α-amanitina HDP 30.0406



20 6,67 mg (7,26 μmoles) de α-amanitina secada al vacío se disolvieron en 750 μl de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se

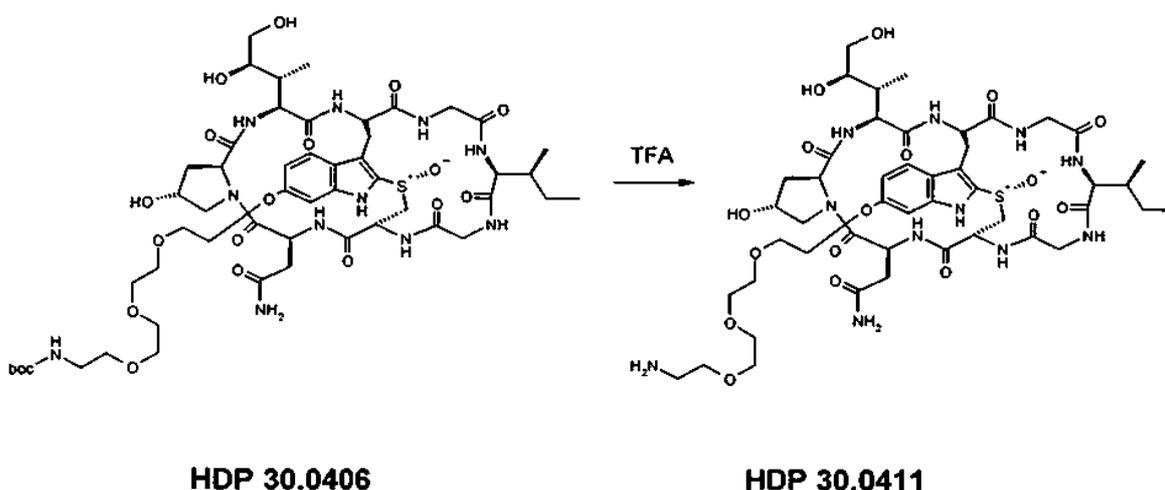
añadieron 24,00 mg (58,10 μ moles, 8 equiv.) de bromuro de NH-boc-16-amino-hexadecilo HDP 30.0398 a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se añadieron 72,6 μ l (7,26 μ moles, 1 equiv.) de LiOH 0,1 M en agua / DMSO (1:1) y la mezcla de reacción se calentó a 50 °C. Después de un periodo adicional de 6 h, se añadió base de LiOH (36,5 μ l) y la mezcla de reacción se interrumpió después de 8 h con 72,6 μ l de una solución de ácido acético 0,1 M en DMSO. La mezcla de reacción solidificada se diluyó con DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

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

4,41 mg (rendimiento de un 48 %) de un sólido de color blanco. MS: 1258 M+H⁺

6.6.2 Síntesis de 6'O-(16-amino-hexadecil)- α -amanitina HDP 30.0411



15 4,41 mg (3,50 μ moles) de HDP 30.0406 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 2 mins a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se co-evaporó dos veces con 1000 μ l de tolueno y 1000 μ l de acetonitrilo y el residuo sólido se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

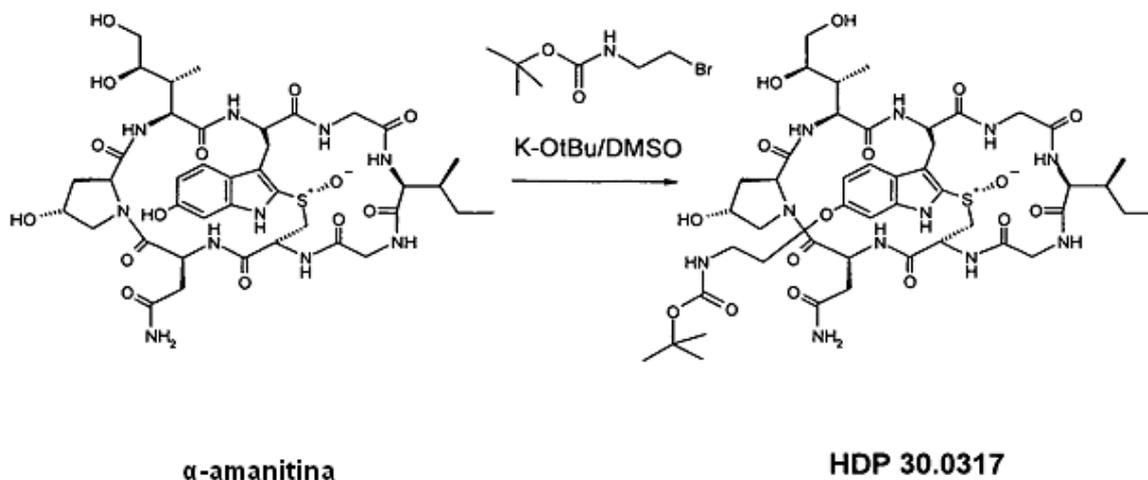
20

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

2,44 mg (rendimiento de un 52 %, sal de TFA). MS: 1102 M+H⁺

6.7 Conector de amanitina HDP 30.0412

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



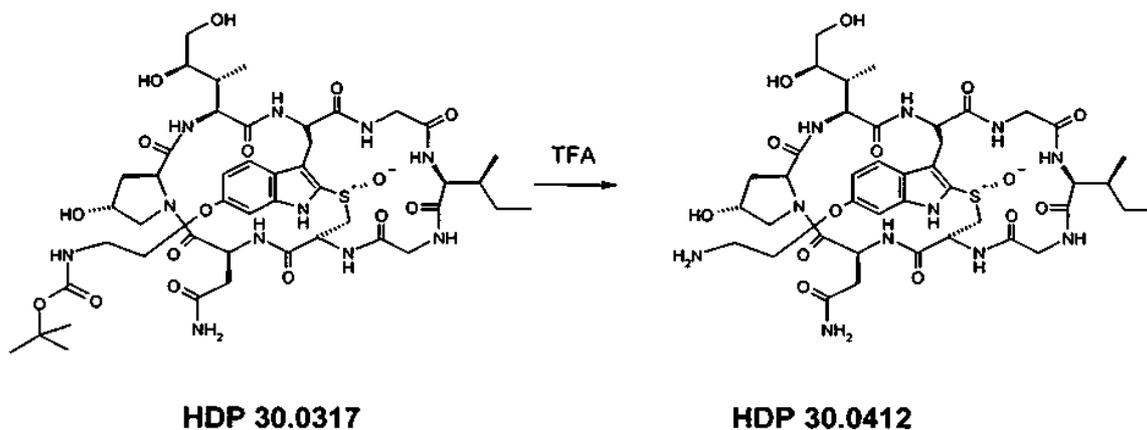
20,00 mg (21,8 μ moles) de α -amanitina secada al vacío se disolvieron en 900 μ l de dimetilsulfóxido seco (DMSO). Se añadieron 100,0 μ l (21,8 μ moles, 1 equiv.) de una solución 0,218 M de t-butilato de potasio en DMSO Y 39,00 mg (174,1 μ moles 8 equiv.) de bromuro de NH-boc-2-aminoetilo (obtenido en Fluka) a temperatura ambiente. Después de 4 y 6 h, se añadieron 1 y 2 equivalentes adicionales de t-butilato de potasio y bromuro de NH-boc-2-aminoetilo. La mezcla se inactivó después de 23 h con 72,6 μ l de una solución de ácido acético 0,1 M en DMSO y se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

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

3,86 mg (rendimiento de un 16 %) de un sólido de color blanco. MS: 1062 M+H⁺

6.7.2 Síntesis de 6'O-(2-amino-etil)- α -amanitina HDP 30.0412



3,86 mg (3,36 μ moles) de HDP 30.0317 se disolvieron en 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó durante 2 mins a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se co-evaporó con 1000 μ l de tolueno y 1000 μ l de acetonitrilo y el sólido se purificó en una LaPrep-HPLC:

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

ES 2 651 745 T3

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

1,54 mg (rendimiento de un 44 %, sal de TFA) de un sólido de color blanco. MS: 962 M+H⁺.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un resto de unión a diana unido por medio de un conector L a una amatoxina, en el que el conector L está conectado a la amatoxina por medio de
- 5 (i) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;
(ii) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o
(iii) el átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina;
- en cada caso en el que el conector L está conectado al resto de unión a diana por medio de un resto de urea.
- 10 2. El conjugado de la reivindicación 1, en la que el conjugado tiene una estructura seleccionada entre una de las siguientes estructuras:
- (i) amatoxina- γ C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
(ii) amatoxina- δ C-O-C(O)-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
15 (iii) amatoxina- δ C-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana;
(iv) amatoxina- δ C-O-C(O)-NH-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana; y
(v) amatoxina- $6'$ C-O-L-NH-C(O)-NH-resto de unión a diana.
3. El conjugado de la reivindicación 1 o 2, en el que el resto de unión a diana está conectado al conector L por medio de un grupo amino presente en el resto de unión a diana, en el que dicho grupo amino forma parte de dicho resto de urea.
- 20 4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la amatoxina se selecciona entre α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanina, amaninamida, amanulina, o ácido amanulínico, o entre sales o análogos de los mismos.
5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector L es un grupo alquileo, heteroalquileo, alquenileno, heteroalquenileno, alquinileno, heteroalquinileno, cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo, o heteroaralquileo, opcionalmente sustituido.
- 25 6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el conector L comprende un resto seleccionado entre uno de los siguientes restos: un resto disulfuro, un éter, una amina, un éster, una carboxamida, un uretano, y una urea.
- 30 7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo que está presente en una célula tumoral, en particular en el que el resto de unión a diana se une de forma específica a un epítipo de molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM).
8. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto de unión a diana se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 35 (i) anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo;
(ii) proteína similar a anticuerpo; y
(iii) aptámero de ácido nucleico.
9. El conjugado de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona entre un diacuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo deshumanizado, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 40 10. El conjugado de resto de unión a diana y toxina de la reivindicación 8 o 9, en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fd, Fv, Fv de una sola cadena, y Fv unidos por enlaces disulfuro (dsFv).
- 45 11. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso como un medicamento, en particular para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona entre el 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, linfoma maligno.

12. Composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y que además comprende uno o más diluyentes, vehículos, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, adsorbentes; y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

5 13. Una molécula de conjugación a amatoxina que comprende un conector L conectado a una amatoxina por medio de

(i) el átomo γ C del aminoácido 1 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace amida;

(ii) un átomo de oxígeno unido al átomo δ C del aminoácido 3 de la amatoxina, en particular por medio de un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

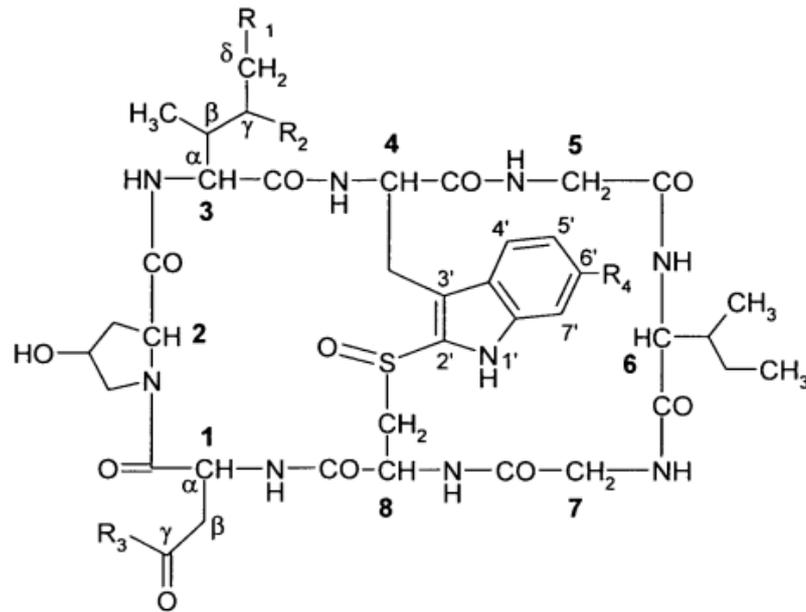
10 (iii) el átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina, en particular por medio de un átomo de oxígeno unido al átomo $6'$ C del aminoácido 4 de la amatoxina;

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

15 14. La molécula de conjugación a amatoxina de la reivindicación 13, en la que X se selecciona entre: -butiloxi, -succinimidiloxi, -1-O-succinimidiloxi-3-sulfonato (-Sulfo-NHS), -O-(4-nitrofeniloxi), -O-(3-nitrofeniloxi), -O-(2,4-dinitrofeniloxi), -O-(2,4-dicloro-6-nitrofeniloxi), -pentafluorofeniloxi, -pentaclorofeniloxi, -O-(2,4,5-triclorofeniloxi), -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-ftalimidiloxi, -1-benzotriazoliloxi, -1-(7-aza-benzotriazolil)oxi, y -N-imidazolilo.

20 15. Un método para sintetizar un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la etapa de hacer reaccionar una molécula de conjugación a amatoxina de la reivindicación 13 o 14 con un resto de unión a diana que comprende un grupo amino primario.

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 amanulinico | H | H | OH | OH |

Fig. 2

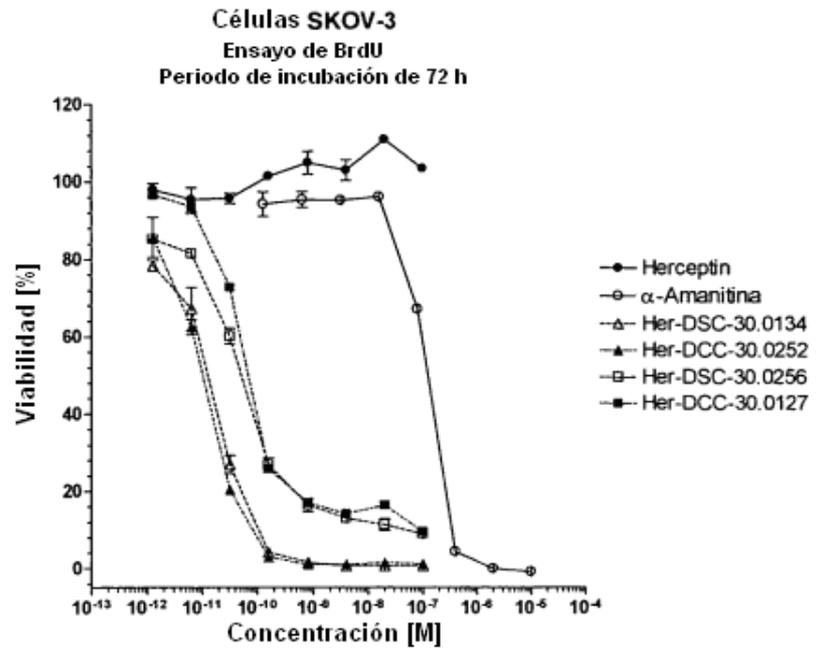


Fig. 3

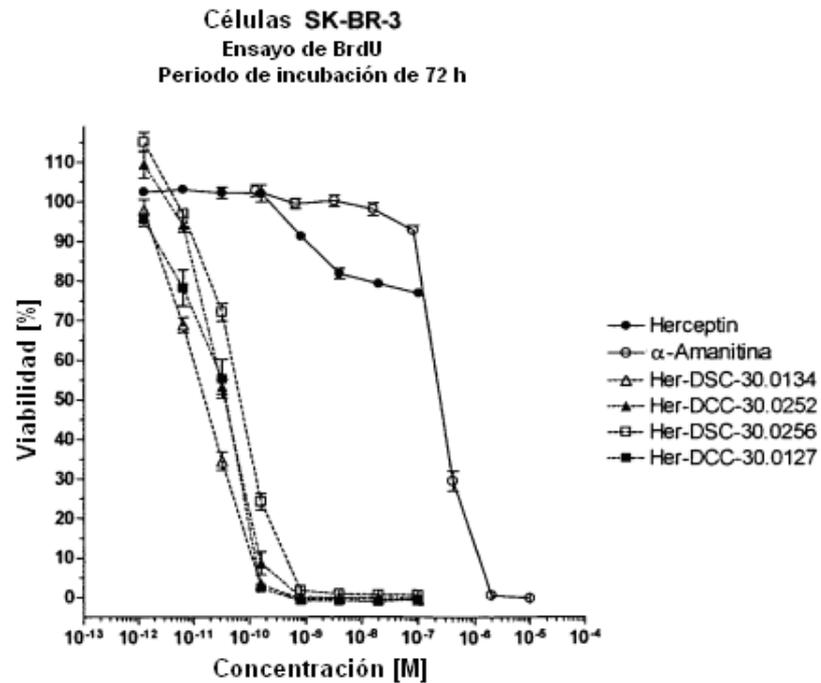


Fig. 4

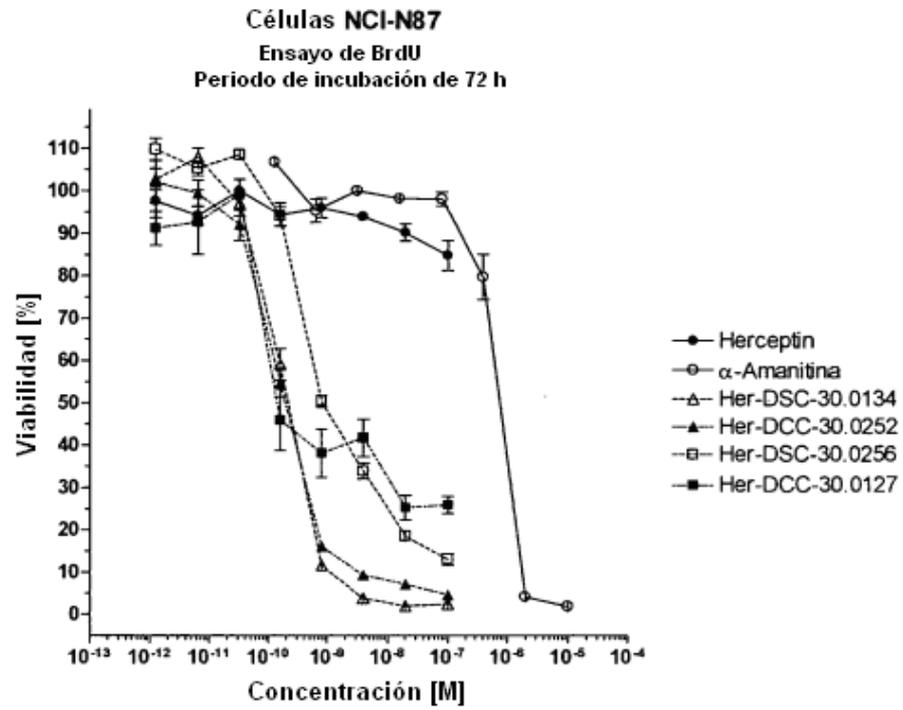


Fig. 5

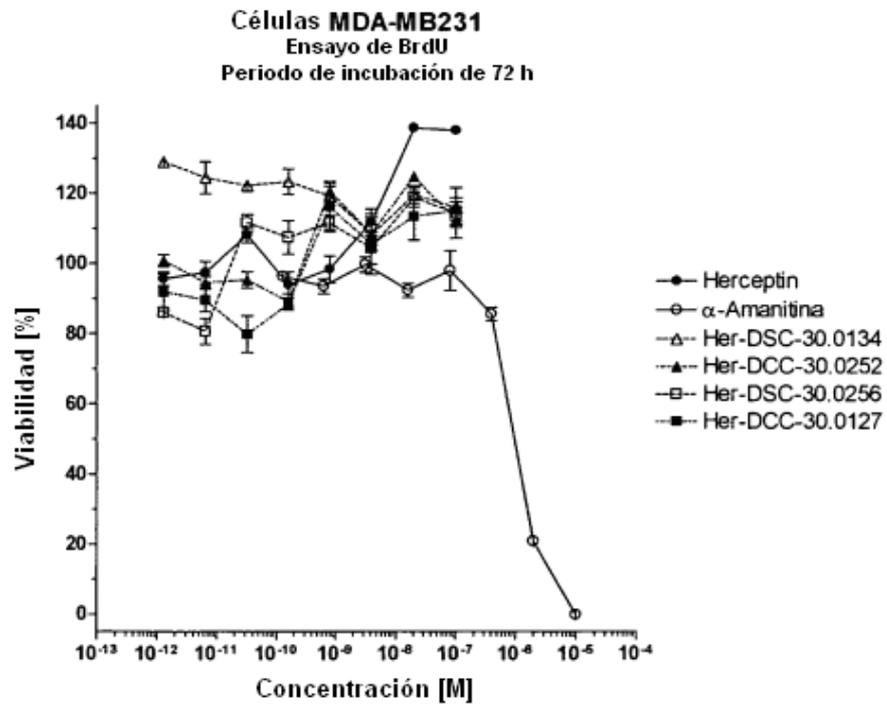


Fig. 6

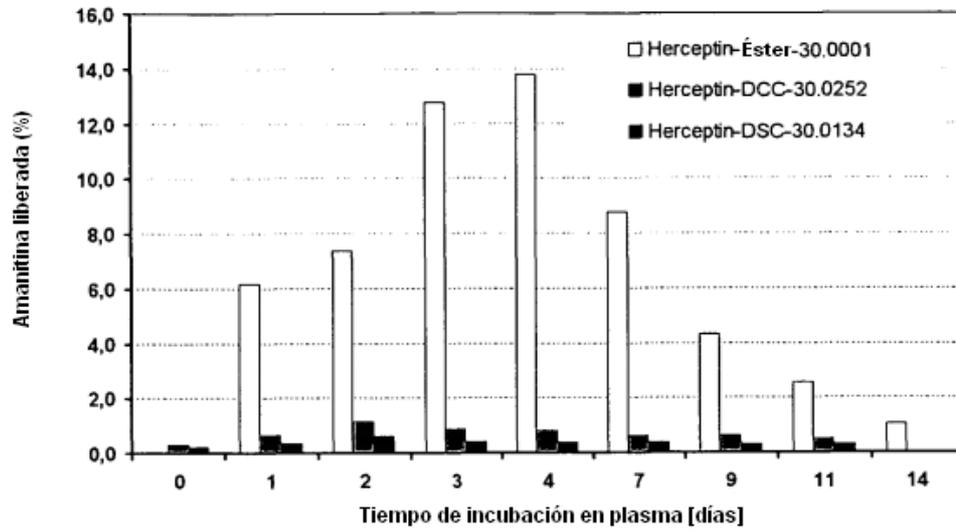


Fig. 7

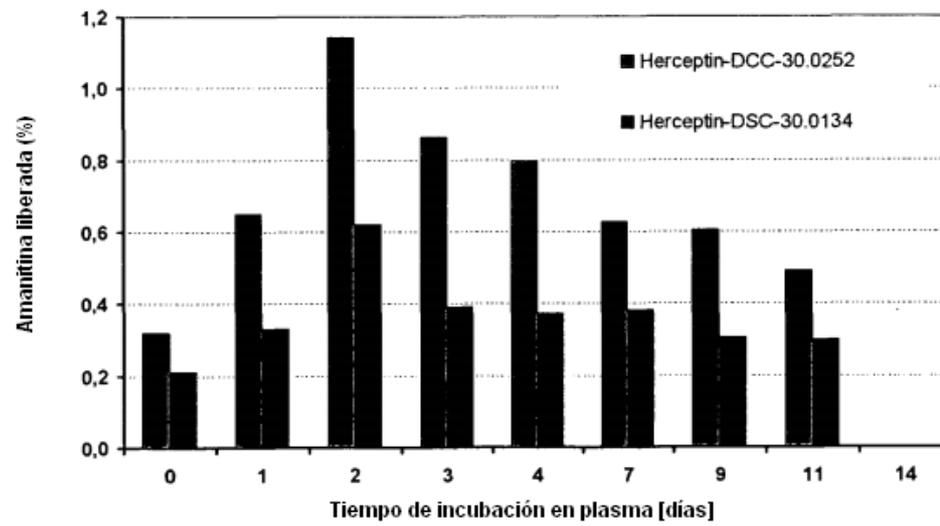


Fig. 8

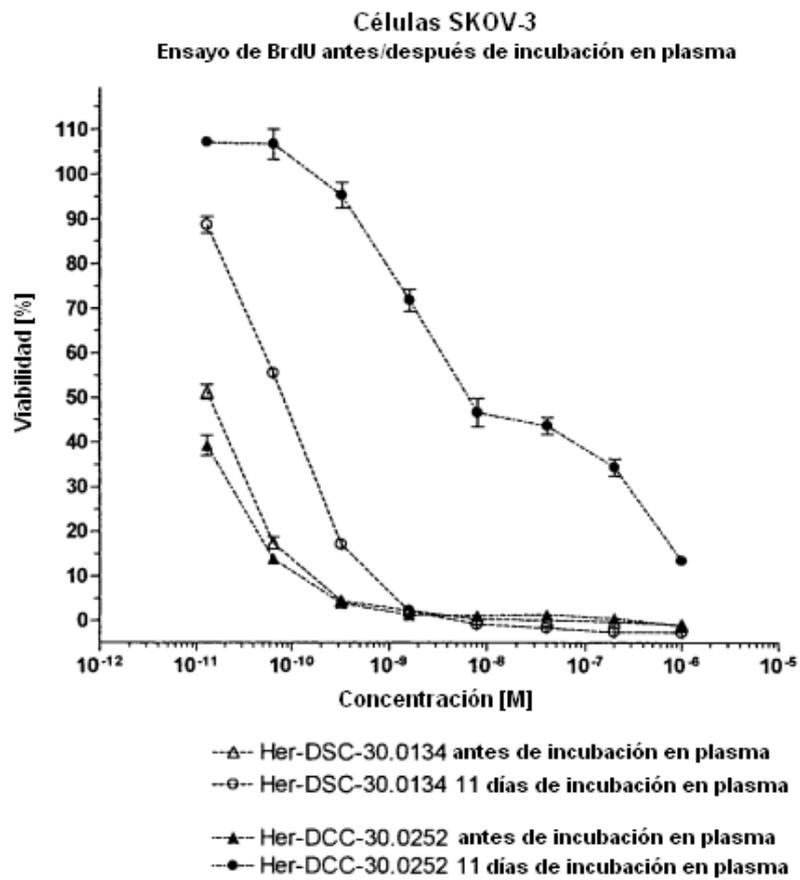


Fig. 9

