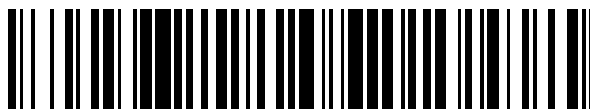


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 879**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2008 PCT/US2008/068093**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008 WO09002993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08780966 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2176293**

54 Título: **Conjugados que contienen enlazantes espaciadores hidrófilos**

30 Prioridad:

25.06.2007 US 946092 P
13.03.2008 US 3618608 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:

ENDOCYTE, INC. (100.0%)
3000 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906, US

72 Inventor/es:

LEAMON, CHRISTOPHER, PAUL;
WANG, YU;
VLAHOV, IONTCHO, RADOSLAVOV;
YOU, FEI;
KLEINDL, PAUL, JOSEPH y
SANTHAPURAM, HARI KRISHNA, R.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 879 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 que contienen enlazantes espaciadores hidrófilos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a composiciones y usos en la administración dirigida de fármacos. Más particularmente, la invención está dirigida a conjugados de administración de fármacos de unión al receptor de la superficie celular que contienen enlazantes espaciadores hidrófilos para uso en el tratamiento de estados de enfermedad causados por poblaciones de células patógenas y a composiciones farmacéuticas que usan e incluyen tales conjugados.

Antecedentes

- 10 El sistema inmune de los mamíferos proporciona un medio para el reconocimiento y la eliminación de células tumorales, otras células patógenas y la invasión de patógenos extraños. Si bien el sistema inmune normalmente proporciona una línea de defensa fuerte, hay muchos casos en los que las células cancerosas, otras células patógenas o los agentes infecciosos evaden una respuesta inmunitaria del huésped y proliferan o persisten con la patogenicidad concomitante del huésped. Se han desarrollado agentes quimioterapéuticos y terapias de radiación, por ejemplo, para eliminar la replicación de neoplasias. Sin embargo, muchos de los agentes quimioterapéuticos actualmente disponibles y los regímenes de radioterapia tienen efectos secundarios adversos porque no solo destruyen las células patógenas, sino que también afectan a las células huésped normales, tales como las células del sistema hematopoyético. Los efectos secundarios adversos de estos medicamentos contra el cáncer resaltan la necesidad de desarrollar nuevas terapias selectivas para poblaciones de células patógenas y con una toxicidad reducida para el huésped.

- 25 Los investigadores han desarrollado protocolos terapéuticos para destruir células patógenas dirigiendo compuestos citotóxicos a tales células. Muchos de estos protocolos utilizan toxinas conjugadas a anticuerpos que se unen a antígenos únicos o sobreexpresados por las células patógenas en un intento de minimizar el suministro de la toxina a las células normales. Usando este enfoque, se han desarrollado ciertas inmunotoxinas que consisten en anticuerpos dirigidos a antígenos específicos en células patógenas, los anticuerpos están vinculados a toxinas como la ricina, la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina de la difteria y el factor de necrosis tumoral. Estas inmunotoxinas se dirigen a las células patógenas, como las células tumorales, que llevan los antígenos específicos reconocidos por el anticuerpo (Olsnes, S., *Immunol. Today*, 10, pp. 291-295, 1989; Melby, E.L., *Cancer Res.*, 53(8), pp. 1755-1760, 1993; Better, M.D., PCT Publication Number WO 91/07418, published May 30, 1991).

- 30 Otro enfoque para atacar poblaciones de células patógenas, tales como células cancerosas o patógenos extraños, en un huésped es potenciar la respuesta inmune del huésped contra las células patógenas para evitar la necesidad de administración de compuestos que también pueden exhibir toxicidad del huésped independiente. Una estrategia informada para la inmunoterapia es unir los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos multiméricos de ingeniería genética, a la superficie de las células tumorales para mostrar la región constante de los anticuerpos en la superficie celular y, por lo tanto, inducir la muerte de las células tumorales mediante diversos procedimientos mediados por el sistema inmune (Dc Vita, V.T., *Biologic Therapy of Cancer*, 2d ed. Philadelphia, Lippincott, 1995; Soullilou, J.P., U.S. Patent 5,672,486). El documento US20050002942 A1 describe conjugados de administración de fármacos de unión a receptores de vitaminas. Sin embargo, estos enfoques se han complicado por las dificultades para definir antígenos específicos de tumores. Por consiguiente, se necesitan compuestos y procedimientos adicionales para dirigirse selectivamente a poblaciones de células patógenas.

Sumario de la invención

- 45 El objeto de la invención es el que se expone en las reivindicaciones. Se ha descubierto que los agentes terapéuticos, los agentes de diagnóstico y los agentes de formación de imágenes se pueden conjugar con otros compuestos para controlar o alterar su comportamiento, biodistribución, metabolismo y/o depuración in vivo. En una realización ilustrativa de la invención, se describen conjugados de compuestos que incluyen un enlazante espaciador hidrófilo. En un aspecto, se describen conjugados de compuestos que incluyen tanto un enlazante espaciador hidrófilo como un ligando diana. En un aspecto, la invención se refiere a compuestos de la fórmula

B-L-A

- 50 en la que B es un ligando de unión al receptor que se une a un receptor de células diana, L es un enlazante que comprende uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos, y A representa uno o más agentes de diagnóstico, terapéuticos o de formación de imágenes, en la que al menos uno de los espaciadores hidrófilos Los enlazantes comprenden al menos tres grupos polihidroxilo.

- 55 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos como anteriormente, y opcionalmente un portador, diluyente o excipiente para los mismos, o una combinación de los mismos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto como el anterior o una composición farmacéutica que comprende el compuesto anterior, para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o afección, o una combinación de los mismos, en el que el tratamiento incluye dirigirse a una célula que expresa o sobreexpresa un receptor capaz de unirse al ligando de unión B al receptor.

- 5 Un aspecto adicional de la invención se relaciona con el uso de un compuesto como el anterior o una composición farmacéutica que comprende el compuesto como el anterior en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección, o una combinación de los mismos, en el que el tratamiento incluye dirigirse a una célula que expresa o sobreexpresa un receptor capaz de unirse al ligando de unión B al receptor.

- 10 En una divulgación, los compuestos dirigidos a la unión que no son receptores de la siguiente fórmula en este documento se describen:

L-A

- 15 en la que L es un enlazante que comprende uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos y A es un agente de diagnóstico, terapéutico o de formación de imágenes. En una variación, el enlazante L no incluye un enlazante liberable. En otra variación, el enlazante L incluye un enlazante liberable. En otra realización, al menos uno de los enlazantes espaciadores hidrófilos se forma a partir de o incluye al menos un carbohidrato. En una variación, el carbohidrato forma parte de la cadena enlazante que conecta B y A. En otra variación, el carbohidrato forma parte de una cadena lateral unida a la cadena enlazante que conecta B y A.

- 20 Se aprecia que en cada una de las realizaciones anteriores, se puede unir más de un ligando de unión B al receptor a los enlazantes descritos en este documento. Se aprecia además que se puede unir más de un agente A los enlazantes descritos en este documento. Tales conjugados de multiligandos y/o multifármaco también se describen en este documento, en los que el enlazante comprende un enlazante espaciador hidrófilo.

En otra realización, los compuestos en este documento se describen que tienen una absorción reducida por el hígado y es menos probable que sean eliminados por el hígado. En un aspecto, tales compuestos se eliminan preferencialmente mediante los procedimientos renales en comparación con los procedimientos hepáticos.

- 25 El agente o agentes A incluyen fármacos terapéuticos, agentes de diagnóstico, agentes de formación de imágenes y cualquier otro compuesto que se suministre de forma deseable o ventajosa a una célula dirigiéndose a un receptor celular. Los fármacos ilustrativos incluyen fármacos citotóxicos, agentes antiinflamatorios y similares. Los agentes de diagnóstico ilustrativos y los agentes de formación de imágenes incluyen agentes de formación de imágenes PET, agentes de formación de imágenes fluorescentes, radioligandos, agentes complejantes de radioligandos y otros.

- 30 En las realizaciones de compuestos, composiciones y procedimientos descritos en este documento, las células que se pueden dirigir con los agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de formación de imágenes A incluyen una amplia variedad, tal como, pero no se limita a, células cancerosas y células bacterianas, células tumorales, monocitos, macrófagos activados, células progenitoras, tales como células progenitoras endoteliales, otras células inflamatorias, placas ateroscleróticas, infecciones y otras. La orientación de la célula se logra mediante la selección apropiada de un ligando de unión B al receptor celular. Se aprecia que la orientación selectiva o específica de una célula in vivo se puede lograr seleccionando un receptor que sea expresado o sobreexpresado preferencialmente por la célula diana. De forma ilustrativa, la célula diana expresa o sobreexpresa preferencialmente un receptor de vitamina, tal como los receptores de folato.

- 40 En otra realización, los conjugados descritos en este documento se incluyen en composiciones farmacéuticas en cantidades eficaces para tratar enfermedades y estados de enfermedad asociados con poblaciones de células patógenas.

En otra realización, los conjugados descritos en este documento y las composiciones farmacéuticas que los contienen son para uso en procedimientos para tratar enfermedades y estados de enfermedad asociados con poblaciones de células patógenas.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la afinidad de unión relativa de EC234, DPM para el ácido fólico (●) y EC0234 (■).

La figura 2 muestra la actividad de EC0258 contra las células KB (2h de pulso/72h caza) para EC258 (●) y EC258 + exceso de ácido fólico (○).

- 50 La figura 3A muestra el efecto de EC0234 y EC0246 contra tumores M109 en ratones, controles (■) no tratados, EC145 estándar (TIW 3 μmol/kg, 3 semanas) (●), EC0234 (TIW 3 μmol/kg, 3 semanas) (▼) y EC0246 (TIW 3 μmol/kg, 3 semanas) (▲).

La figura 3B muestra el efecto de EC0234 y EC0246 sobre el cambio porcentual del peso corporal, controles no tratados (■), EC145 estándar (TIW 3 μmol/kg, 3 semanas) (●), EC0234 (TIW 3 μmol/kg, 3 semanas) (▼), y

EC0246 (TIW 3 $\mu\text{mol/kg}$, 3 semanas) ($\blacktriangle$); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 4A muestra el efecto sobre el volumen del tumor KB en ratones de EC0396 ($\blacktriangledown$), EC145 ($\blacktriangle$) y control ($\blacksquare$) de PBS dosificados a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación).

La figura 4B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal de EC0396 ($\blacktriangledown$), EC145 ($\blacktriangle$) y control ($\blacksquare$) de PBS dosificados a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 5A muestra el efecto sobre el volumen del tumor KB de EC0400, EC145 ($\blacktriangle$) y control de PBS ($\blacksquare$) dosificados a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación).

La figura 5B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal de EC0400 ($\bullet$), EC145 ($\blacktriangle$) y control ($\blacksquare$) de PBS dosificados a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 6A muestra el efecto sobre el volumen del tumor de EC0429 (∇) y EC145 ($\blacktriangle$), dosificado a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación) en comparación con los controles no tratados ($\bullet$) para tumores M109 en ratones Balb/c.

La figura 6B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal EC0429 (∇) y EC145 ($\blacktriangle$), dosificado a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación) en comparación con los controles ($\bullet$) no tratados; lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 7A muestra el efecto sobre el volumen del tumor de EC0434 (Δ) y EC145 ($\blacktriangle$), dosificado a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación) en comparación con los controles ($\bullet$) no tratados para tumores M109 s.c. en ratones Balb/c.

La figura 7B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal de EC0434 (Δ) y EC145 ($\blacktriangle$), dosificado a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación) en comparación con los controles no tratados ($\bullet$); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 8A muestra el efecto sobre el volumen del tumor de EC0305 ($\bullet$), EC0436 ($\blacktriangledown$) y el control de PBS ($\blacksquare$) dosificado a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación) para tumores M109 s.c. en ratones Balb/c.

La figura 8B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal de EC0305 ($\bullet$), EC0436 ($\blacktriangledown$) y el control ($\blacksquare$) de PBS dosificados a 2 $\mu\text{mol/kg}$ de TIW durante dos semanas (la línea vertical indica el último día de dosificación); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 9 muestra el cambio porcentual del peso corporal de ratones Balb/c que tienen tumores M109 s.c. tratados por vía intravenosa tres veces en una semana durante una semana con PBS (controles no tratados) ($\bullet$), EC0436 (TIW 2 $\mu\text{mol/kg}$) ($\blacktriangle$), EC0436 (TIW 2.5 $\mu\text{mol/kg}$) ($\blacktriangledown$), EC0436 (TIW 3 $\mu\text{mol/kg}$) ($\blacksquare$), EC0305 (TIW 2 $\mu\text{mol/kg}$) (Δ), EC0305 (TIW 2.5 $\mu\text{mol/kg}$) (∇), y EC0305 (TIW 3 $\mu\text{mol/kg}$) ($\square$).

La figura 10A muestra el efecto en tumores KB s.c. en ratones nu/nu por EC0565 a 3 $\mu\text{mol/kg}$ (qdx5 durante dos semanas) ($\bullet$), en comparación con los controles tratados con PBS ($\blacksquare$). A partir de los datos, se puede determinar un valor de log de destrucción de células (LCK) de 1,2 (los valores mayores de aproximadamente 0,7 son indicativos de un compuesto activo contra el cáncer).

La figura 10B muestra el efecto sobre el cambio porcentual del peso corporal por EC0565 a 3 $\mu\text{mol/kg}$ (qdx5 durante dos semanas) ($\bullet$), en comparación con los controles tratados con PBS ($\blacksquare$); lo que indica que no se observó una gran toxicidad durante el tratamiento.

La figura 11 muestra la excreción biliar de DAVLBH total de diversos conjugados de DAVLBH a 2 $\mu\text{mol/kg}$ i.v. bolo en una excreción hepatobiliar en el ensayo del conducto biliar en ratas canuladas. El porcentaje de la dosis total en la bilis se midió para EC 145 = 8,7 % ($\bullet$), EC0409 = 7,9 % ($\blacklozenge$), EC0429 = 8,6 % ($\blacksquare$), EC0434 = 2,8 % ($\blacktriangledown$). Además, EC145 muestra un AUC = 1092 ($\bullet$); el último punto de tiempo recolectado fue de 139 min; y EC0434 muestra un AUC = 260 ($\blacksquare$); los puntos de tiempo de 120, 135 y 360 minutos estaban todos por debajo del nivel de cuantificación, esto es, <0,65 μM .

La figura 12 muestra el efecto de los espaciadores basados en ribosa sobre la eliminación biliar y el impacto de la derivación extendida. Los números sobre las barras corresponden al número de espaciadores hidrófilos en el enlazante.

5 La figura 13 muestra que EC0565 induce la inhibición dosis-respuesta de RPS6 y p70S6K en células KB (1 h de pulso/4 h caza) usando una exposición de cámara de 30 minutos, en la que C = Control (células no tratadas); FAC = control de ácido fólico (100 μ M).

La figura 14 muestra la citotoxicidad de bortezomib frente al derivado de bortezomib metiltiol (EC0501). IC₅₀ bortezomib, 20 nM (●); EC0501, 240 nM (■).

10 La figura 15 muestra que los enlazantes espaciadores hidrófilos permiten la actividad específica de los conjugados de folato mono- y bis-tio-velcade contra células RAW264.7. Viabilidad celular después de un pulso de 5 h, seguido de una caza de 72 h (MTT); bortezomib (■), EC0501 (□), EC0522 (▲), EC0522 más exceso de ácido fólico (▽).

15 La figura 16 muestra la viabilidad celular (5 h de pulso/72 h caza) (XTT) después del tratamiento con EC0595 (IC₅₀ 13 nM) (▼), EC0595 más exceso de ácido fólico (▽), bortezomib (●), EC0525 (46 nM IC₅₀) (●), EC0525 más exceso de ácido fólico (o).

La figura 17 muestra la viabilidad celular después de una incubación de 24 h (XTT) con bortezomib (■), EC0587 (●), EC0587 más exceso de ácido fólico (o).

20 La figura 18 muestra la inhibición de la actividad del proteosoma estimulada por LPS en células RAW 264.7 (5 h de pulso/24 h caza), LPS 100 ng/ml, 30 m 20S de tiempo de reacción proteosoma/sustrato por bortezomib (▼), EC0522 (.), EC0522 más exceso de ácido fólico (▽), EC0525 (●), EC0525 más exceso de ácido fólico (o), EC0595 (◆), EC0595 más exceso de ácido fólico (□); IC₅₀ es aproximadamente 30 nM para EC0595 y EC0525.

La figura 19 muestra la actividad contra las células RAW (5 h de pulso/72 h caza) después del tratamiento con α -amantina (■), EC0592 (IC₅₀ 3.7 nM) (●), EC0592 más exceso de ácido fólico (o).

25 Descripción detallada

Los conjugados de administración de fármacos que se describen en este documento consisten en un ligando de unión al receptor (B), un enlazante polivalente (L) que comprende uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos, y un agente de diagnóstico, terapéutico o de formación de imágenes (A) que se administra deseablemente a una célula. El ligando de unión (B) está unido covalentemente al enlazante polivalente (L), y el agente de diagnóstico, terapéutico o de formación de imágenes (A), o análogo o derivado de los mismos, también está unido covalentemente al enlazante polivalente (L). Se debe entender que el agente de diagnóstico, terapéutico o de formación de imágenes (A) incluye análogos y derivados de los mismos que están unidos al enlazante (L). El enlazante polivalente (L) comprende uno o más enlazantes espaciadores y/o enlazantes liberables, y combinaciones de los mismos, en cualquier orden. En una variación, los enlazantes liberables y los enlazantes espaciadores opcionales están unidos covalentemente entre sí para formar el enlazante. En otra variación, un enlazante liberable se une directamente al agente (A), o análogo o derivado del mismo. En otra variación, un enlazante liberable se une directamente al ligando de unión. En otra variación, ya sea uno o ambos ligandos de unión y el agente (A), o análogo o derivado del mismo, están unidos a un enlazante liberable a través de uno o más enlazantes espaciadores. En otra variación, cada uno de los ligandos de unión y el agente (A), o análogo o derivado del mismo, se une a un enlazante liberable, cada uno de los cuales puede estar directamente unido entre sí, o unido covalentemente a través de uno o más enlazantes espaciadores.

De lo anterior, se debe apreciar que la disposición del ligando de unión, y el agente (A), o su análogo o derivado, y los diversos enlazantes espaciadores liberables y opcionales pueden variar ampliamente. En un aspecto, el ligando de unión y el agente (A), o análogo o derivado del mismo, y los diversos enlazantes espaciadores liberables y opcionales están unidos entre sí a través de heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, silicio y similares. En variaciones, los heteroátomos, excluyendo el oxígeno, pueden estar en diversos estados de oxidación, tales como N(OH), S(O), S(O)₂, P(O), P(O)₂, P(O)₃ y similares. En otra variación, los heteroátomos se pueden agrupar para formar radicales divalentes, tales como por ejemplo, hidroxilaminas, hidrazinas, hidrazonas, sulfonatos, fosfinatos, fosfonatos y similares, incluidos los radicales de las fórmulas -(NHR₁NHR₂)-, -SO-, -(SO₂)-, y -N(R³)O-, en el que R¹, R², y R³ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo, arilalquilo, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y alcoxilalquilo. En otra variación, más de un ligando de unión está unido al enlazante polivalente. En otra variación, más de un agente (A) está unido al enlazante polivalente. En otra variación, más de un ligando de unión y más de un agente (A) están unidos al enlazante polivalente.

55 En una realización, el ligando de unión al receptor es un ligando de unión al receptor de la vitamina tal como una vitamina, o un análogo o un derivado del mismo, capaz de unirse a los receptores de la vitamina. En otra realización,

el ligando de unión es una vitamina, o análogo o derivado de la misma, unido a un enlazante liberable que se une al fármaco a través de un enlazante que se forma a partir de uno o más enlazantes espaciadores y/o enlazantes liberables y/o enlazantes espaciadores hidrófilos. En una variación, tanto el fármaco como la vitamina, o análogo o derivado del mismo, se pueden unir a los enlazantes espaciadores, en los que los enlazantes espaciadores se unen entre sí a través de uno o más enlazantes liberables. Además, tanto el fármaco como la vitamina, o análogo o derivado del mismo, se pueden unir a uno o más enlazantes liberables, en los que los enlazantes liberables se unen entre sí o mediante un enlazante espaciador. Cada uno de estos radicales puede estar conectado a través de heteroátomos existentes o adicionales en el ligando de unión, el agente A, o el espaciador hidrófilo liberable, o el enlazante espaciador adicional.

El sitio de unión para el ligando de unión (B) puede incluir receptores para cualquier ligando de unión (B), o un derivado o análogo del mismo, capaz de unirse específicamente a un receptor en el que el receptor u otra proteína se expresa de forma única, sobreexpresa o preferencialmente expresado por una población de células patógenas. Una proteína presente en la superficie expresada de forma única, sobreexpresada o expresada preferencialmente por las células patógenas es por lo general un receptor que no está presente o presente en concentraciones más bajas en las células no patógenas que proporcionan un medio para la eliminación selectiva, el marcado o el diagnóstico de las células patógenas. Los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión pueden ser capaces de una unión de alta afinidad a receptores en células cancerosas u otros tipos de células patógenas. La unión de alta afinidad puede ser inherente al ligando de unión o la afinidad de unión se puede mejorar mediante el uso de un ligando modificado químicamente (por ejemplo, un análogo o un derivado de una vitamina).

Los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión descritos en este documento se pueden formar a partir de, por ejemplo, una amplia variedad de vitaminas o análogos/derivados de vitaminas de unión a receptores, enlazantes y fármacos. Los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión descritos en este documento son capaces de dirigirse selectivamente a una población de células patógenas en el conducto animal huésped a la expresión preferencial de un receptor para el ligando de unión, tal como una vitamina, accesible para la unión del ligando, en las células patógenas. Las unidades estructurales de vitaminas ilustrativas que se pueden usar como ligando de unión (B) incluyen carnitina, inositol, ácido lipoico, piridoxal, ácido ascórbico, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina, tiamina, biotina, vitamina B₁₂, otras vitaminas solubles en agua, las vitaminas B y las vitaminas solubles en lípidos A, D, E y K. Estas vitaminas, y sus análogos y derivados de unión al receptor, constituyen una entidad de orientación ilustrativa que se puede acoplar con el fármaco mediante un enlazante bivalente (L) para formar un ligando de unión (B) fármaco conjugado de administración como se describe en este documento. El término vitamina se entiende que incluye análogos de vitaminas y/o derivados, a menos que se indique lo contrario. Ilustrativamente, el ácido ptericoico que es un derivado del folato, los análogos de biotina tales como la biocitina, el sulfóxido de biotina, la oxibiotina y otros compuestos de unión al receptor de biotina, y similares, se consideran que son vitaminas, análogos de vitaminas y derivados de vitaminas. Se debe apreciar que los análogos o derivados de la vitamina como se describen en este documento se refieren a vitaminas que incorporan un heteroátomo a través del cual el análogo o derivado de las vitaminas se une covalentemente al enlazante bivalente (L).

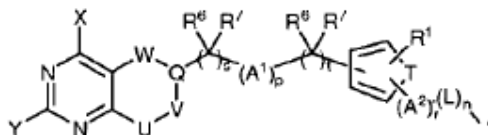
Las unidades estructurales de vitaminas ilustrativas incluyen ácido fólico, biotina, riboflavina, tiamina, vitamina B₁₂, y análogos de unión al receptor y derivados de estas moléculas de vitamina, y otras moléculas de unión a receptor de vitamina relacionadas.

En otra realización, el receptor celular es un receptor de folato, y el ligando de orientación B es un ligando de unión al receptor de folato. En otra realización, B es un folato, tal como ácido fólico, o un análogo o derivado de ácido fólico que se une a los receptores de ácido fólico. Se debe entender como se usa en este documento, que el término folato se usa tanto individual como colectivamente para referirse al ácido fólico en sí, y/o a tales análogos y derivados del ácido fólico que son capaces de unirse a los receptores de folato. En otra realización, B es un compuesto capaz de unirse selectiva o específicamente a un receptor de folato, tal como un anticuerpo.

Las realizaciones ilustrativas de análogos y/o derivados de folato incluyen ácido folínico, ácido pteropoliglutámico y pteridinas de unión al receptor de folato tales como tetrahidropterinas, dihidrofolatos, tetrahidrofolatos, y sus análogos de deaza y dideaza. Los términos análogos de "deaza" y "dideaza" se refieren a los análogos reconocidos en la técnica que tienen un átomo de carbono sustituido por uno o dos átomos de nitrógeno en la estructura del ácido fólico natural, o análogo o derivado de los mismos. Por ejemplo, los análogos de deaza incluyen los análogos de 1-deaza, 3-deaza, 5-deaza, 8-deaza y 10-deaza de folato. Los análogos de dideaza incluyen, por ejemplo, 1,5-dideaza, 5,10-dideaza, 8,10-dideaza y 5,8-dideaza análogos de folato. Otros folatos útiles como ligandos formadores complejos incluyen los análogos de unión al receptor de folato aminopterina, amopterina (metotrexato), N¹⁰-metilfolato, 2-deamino-hidrofolato, análogos de deaza como 1-deazametopterina o 3-deazametopterina y ácido 3',5'-dicloro-4-amino-4-deoxi-N¹⁰-metilpterilglutámico (diclorometotrexato). Los análogos y/o derivados de ácido fólico anteriores se denominan convencionalmente folatos, lo que refleja su capacidad para unirse con receptores de folato, y tales ligandos cuando se conjugan con moléculas exógenas son eficaces para mejorar el transporte transmembrana, tales como a través de la endocitosis mediada por folato como se describe en este documento. Otros ligandos de unión apropiados capaces de unirse a receptores de folato para iniciar el transporte endocítico mediado por el receptor del complejo incluyen anticuerpos contra el receptor de folato. Una molécula exógena en

complejo con un anticuerpo para un receptor de folato se utiliza para desencadenar el transporte transmembrana del complejo.

Se describen análogos adicionales de ácido fólico que se unen a los receptores de ácido fólico en la Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos de Serie Nos. 2005/0227985 y 2004/0242582. Ilustrativamente, tales análogos de folato tienen la fórmula general:



en la que X e Y se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en halo, R^2 , OR^2 , SR^3 y NR^4R^5 ; U, V y W representan restos divalentes, seleccionados cada uno independientemente del grupo que consiste en $-(R^{6a})C=$, $-N=$, $-(R^{6a})C(R^{7a})-$, y $-N(R^{4a})-$; Q se selecciona del grupo que consiste en C y CH; T se selecciona del grupo que consiste en S, O, N y $-C=C-$;

A^1 y A^2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en oxígeno, azufre, $-C(Z)-$, $-C(Z)O-$, $-OC(Z)-$, $-N(R^{4b})-$, $-C(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)-$, $-OC(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)O-$, $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R^{4a})S(O)_2-$, $-C(R^{6b})(R^{7b})-$, $-N(C\equiv CH)-$, $-N(CH_2C\equiv CH)-$, alquileo C_1-C_{12} y alquenoxi C_1-C_{12} , donde Z es oxígeno o azufre;

R^1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{12} y alcoxi C_1-C_{12} ; R^2 , R^3 , R^4 , R^{4a} , R^{4b} , R^5 , R^{5b} , R^{6b} y R^{7b} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{12} , alcoxi C_1-C_{12} , alcanoilo C_1-C_{12} , alquenoilo C_1-C_{12} , alquinilo C_1-C_{12} , (alcoxi C_1-C_{12}) carbonilo y (alquilamino C_1-C_{12}) carbonilo;

R^6 y R^7 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{12} y alcoxi C_1-C_{12} ; o, R^6 y R^7 se toman juntos para formar un grupo carbonilo; R^{6a} y R^{7a} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C_1-C_{12} y alcoxi C_1-C_{12} ; o R^{6a} y R^{7a} se toman juntos para formar un grupo carbonilo;

L es un enlazante divalente como se describe en este documento; y

n, p, r, s y t son cada uno independientemente de 0 o 1.

Como se usa en este documento, se debe entender que el término folato se refiere individualmente tanto al ácido fólico usado en la formación de un conjugado, como alternativamente a un análogo de folato o un derivado del mismo que es capaz de unirse al folato o a los receptores de ácido fólico.

En un aspecto de tales análogos de folato, cuando s es 1, t es 0, y cuando s es 0, t es 1. En otro aspecto de tales análogos de folato, tanto n como r son 1, y el enlazante L^a es un aminoácido natural unido covalentemente a A^2 en su grupo alfa-amino a través de un enlace amida. Los aminoácidos ilustrativos incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, cisteína y similares.

La vitamina puede ser folato que incluye un nitrógeno, y en esta realización, los enlazantes espaciadores pueden ser alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-alquilenesuccinimid-3-ilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en los que cada uno de estos enlazantes espaciados esta opcionalmente sustituido con un sustituyente X^1 , y el enlazante espaciado está unido al nitrógeno del folato para formar una imida o una alquilamida. En esta realización, los sustituyentes X^1 pueden ser alquilo, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, sulfhidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, carboxi, carboxialquilo, guanidinoalquilo, R^4 -carbonilo, R^5 -carbonilalquilo, R^6 -acilamino, y R^7 -acilaminoalquilo, en los que R^4 y R^5 son independientemente seleccionados de aminoácidos, derivados de aminoácidos, y péptidos, y en los que R^6 y R^7 son independientemente seleccionados de aminoácidos, derivados de aminoácidos, y péptidos.

Las realizaciones ilustrativas de análogos y/o derivados de vitaminas también incluyen análogos y derivados de biotina, tales como biocitina, sulfóxido de biotina, oxibiotina y otros compuestos de unión al receptor de biotina, y similares. Se aprecia que los análogos y derivados de las otras vitaminas descritas en este documento también se contemplan en este documento. En una realización, las vitaminas que se pueden usar como ligando de unión (B) en los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento incluyen aquellos que se unen a los receptores de vitaminas expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato, que se une al folato, o un análogo o derivado de los mismos como se describe en este documento.

Además de las vitaminas descritas en este documento, se aprecia que otros ligandos de unión se pueden acoplar con los fármacos y enlazantes descritos y contemplados en este documento para formar conjugados de enlazante ligando de unión-fármaco capaces de facilitar el suministro del fármaco a un objetivo deseado. Estos otros ligandos

de unión, además de las vitaminas y sus análogos y derivados descritos, se pueden usar para formar conjugados de administración de fármacos capaces de unirse a células diana. En general, cualquier ligando de unión (B) de un receptor de superficie celular se puede usar ventajosamente como un ligando diana al que se puede unir un conjugado de fármaco enlazante.

- 5 Otros ligandos ilustrativos descritos en este documento incluyen ligandos peptídicos identificados a partir de cribas de bibliotecas, péptidos específicos de células tumorales, aptámeros específicos de células tumorales, carbohidratos específicos de células tumorales, anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de células tumorales, fragmentos Fab o scFv (esto es, una región variable de cadena sencilla) de anticuerpos tales como, por ejemplo, un fragmento Fab de un anticuerpo dirigido a EphA2 u otras proteínas expresadas específicamente o accesibles de forma única en células de cáncer metastásico, moléculas pequeñas orgánicas derivadas de bibliotecas combinatorias, factores de crecimiento, tales como EGF, FGF, insulina y factores de crecimiento similares a la insulina, y polipéptidos homólogos, somatostatina y sus análogos, transferrina, complejos de lipoproteínas, sales biliares, selectinas, hormonas esteroides, péptidos que contienen Arg-Gly-Asp, retinoides, diversas galectinas, ligandos del receptor opioide δ , ligandos del receptor de la colecistoquinina A, ligandos específicos para los receptores de la angiotensina AT1 o AT2, ligandos λ del receptor activo por el proliferador de peroxisoma, antibióticos β -lactámicos tales como la penicilina, pequeñas moléculas orgánicas que incluyen fármacos antimicrobianos y otras moléculas que se unen específicamente a un receptor expresado de manera preferencial en la superficie de las células tumorales o en un organismo infeccioso, antimicrobianos y otros fármacos diseñados para encajar en el bolsillo de unión de un receptor particular basado en la estructura cristalina del receptor u otra proteína de la superficie celular, ligandos de unión de antígenos tumorales u otras moléculas preferencialmente expresadas en la superficie de las células tumorales, o fragmentos de cualquiera de estas moléculas.

Un ejemplo de un antígeno específico de tumor que podría funcionar como un sitio de unión para un conjugado ligando de unión-fármaco incluye epítopos extracelulares de un miembro de la familia de proteínas Ephrin, tal como EphA2. La expresión de EphA2 está restringida a uniones célula-célula en células normales, pero EphA2 se distribuye por toda la superficie celular en células tumorales metastásicas. De este modo, EphA2 en células metastásicas sería accesible para unirse a, por ejemplo, un fragmento Fab de un anticuerpo conjugado a un fármaco, mientras que la proteína no sería accesible para unirse al fragmento Fab en células normales, dando como resultado un conjugado ligando de unión-fármaco específico para células cancerosas metastásicas.

El enlazante L incluye uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos. Además, se pueden incluir otros enlazantes espaciadores opcionales y/o enlazantes liberables en L. Se aprecia que se pueden incluir enlazantes espaciadores adicionales cuando se seleccionan longitudes predeterminadas para separar el ligando de unión B del agente A. También se aprecia que en ciertas configuraciones, se pueden incluir enlazantes liberables. Por ejemplo, como se describe en este documento en una realización, los conjugados de ligando dirigidos se pueden usar para administrar fármacos para tratar el cáncer u otras enfermedades que implican células patógenas. En tales realizaciones, se aprecia que una vez administrado, el fármaco se libera deseablemente del conjugado. Por ejemplo, en la configuración donde el ligando diana es folato, o un análogo o derivado del mismo, el conjugado se puede unir a un receptor de folato. Una vez unido, el conjugado a menudo experimenta el procedimiento de endocitosis, y el conjugado se administra al interior de la célula. Los mecanismos celulares pueden degradar biológicamente el conjugado para liberar la "carga útil" del fármaco y liberar el compuesto de folato.

En una configuración alternativa, el conjugado dirigido se puede usar en inmunoterapia. En esta configuración, generalmente no se incluye un enlazante liberable. Por ejemplo, los conjugados de folato u otros compuestos de unión al receptor de vitamina e inmunógenos, una vez administrados, se unirán al receptor apropiado y decorarán o marcarán la célula con la carga útil antigénica. En otra configuración alternativa, el conjugado dirigido se puede usar en una terapia de diagnóstico. En esta configuración, un enlazante liberable puede o no estar incluido. Por ejemplo, los conjugados que incluyen agentes de formación de imágenes se pueden administrar a una célula diana usando el ligando de unión al receptor celular apropiado, tal como un folato u otro compuesto de unión al receptor de vitamina. En un aspecto, el conjugado puede permanecer en la superficie de la célula para la formación de imágenes. En otra configuración, el conjugado puede sufrir endocitosis en el interior de la célula. En esta última situación, se puede incluir un enlazante liberable.

De acuerdo con lo anterior, en otros aspectos, los conjugados B-L-A descritos en este documento también incluyen las siguientes fórmulas generales:

B-LS-LH-A

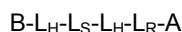
B-LH-LS-A

B-LS-LH-LS-A

55 B-LS-LR-LH-A

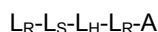
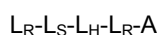
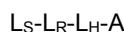
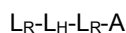
B-LR-LH-LS-A

B-LR-LS-LH-LR-A



en las que B, L y A son como se describen en este documento, y L_R es una sección de enlazante liberable, L_S es una sección de enlazante espaciador, y L_H es una sección de enlazante hidrófilo del enlazante L. Se debe entender que las fórmulas anteriores son meramente ilustrativas, y que otras disposiciones de las secciones del enlazante espaciador hidrófilo, las secciones del enlazante liberables y las secciones del enlazante espaciador se deben incluir en este documento. Además, se debe entender que se contemplan conjugados adicionales que incluyen una pluralidad de enlazantes espaciadores hidrófilos, y/o una pluralidad de enlazantes liberables, y/o una pluralidad de enlazantes espaciadores.

De manera similar, en otras divulgaciones, los conjugados L-A descritos en este documento también incluyen las siguientes fórmulas generales:



en las que L y A son como se describen en este documento, y L_R es una sección de enlazante liberable, L_S es una sección de enlazante espaciador, y L_H es una sección de enlazante hidrófilo de enlazante L. Se debe entender que las fórmulas anteriores son meramente ilustrativas, y que otras disposiciones de las secciones del enlazante espaciador hidrófilo, las secciones del enlazante liberables y las secciones del enlazante espaciador se deben incluir en este documento. Además, se debe entender que se contemplan conjugados adicionales que incluyen una pluralidad de enlazantes espaciadores hidrófilos, y/o una pluralidad de enlazantes liberables, y/o una pluralidad de enlazantes espaciadores.

Se aprecia que la disposición y/u orientación de los diversos enlazantes hidrófilos puede ser de manera lineal o ramificada, o ambos. Por ejemplo, los enlazantes hidrófilos pueden formar el esqueleto del enlazante que forma el conjugado entre el folato y el fármaco, el agente de formación de imágenes o el agente de diagnóstico. Alternativamente, la parte hidrófila del enlazante puede estar suspendida o unida al esqueleto de la cadena de átomos que conecta el ligando de unión B al agente A. En esta última disposición, la parte hidrófila puede ser proximal o distal a la cadena del esqueleto de átomos.

En otra realización, el enlazante es más o menos lineal, y los grupos hidrófilos están dispuestos en gran parte en una serie para formar un enlazante de tipo cadena en el conjugado. Dicho de otra manera, los grupos hidrófilos forman parte o la totalidad del esqueleto del enlazante en esta realización lineal.

En otra realización, el enlazante está ramificado con grupos hidrófilos. En esta realización ramificada, los grupos hidrófilos pueden ser proximales al esqueleto o distales al esqueleto. En cada una de estas disposiciones, el enlazante es de forma más esférica o cilíndrica. En una variación, el enlazante tiene la forma de un cepillo de botella. En un aspecto, el esqueleto del enlazante está formado por una serie lineal de amidas, y la parte hidrófila del enlazante está formada por una disposición paralela de cadenas laterales ramificadas, tal como la conexión de monosacáridos, sulfonatos y similares, y derivados y análogos de los mismos.

Se entiende que el enlazante puede ser neutro o ionizable en ciertas condiciones, tales como las condiciones fisiológicas encontradas in vivo. Para enlazantes ionizables, bajo las condiciones seleccionadas, el enlazante se puede desprotonar para formar un ion negativo, o alternatively protonarse para formar un ion positivo. Se aprecia que puede ocurrir más de un evento de desprotonación o protonación. Además, se entiende que el mismo enlazante se puede desprotonar y protonar para formar sales internas o compuestos zwitteriónicos.

En otra realización, los enlazantes espaciadores hidrófilos son neutros, esto es, en condiciones fisiológicas, los enlazantes no protonan ni desprotonan significativamente. En otra realización, los enlazantes espaciadores hidrófilos se pueden protonar para llevar una o más cargas positivas. Se entiende que la capacidad de protonación depende de la condición. En un aspecto, las condiciones son condiciones fisiológicas, y el enlazante está protonado in vivo.

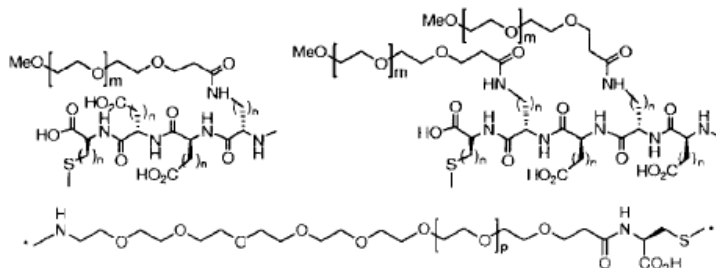
En otra realización, los espaciadores incluyen ambas regiones que son neutras y regiones que se pueden protonar para llevar una o más cargas positivas. En otra realización, los espaciadores incluyen ambas regiones que pueden estar desprotonadas para llevar una o más cargas negativas y regiones que pueden estar protonadas para llevar una o más cargas positivas. Se entiende que en esta última realización se pueden formar zwitteriones o sales internas.

En un aspecto, las regiones de los enlazantes que se pueden desprotonar para llevar una carga negativa incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácido aspártico, ácido glutámico y grupos de ácido carboxílico de cadena más larga, y ésteres de ácido sulfúrico, tales como ésteres alquílicos de ácido sulfúrico. En otro aspecto, las regiones de los enlazantes que pueden estar protonadas para llevar una carga positiva incluyen grupos amino, tales como poliaminoalquilenos que incluyen etilendiaminas, propilendiaminas, butilendiaminas y similares, y/o heterociclos que incluyen pirolidinas, piperidinas, piperazinas y otros grupos amino, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En otra realización, las regiones de los enlazantes que son neutrales incluyen grupos polihidroxilo, tales como azúcares, carbohidratos, sacáridos, inositoles y similares, y/o grupos poliéter, tales como grupos polioxilalquilenos que incluyen polioxietileno, polioxipropileno y similares.

En una realización, los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento incluyen están formados principalmente a partir de carbono, hidrógeno y oxígeno, y tienen una proporción carbono/oxígeno de aproximadamente 3:1 o menos, o de aproximadamente 2:1 o menos. En un aspecto, los enlazantes hidrófilos descritos en este documento incluyen una pluralidad de grupos funcionales éter. En otro aspecto, los enlazantes hidrófilos descritos en este documento incluyen una pluralidad de grupos funcionales hidroxilo. Los fragmentos ilustrativos que se pueden usar para formar tales enlazantes incluyen compuestos polihidroxílicos tales como carbohidratos, compuestos de poliéter tales como unidades de polietilenglicol y grupos ácidos tales como ácidos carboxilo y alquilsulfúrico. En una variación, los espaciadores de oligoamida y similares también se pueden incluir en el enlazante.

Los espaciadores de carbohidratos ilustrativos incluyen sacaropéptidos como se describe en este documento que incluyen tanto una característica peptídica como una característica de azúcar; glucurónidos, que se pueden incorporar a través de ciclación Huisgen [2 + 3], también conocida como química de clic; Los β -alquilglucósidos, tales como las 2-desoxihexapiranasas (2-desoxiglucosa, 2-desoxiglucuronida, y similares), y los β -alquil manopiranosidos. Los grupos de PEG ilustrativos incluyen los de un intervalo de longitud específico desde aproximadamente 4 a aproximadamente 20 grupos de PEG. Los ésteres de ácido alquil sulfúrico ilustrativos también se pueden introducir con la química de clic directamente en el esqueleto. Los espaciadores de oligoamida ilustrativos incluyen espaciadores de EDTA y DTPA, β -aminoácidos, y similares.

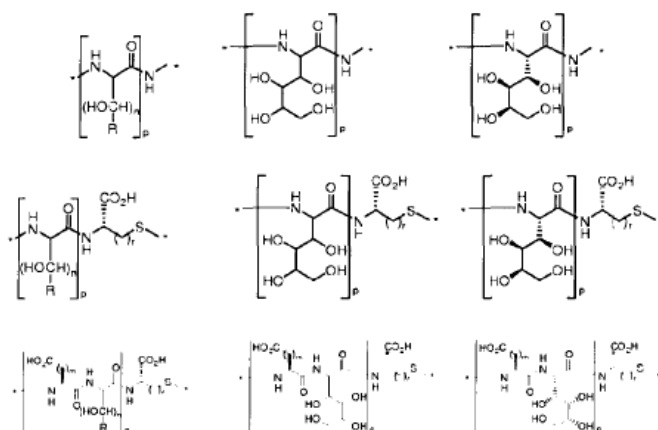
En otra realización, los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento incluyen un poliéter, tal como los enlazantes de las siguientes fórmulas:



en las que m es un número entero seleccionado independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 8; p es un número entero seleccionado de 1 a aproximadamente 10; y n es un número entero seleccionado independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 3. En un aspecto, m es independientemente en cada caso de 1 a aproximadamente 3. En otro aspecto, n es 1 en cada caso. En otro aspecto, p es independientemente en cada caso aproximadamente 4 a aproximadamente 6. Ilustrativamente, los correspondientes poliéteres de polipropileno correspondientes a lo anterior se contemplan en este documento y se pueden incluir en los conjugados como enlazantes espaciadores hidrófilos. Además, se aprecia que los poliéteres mixtos de polietileno y de polipropileno se pueden incluir en los conjugados como enlazantes espaciadores hidrófilos. Además, las variaciones cíclicas de los compuestos de poliéter anteriores, tales como aquellos que incluyen tetrahidrofuranilo, 1,3-dioxanos, 1,4-dioxanos y similares, se contemplan en este documento.

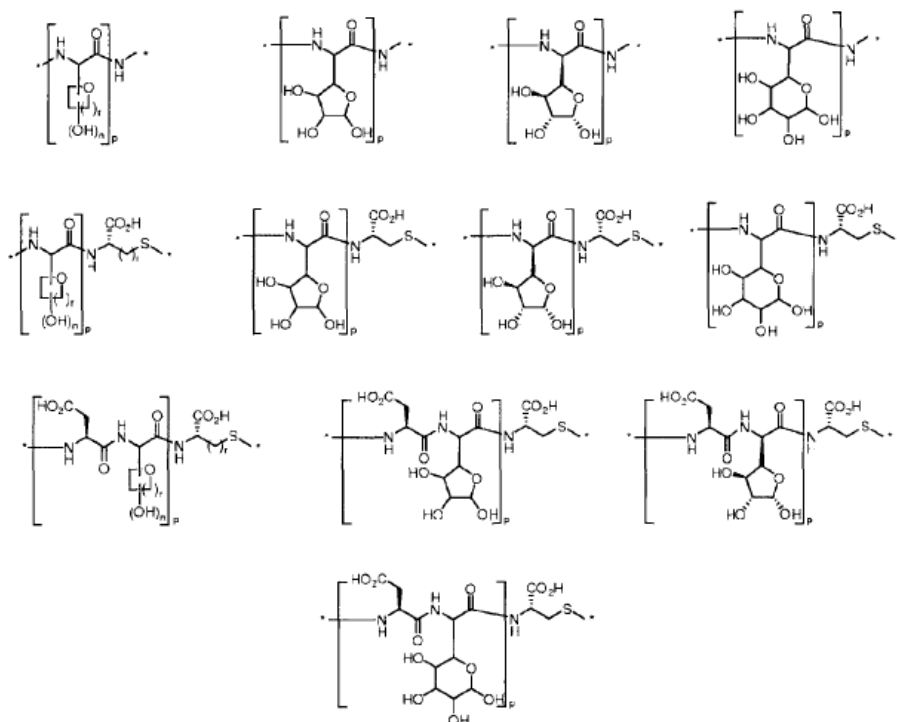
En otra realización ilustrativa, los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento incluyen una pluralidad de grupos funcionales hidroxilo, tales como enlazantes que incorporan monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y similares. Se debe entender que los enlazantes espaciadores que contienen polihidroxilo comprenden una pluralidad de grupos $-(CROH)-$, donde R es hidrógeno o alquilo.

En otra realización, los enlazantes espaciadores incluyen uno o más de los siguientes fragmentos:

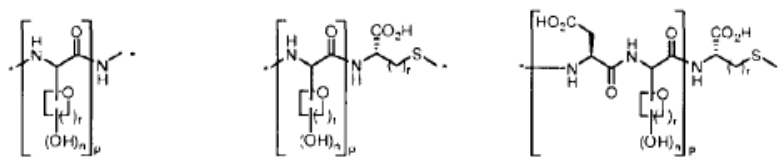


en las que R es H, alquilo, cicloalquilo o arilalquilo; m es un número entero desde 1 a aproximadamente 3; n es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3. En un aspecto, el número entero es 3 o 4. En otro aspecto, el número entero p es 3 o 4. En otro aspecto, el número entero r es 1.

En otra realización, el enlazante espaciador incluye uno o más de los siguientes grupos polihidroxilo cíclicos:

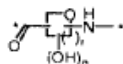


en la que n es un número entero desde 2 a aproximadamente 5, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero desde 1 a aproximadamente 4. En un aspecto, el número entero n es 3 o 4. En otro aspecto, el número entero p es 3 o 4. En otro aspecto, el número entero r es 2 o 3. Se entiende que todas las formas estereoquímicas de tales secciones de los enlazantes se contemplan en este documento. Por ejemplo, en la fórmula anterior, la sección se puede derivar de ribosa, xilosa, glucosa, manosa, galactosa u otro azúcar y conservar las disposiciones estereoquímicas de los grupos hidroxilo y alquilo colgantes presentes en esas moléculas. Además, se debe entender que en las fórmulas anteriores, también se contemplan diversos compuestos desoxi. Ilustrativamente, se contemplan los compuestos de las siguientes fórmulas:

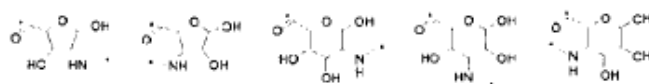


en las que n es igual o menor que r, tal como cuando r es 2 o 3, n es 1 o 2, o 1, 2 o 3, respectivamente.

En otra realización, el enlazante espaciador incluye un compuesto de polihidroxilo de la siguiente fórmula:

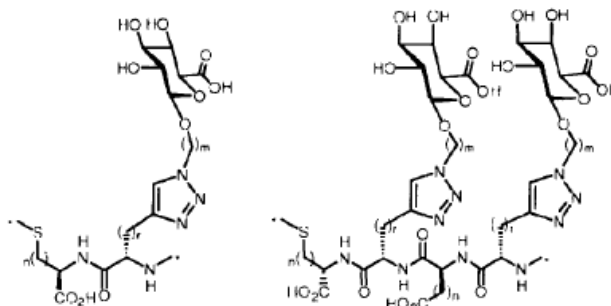


- 5 en la que n y r forman cada uno un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3. En un aspecto, el enlazante espaciador incluye uno o más compuestos de polihidroxilo de las siguientes fórmulas:

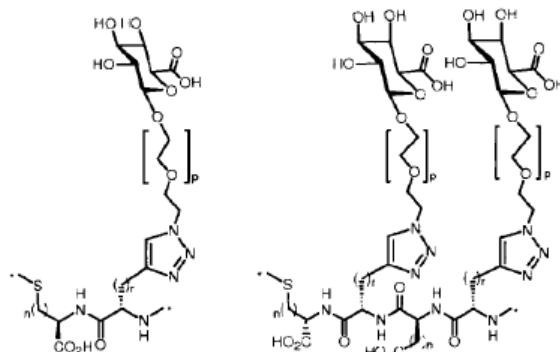


- 10 Se entiende que todas las formas estereoquímicas de tales secciones de los enlazantes se contemplan en este documento. Por ejemplo, en la fórmula anterior, la sección se puede derivar de ribosa, xilosa, glucosa, manosa, galactosa u otro azúcar y conservar las disposiciones estereoquímicas de los grupos hidroxilo y alquilo colgantes presentes en esas moléculas.

- 15 En otra configuración, los enlazantes hidrófilos L descritos en este documento incluyen grupos polihidroxilo que están separados del esqueleto del enlazante. En una realización, tales grupos carbohidrato o grupos polihidroxilo están conectados al esqueleto por un grupo triazol, formando enlazantes espaciadores hidrófilos unidos a triazol. Ilustrativamente, tales enlazantes incluyen fragmentos de las siguientes fórmulas:

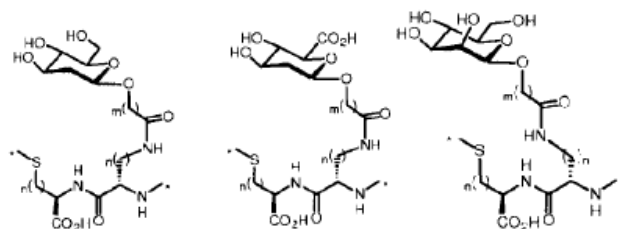


- 20 en las que n, m y r son números enteros y cada uno se selecciona independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 5. En un aspecto ilustrativo, m es independientemente 2 o 3 en cada caso. En otro aspecto, r es 1 en cada caso. En otro aspecto, n es 1 en cada caso. En una variación, el grupo que conecta el grupo polihidroxilo al esqueleto del enlazante es un grupo heteroarilo diferente, que incluye, pero no se limita a, pirrol, pirazol, 1,2,4-triazol, furano, oxazol, isoxazol, tienilo, tiazol, isotiazol, oxadiazol, y similares. De manera similar, se contemplan grupos heteroarilo de anillo de 6 miembros divalentes. Otras variaciones de los enlazantes espaciadores hidrófilos ilustrativos anteriores incluyen grupos oxialquileo, tales como las siguientes fórmulas:

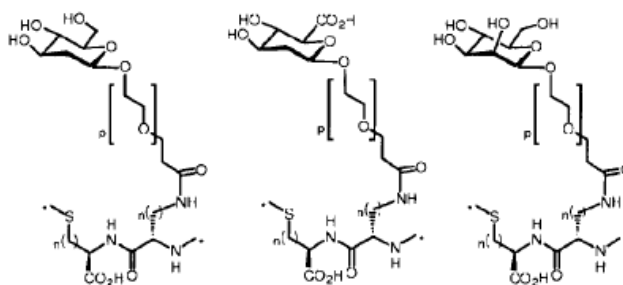


en las que n y r son números enteros y cada uno se selecciona independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 5; y p es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 4.

En otra realización, tales grupos de carbohidratos o grupos polihidroxilo están conectados al esqueleto por un grupo amida, formando enlaces espaciadores hidrófilos unidos a amida. Ilustrativamente, tales enlaces incluyen fragmentos de las siguientes fórmulas:

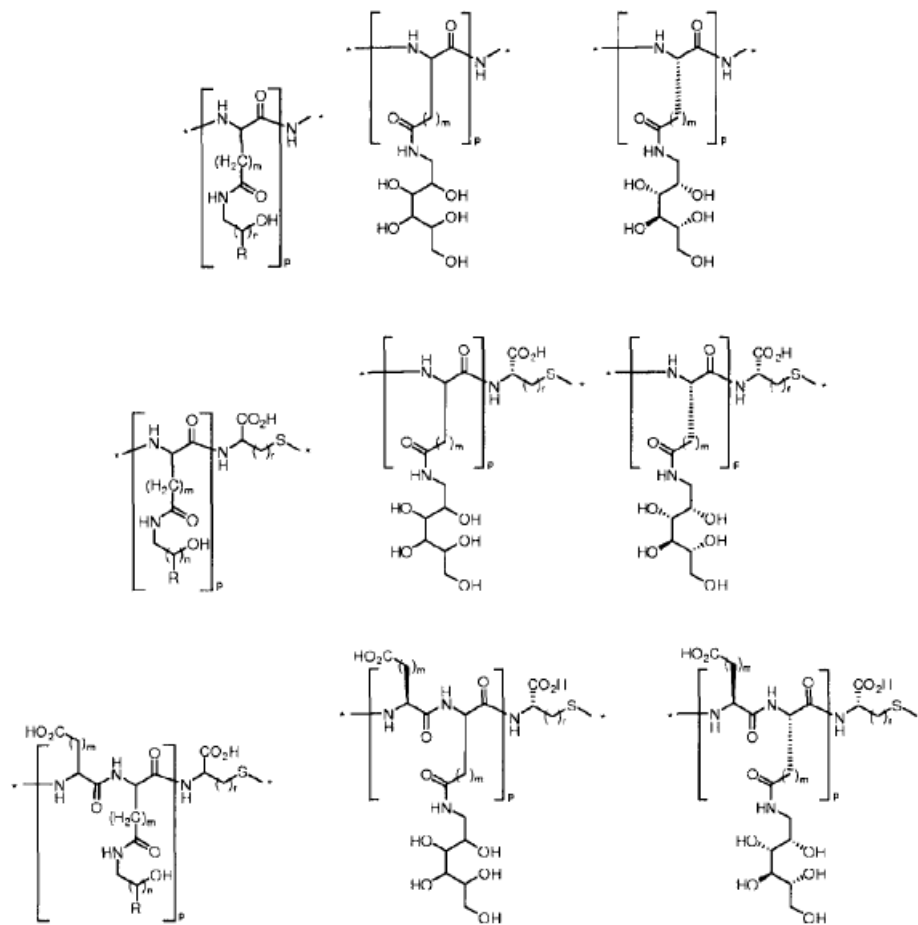


en las que n es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3, y m es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 22. En un aspecto ilustrativo, n es 1 o 2. En otro aspecto ilustrativo, m se selecciona desde aproximadamente 6 a aproximadamente 10, ilustrativamente 8. En una variación, el grupo que conecta el grupo polihidroxilo al esqueleto del enlace es un grupo funcional diferente, que incluye, pero no se limita a, ésteres, ureas, carbamatos, acilhidrazonas y similares. Del mismo modo, se contemplan variaciones cíclicas. Otras variaciones de los enlaces espaciadores hidrófilos ilustrativos anteriores incluyen grupos oxalquilenos, tales como las siguientes fórmulas:



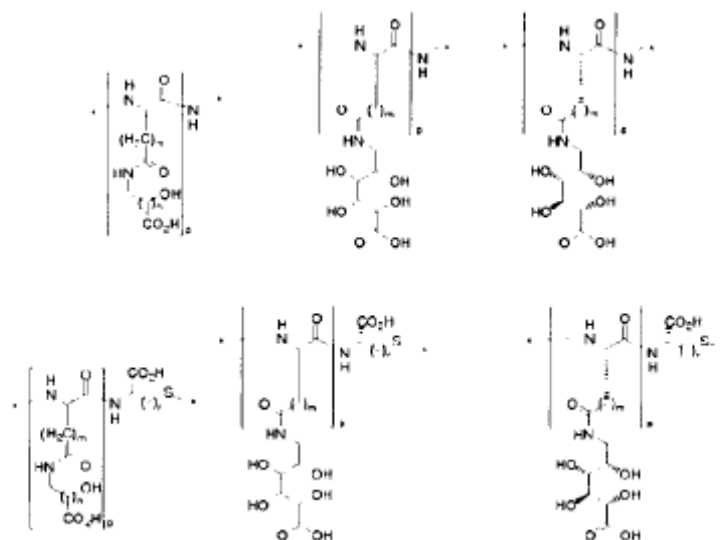
en la que n y r son números enteros y cada uno se selecciona independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 5; y p es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 4.

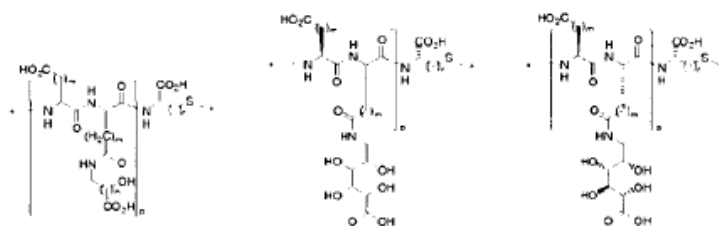
En otra realización, los enlaces espaciadores incluyen uno o más de los siguientes fragmentos:



en los que R es H, alquilo, cicloalquilo o arilalquilo; m es un número entero seleccionado independientemente desde 1 a aproximadamente 3; n es un número entero desde 1 a aproximadamente 6, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3. En una variación, el número entero n es 3 o 4. En otra variación, el número entero p es 3 o 4. En otra variación, el número entero r es 1.

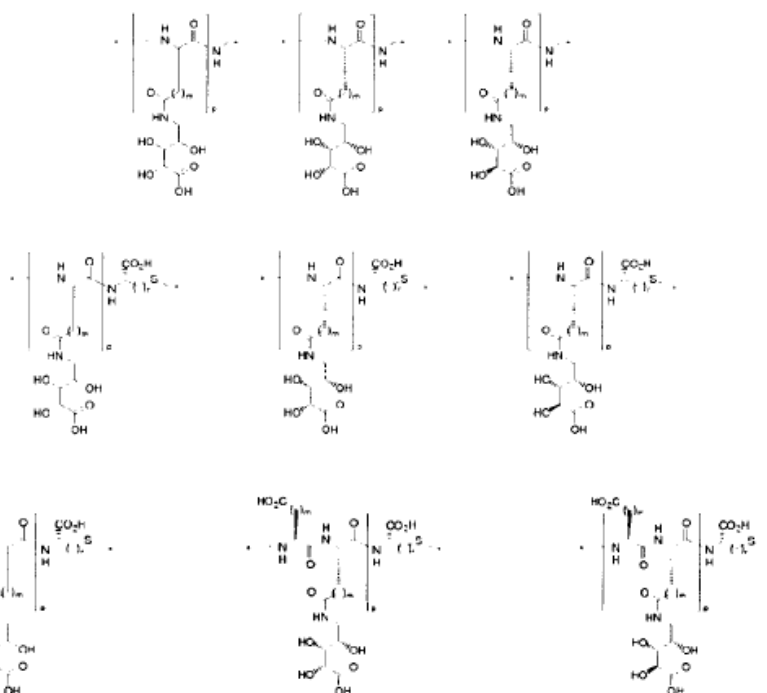
En otra realización, los enlazantes espaciadores incluyen uno o más de los siguientes fragmentos:





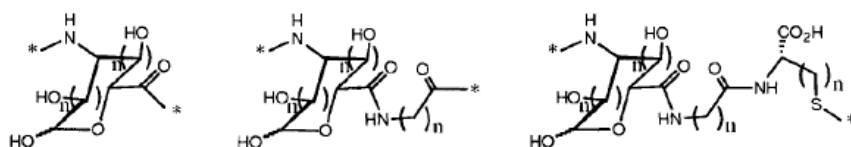
en los que m es un número entero seleccionado independientemente desde 1 a aproximadamente 3; n es un número entero desde 1 a aproximadamente 6, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3. En una variación, el número entero n es 3 o 4. En otra variación, el número entero p es 3 o 4. En otra variación, el número entero r es 1.

En otra realización, los enlaces espaciadores incluyen uno o más de los siguientes fragmentos:



en los que m es un número entero seleccionado independientemente desde 1 a aproximadamente 3; n es un número entero desde 1 a aproximadamente 6, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 3. En una variación, el número entero n es 3 o 4. En otra variación, el número entero p es 3 o 4. En otra variación, el número entero r es 1.

En otra realización, el enlace espaciador hidrófilo es una combinación de esqueletos y motivos laterales de ramificación, tal como se ilustra mediante las siguientes fórmulas.

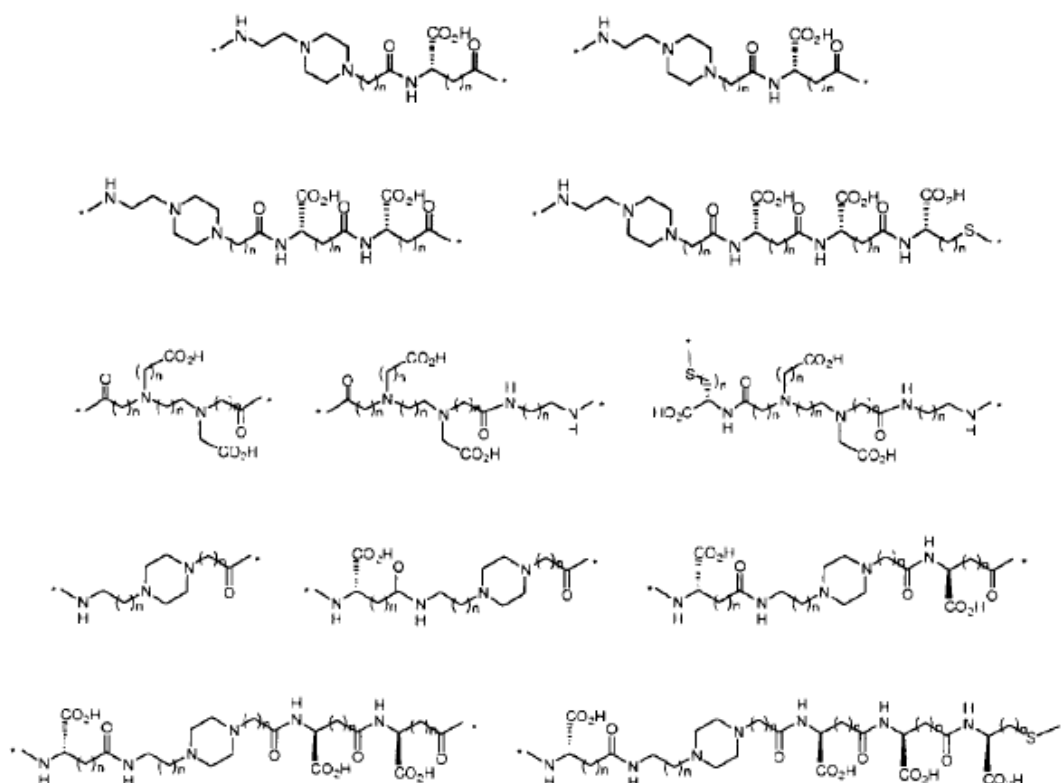


en las que n es un número entero seleccionado independientemente en cada caso desde 0 a aproximadamente 3. Se pretende que las fórmulas anteriores representen 4, 5, 6 e incluso azúcares cíclicos de miembros más grandes. Además, se debe entender que la fórmula anterior se puede modificar para representar azúcares desoxi, en la que uno o más de los grupos hidroxilo presentes en las fórmulas se reemplazan por hidrógeno, alquilo o amino. Además, se debe entender que los compuestos carbonílicos correspondientes se contemplan en las fórmulas anteriores, en las que uno o más de los grupos hidroxilo se oxidan al carbonilo correspondiente. Además, en esta realización ilustrativa, la piranosa incluye grupos funcionales tanto carboxilo como amino y (a) se puede insertar en el esqueleto y (b) se puede proporcionar asas sintéticas para ramificar cadenas laterales en variaciones de esta realización. Cualquiera de los grupos hidroxilo colgantes se puede usar para unir otros fragmentos químicos, incluidos los

azúcares adicionales para preparar los oligosacáridos correspondientes. También se contemplan otras variaciones de esta realización, incluida la inserción de la piranosa u otro azúcar en el esqueleto en un solo carbono, esto es, una disposición de espiro, en un par geminal de carbonos, y disposiciones similares. Por ejemplo, uno o dos extremos del enlazante, o el agente A, o el ligando de unión B pueden estar conectados al azúcar para ser insertado en el esqueleto en una disposición 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 2,3, u otra.

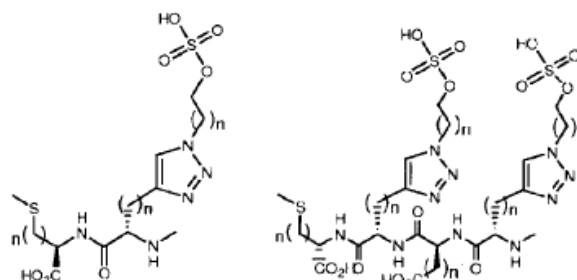
En otra realización, los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento incluyen formados principalmente a partir de carbono, hidrógeno y nitrógeno, y tienen una proporción carbono/nitrógeno de aproximadamente 3: 1 o menos, o de aproximadamente 2: 1 o menos. En un aspecto, los enlazantes hidrófilos descritos en este documento incluyen una pluralidad de grupos funcionales amino.

En otra realización, los enlazantes espaciadores incluyen uno o más grupos amino de las siguientes fórmulas:



en las que n es un entero seleccionado independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 3. En un aspecto, el número entero n es independientemente 1 o 2 en cada caso. En otro aspecto, el número entero n es 1 en cada caso.

En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo es un éster de ácido sulfúrico, tal como un éster de alquilo de ácido sulfúrico. Ilustrativamente, el enlazante espaciador es de la siguiente fórmula:

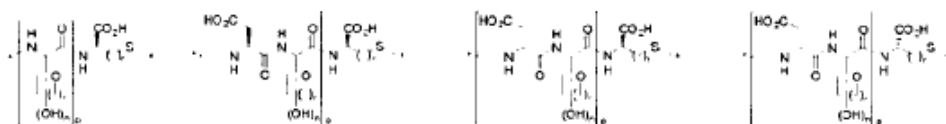


en la que n es un número entero seleccionado independientemente en cada caso desde 1 a aproximadamente 3. Ilustrativamente, n es independientemente 1 o 2 en cada caso.

Se entiende que en tales enlazantes polihidroxilo, poliamino, ácido carboxílico, ácido sulfúrico y similares que incluyen hidrógenos libres unidos a heteroátomos, uno o más de esos átomos de hidrógeno libres se pueden proteger con el grupo protector hidroxilo, amino, o ácido apropiado, respectivamente, o alternatively, se pueden

bloquear como los profármacos correspondientes, los últimos de los cuales se seleccionan para el uso particular, tal como profármacos que liberan el fármaco original en condiciones fisiológicas generales o específicas.

En cada uno de los ejemplos ilustrativos anteriores de enlazantes L, también se incluyen en algunos casos enlazantes espaciadores adicionales L_S, y/o enlazantes liberables L_R adicionales. Los enlazantes espaciadores y los enlazantes liberables también pueden incluir átomos de carbono asimétricos. Se debe entender además que las configuraciones estereoquímicas mostradas en este documento son meramente ilustrativas, y se contemplan otras configuraciones estereoquímicas. Por ejemplo, en una variación, las configuraciones de aminoácidos no naturales correspondientes se pueden incluir en el conjugado descrito en este documento de la siguiente manera:



en las que n es un número entero desde 2 a aproximadamente 5, p es un número entero desde 1 a aproximadamente 5, y r es un número entero desde 1 a aproximadamente 4, como se describe anteriormente.

Se debe entender adicionalmente que en las realizaciones anteriores, las posiciones abiertas, tales como (*) átomos, son ubicaciones para la unión del ligando de unión (B) o el agente (A) que se va a administrar. Además, se debe entender que dicha unión de uno o ambos de B y A puede ser directa o mediante un enlazante intermedio. Los enlazantes que intervienen incluyen otros enlazantes espaciadores y/o enlazantes liberables. Los enlazantes espaciadores adicionales ilustrativos y los enlazantes liberables que se incluyen en el conjugado descrito en este documento se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. de serie 10/765,335.

En una realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o enlazantes que contienen un grupo polihidroxilo. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende al menos tres enlazantes que contienen carbohidratos o que contienen un grupo polihidroxilo. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o enlazantes que contienen un grupo polihidroxilo, y uno o más ácidos aspárticos. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o enlazantes que contienen un grupo polihidroxilo, y uno o más ácidos glutámicos. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o un grupo polihidroxilo, uno o más ácidos glutámicos, uno o más ácidos aspárticos y una o más beta amino alaninas. En una serie de variaciones, en cada una de las realizaciones anteriores, el enlazante espaciador hidrófilo también incluye una o más cisteínas. En otra serie de variaciones, en cada una de las realizaciones anteriores, el enlazante espaciador hidrófilo también incluye al menos una arginina.

En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende una o más 1,4-piperazinas divalentes que están incluidas en la cadena de átomos que conectan al menos uno de los ligandos de unión (B) con al menos uno de los agentes (A). En una variación, el enlazante espaciador hidrófilo incluye uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o que contienen un grupo polihidroxilo. En otra variación, el enlazante espaciador hidrófilo incluye uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o que contienen un grupo polihidroxilo y uno o más ácidos aspárticos. En otra variación, el enlazante espaciador hidrófilo incluye uno o más enlazantes que contienen carbohidratos o que contienen un grupo polihidroxilo y uno o más ácidos glutámicos. En una serie de variaciones, en cada una de las realizaciones anteriores, el enlazante espaciador hidrófilo también incluye una o más cisteínas. En otra serie de variaciones, en cada una de las realizaciones anteriores, el enlazante espaciador hidrófilo también incluye al menos una arginina.

En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más espaciadores hidrófilos de oligoamida, tales como, pero no se limitan a aminoetilpiperazinilacetamida.

En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos unidos a triazol o que contienen grupos polihidroxilo. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más enlazantes que contienen carbohidratos unidos a amida o que contienen grupos polihidroxilo. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más grupos de PEG y una o más cisteínas. En otra realización, el enlazante espaciador hidrófilo comprende uno o más derivados de EDTA.

En otra realización, el enlazante espaciador adicional puede ser 1-alkilensuccinimid-3-ilo, opcionalmente sustituido con un sustituyente X¹, como se define a continuación, y los enlazantes liberables pueden ser metileno, 1-alcóxialquileno, 1-alcóxicalquileno, 1-alcóxialquilencarbonilo, 1-alcóxicalquilencarbonilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación, y en el que el enlazante espaciador y el enlazante liberable están unidos opcionalmente al enlazante espaciador para formar un acetal o cetal succinimida-1-ilalquilo.

Los enlazantes espaciadores adicionales pueden ser carbonilo, tionocarbonilo, alquileno, cicloalquileno, alquilencicloalquilo, alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-alkilensuccinimid-3-ilo, 1-

(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, alquilensulfoxilo, sulfonilalquilo, alquilensulfoxilalquilo, alquilensulfonilalquil, carboniltetrahidro-2H-piranilo, carboniltetrahidro furanilo, 1-(carboniltetrahidro-2H-piranil)succinimid-3-ilo, y 1-(carboniltetrahidrofuranil)succinimid-3-il, en los que cada uno de los enlazantes espaciadores está opcionalmente sustituido con un sustituyente X¹, como se define a continuación. En esta realización, el enlazante espaciador puede incluir un nitrógeno adicional, y los enlazantes espaciadores pueden ser alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en los que cada uno de los enlazantes espaciadores está opcionalmente sustituido con un sustituyente X¹, como se define a continuación, y el enlazante espaciador está unido al nitrógeno para formar una amida. Alternativamente, el enlazante espaciador puede incluir un azufre adicional, y los enlazantes espaciadores pueden ser alquileo y cicloalquileo, en los que cada uno de los enlazantes espaciadores está opcionalmente sustituido con carboxi, y el enlazante espaciador está unido al azufre para formar un tiol. En otra realización, el enlazante espaciador puede incluir azufre, y los enlazantes espaciadores pueden ser 1-alquilensuccinimid-3-ilo y 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, y el enlazante espaciador está unido al azufre para formar un succinimid 3-iltiol.

En una alternativa a las realizaciones descritas anteriormente, el enlazante espaciador adicional puede incluir nitrógeno, y el enlazante liberable puede ser un radical divalente que comprende alquilenaziridin-1-ilo, carbonilalquilaziridin-1-ilo, sulfoxilalquilaziridin-1-ilo, o sulfonilalquilaziridin-1-ilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación. En esta realización alternativa, los enlazantes espaciadores pueden ser carbonilo, tionocarbonilo, alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-(carbonilalquil)succinimid-3-ilo, en los que cada uno de los enlazantes espaciadores está opcionalmente sustituido con un sustituyente X¹, como se define a continuación, y en los que el enlazante espaciador está unido al enlazante liberable para formar una amida de aziridina.

Los sustituyentes X¹ pueden ser alquilo, alcoxi, alcoxilalquilo, hidroxi, hidroxilalquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, halo, haloalquilo, sulfhidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, carboxi, carboxialquilo, carboxilato de alquilo, alcanato de alquilo, guanidinoalquilo, R⁴-carbonilo, R⁵-carbonilalquilo, R⁶-acilamino y R⁷-acilaminoalquilo, en los que R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente entre aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y en los que R⁶ y R⁷ se seleccionan cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos. En esta realización, el enlazante espaciador puede incluir nitrógeno, y el sustituyente X¹ y el enlazante espaciador al que están unidos para formar un heterociclo.

En otra realización, el enlazante liberable puede ser un radical divalente que comprende alquilenaciridin-1-ilo, alquilencarbonilaziridin-1-ilo, carbonilalquilaziridin-1-ilo, alquilensulfoxilaziridin-1-ilo, sulfoxilalkiriridin-1-ilo, sulfonilalquilaziridin-1-ilo, o alquilensulfonilaziridin-1-ilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación.

Los enlazantes liberables ilustrativos adicionales incluyen metileno, 1-alcoxilalquileo, 1-alcoxícicloalquileo, 1-alcoxilalquilencarbonilo, 1-alcoxícicloalquilencarbonilo, carbonilarilcarbonilo, carbonil(carboxiaril)carbonilo, carbonil(biscarboxiaril) carbonilo, haloalquilencarbonilo, alquilen(dialquilsilil), alquilen(alquilarilsilil), alquilen(diarilsilil), (dialquilsilil) arilo, (alquilarilsilil)arilo, (diarilsilil)arilo, oxicarbonilo, oxicarboniloxialquilo, sulfonilo, oxisulfonilalquilo, iminoalquilidenil, carbonilalquilideniminilo, iminocicloalquilidenilo, carbonilcicloalquilideniminilo, alquilentio, alquilenarilitio, y carbonilalquiltio, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación.

En la realización anterior, el enlazante liberable puede incluir oxígeno, y los enlazantes liberables pueden ser metileno, 1-alcoxilalquileo, 1-alcoxícicloalquileo, 1-alcoxilalquilencarbonilo y 1-alcoxícicloalquilencarbonilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación, y el enlazante liberable se une al oxígeno para formar un acetal o cetal. Alternativamente, el enlazante liberable puede incluir oxígeno, y el enlazante liberable puede ser metileno, en el que el metileno está sustituido con un arilo opcionalmente sustituido, y el enlazante liberable está unido al oxígeno para formar un acetal o cetal. Además, el enlazante liberable puede incluir oxígeno, y el enlazante liberable puede ser sulfonilalquilo, y el enlazante liberable está unido al oxígeno para formar un alquilsulfonato.

En otra realización de la anterior realización del enlazante liberable, el enlazante liberable puede incluir nitrógeno, y los enlazantes liberables pueden ser iminoalquilidenilo, carbonilalquilideniminilo, iminocicloalquilidenilo, y carbonilcicloalquilideniminilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², que se define a continuación, y el enlazante liberable se une al nitrógeno para formar una hidrazona. En una configuración alternativa, la hidrazona se puede acilar con un derivado de ácido carboxílico, un derivado de ortoformiato o un derivado de carbamoilo para formar diversos enlazantes liberables de acilhidrazona.

Como alternativa, el enlazante liberable puede incluir oxígeno, y los enlaces liberables pueden ser alquilen(dialquilsilil), alquilen(alquilarilsilil), alquilen(diarilsilil), (dialquilsilil)arilo, (alquilarilsilil)arilo, y (diarilsilil)arilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², como se define a continuación, y el enlazante liberable se une al oxígeno para formar un silanol.

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

- 5 En la realización del enlazante liberable anterior, el fármaco puede incluir un átomo de oxígeno, el enlazante liberable puede incluir nitrógeno, y los enlazantes liberables pueden ser carbonilarilcarbonilo, carbonil(carboxiaril)carbonilo, carbonil(biscarboxiaril) carbonilo, y el enlazante liberable puede formar una amida, y también se une al oxígeno del fármaco para formar un éster. Los sustituyentes X² pueden ser alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, hidroxil, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, halo, haloalquilo, sulfhidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, carboxi, carboxialquilo, alquil carboxilato, alquil alcanoato, guanidinoalquilo, R⁴-carbonilo, R⁵-carbonilalquilo, R⁶-acilamino, y R⁷-acilaminoalquilo, en los que R⁴ y R⁵ son cada uno seleccionados independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y en los que R⁶ y R⁷ son cada uno seleccionados independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos. En esta realización, el enlazante liberable puede incluir nitrógeno, y el sustituyente X² y el enlazante liberable pueden formar un heterociclo.

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

- 20 El agente A puede incluir un átomo de nitrógeno, y el enlazante liberable puede ser haloalquilencarbonilo, opcionalmente sustituido con un sustituyente X², y el enlazante liberable está unido al nitrógeno del fármaco para formar una amida.

El agente A puede incluir un átomo de oxígeno, y el enlazante liberable puede ser haloalquilencarbonilo, opcionalmente sustituido con un sustituyente X², y el enlazante liberable está unido al oxígeno del fármaco para formar un éster.

- 25 El agente A puede incluir un átomo de nitrógeno con enlace doble, y en esta realización, los enlazantes liberables pueden ser alquilencarbonilamino y 1- (alquilencarbonilamino) succinimid-3-ilo, y el enlazante liberable se puede unir al nitrógeno del fármaco para formar una hidrazona.

El agente A puede incluir un átomo de azufre, y en esta realización, los enlazantes liberables pueden ser alquilentio y carbonilalquiltio, y el enlazante liberable se puede unir al azufre del fármaco para formar un disulfuro.

- 30 El agente A puede ser una mitomicina, un derivado de mitomicina o un análogo de mitomicina y, en esta realización, los enlazantes liberables pueden ser carbonilalquiltio, carboniltetrahydro-2H-piraniilo, carboniltetrahydrofuranilo, 1-(carboniltetrahydro- 2H-piraniil)succinimid-3-ilo, y 1-(carboniltetrahydrofuranil)succinimid-3-ilo, en los que cada uno de los enlazantes liberables está opcionalmente sustituido con un sustituyente X², y en los que la aziridina de la mitomicina está unida al enlazante liberable para formar una acilaziridina.

- 35 El ligando de unión B puede ser folato que incluye un nitrógeno, y en esta realización, los enlazantes espaciadores pueden ser alquilencarbonilo, cicloalquilencarbonilo, carbonilalquilcarbonilo, 1-alquilensuccinimid-3-ilo, 1-(carbonilalquil)succinimid- 3-ilo, en los que cada uno de los enlazantes espaciadores está opcionalmente sustituido con un sustituyente X¹, y el enlazante espaciador está unido al nitrógeno de folato para formar una imida o una alquilamida. En esta realización, los sustituyentes X¹ pueden ser alquilo, hidroxialquilo, amino, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, sulfhidrilalquilo, alquiltioalquilo, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, carboxi, carboxialquilo, guanidinoalquilo, R⁴-carbonilo, R⁵-carbonilalquilo, R⁶-acilamino, y R⁷-acilaminoalquilo, en los que R⁴ y R⁵ se seleccionan cada uno independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos, y en los que R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente de aminoácidos, derivados de aminoácidos y péptidos.

- 45 El término cicloalquileo, como se usa en este documento, se refiere a una cadena bivalente de átomos de carbono, una parte de la cual forma un anillo, tal como cicloprop-1,1-diilo, cicloprop-1,2-diilo, ciclohex-1,4- diilo, 3-etilciclopent-1,2-diilo, 1-metilciclohex-4-ilo, y similares.

- 50 El término heterociclo, como se usa en este documento, se refiere a una cadena monovalente de carbono y heteroátomos, en la que los heteroátomos se seleccionan de nitrógeno, oxígeno y azufre, una parte del cual, incluyendo al menos un heteroátomo, forma un anillo, como aziridina., pirrolidina, oxazolidina, 3-metoxipirrolidina, 3-metilpiperazina y similares.

El término arilo, como se usa en este documento, se refiere a un anillo aromático mono o policíclico de átomos de carbono, tal como fenilo, naftilo, y similares. Además, el arilo también puede incluir heteroarilo.

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

El término opcionalmente sustituido como se usa en este documento se refiere al reemplazo de uno o más átomos de hidrógeno, generalmente en carbono, con un número correspondiente de sustituyentes, tales como halo, hidroxilo, amino, alquilo o dialquilamino, alcoxi, alquilsulfonilo, ciano, nitro, y similares. Además, dos hidrógenos en el mismo carbono, en los carbonos adyacentes o cercanos se pueden reemplazar con un sustituyente bivalente para formar la estructura cíclica correspondiente.

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

El término aminoácido como se usa en este documento se refiere en general a aminoalquilcarboxilato, en el que el radical alquilo está opcionalmente sustituido, tal como con alquilo, hidroxilo alquilo, sulfhidrilalquilo, aminoalquilo, carboxialquilo, y similares, incluyendo grupos correspondientes a los aminoácidos de origen natural, tales como serina, cisteína, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico y similares. Se debe entender que tales aminoácidos pueden ser de una sola estereoquímica o una mezcla particular de estereoquímicas, incluyendo mezclas racémicas. Además, los aminoácidos se refieren a beta, gamma y aminoácidos más largos, tales como los aminoácidos de fórmula:



en la que R es hidrógeno, alquilo, acilo o un grupo protector de nitrógeno apropiado, R' y R'' son hidrógeno o un sustituyente, cada uno de los cuales se selecciona independientemente en cada aparición, y q es un número entero tal como 1, 2, 3, 4, o 5. Ilustrativamente, R' y/o R'' se corresponden independientemente, pero no se limitan a, hidrógeno o las cadenas laterales presentes en los aminoácidos de origen natural, tales como metilo, bencilo, hidroximetilo, tiometilo, carboxilo, carboxilmetilo, guanidinopropilo, y similares, y derivados y derivados protegidos de los mismos. La fórmula descrita anteriormente incluye todas las variaciones estereoisoméricas. Por ejemplo, el aminoácido se puede seleccionar de asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, arginina, serina, ornitina, treonina y similares. En otro aspecto ilustrativo del intermediario conjugado de administración de fármaco de unión al receptor de vitamina descrito en este documento, el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, incluye un nucleófilo alquiltiol.

Se debe entender que los términos descritos anteriormente se pueden combinar para generar grupos químicamente relevantes, tales como alcoxialquilo que se refiere a metiloximetilo, etiloxietilo y similares, haloalcoxialquilo que se refiere a trifluorometiloxietilo, 1,2-difluoro-2-cloroet-1-iloxipropilo, y similares, arilalquilo que se refiere a bencilo, fenetilo, α -metilbencilo y similares, y otros.

El término derivado de aminoácido como se usa en este documento se refiere en general a un aminoalquilcarboxilato opcionalmente sustituido, en el que el grupo amino y/o el grupo carboxilato están cada uno opcionalmente sustituidos, tal como con alquilo, carboxialquilo, alquilamino y similares, o protegidos opcionalmente. Además, el fragmento de alquilo divalente que participa opcionalmente sustituido puede incluir grupos adicionales, tales como grupos protectores, y similares.

El término péptido, como se usa en este documento, se refiere en general a una serie de aminoácidos y/o análogos de aminoácidos y derivados unidos covalentemente entre sí por enlaces amida.

El término "enlazante liberable" como se usa en este documento se refiere a un enlazante que incluye al menos un enlace que puede romperse en condiciones fisiológicas (por ejemplo, un enlace de pH lábil, ácido lábil, oxidativamente lábil o enzima lábil). Debería apreciarse que tales condiciones fisiológicas que resultan en la ruptura del enlace incluyen reacciones de hidrólisis química estándar que ocurren, por ejemplo, a pH fisiológico, o como resultado de la compartimentación en un orgánulo celular tal como un endosoma que tiene un pH más bajo que el pH citosólico.

El enlace o enlaces escindibles pueden estar presentes en el interior de un enlazante escindible y/o en uno o ambos extremos de un enlazante escindible. Se aprecia que la flexibilidad del enlace escindible puede ajustarse incluyendo grupos o fragmentos funcionales dentro del enlazante polivalente L que pueden ayudar o facilitar dicha ruptura del enlace, también denominada asistencia anquimérica. Además, se aprecia que se pueden incluir grupos o fragmentos funcionales adicionales dentro del enlazante polivalente L que pueden ayudar o facilitar la fragmentación adicional de los conjugados de agente ligando de unión al receptor después de la ruptura del enlace del enlazante liberable. La labilidad del enlace escindible se puede ajustar, por ejemplo, mediante cambios sustitutivos en o cerca del enlace escindible, tal como incluir una ramificación alfa adyacente a un enlace disulfuro escindible, aumentando la hidrofobicidad de los sustituyentes en silicio en una unidad estructural que tiene un enlace de silicio-oxígeno que puede tener grupos alcoxi, hidrolizados, homologados que forman parte de un cetalo o acetal que puede ser hidrolizado, y similares.

Se entiende que un enlace escindible puede conectar dos átomos adyacentes dentro del enlazante liberable y/o conectar otros enlazantes o V y/o D, como se describe en este documento, en uno o ambos extremos del enlazante

liberable. En el caso de que un enlace escindible conecte dos átomos adyacentes dentro del enlazante liberable, después de la rotura del enlace, el enlazante liberable se rompe en dos o más fragmentos. Alternativamente, en el caso en que un enlace escindible esté entre el enlazante liberable y otra unidad estructural, tal como un heteroátomo adicional, un enlazante espaciador adicional, otro enlazante liberable, el agente A, o un análogo o derivado del mismo, o el ligando de unión B, o el análogo o un derivado del mismo, después de la rotura del enlace, el enlazante liberable se separa de la otra unidad estructural.

Se entiende que cada uno de los espaciadores adicionales y los enlazantes liberables son bivalentes. Se debe entender además que la conectividad entre cada uno de los diversos espaciadores adicionales y los mismos enlazantes liberables, y entre los diversos espaciadores adicionales y los enlazantes liberables y A y/o B, como se definen en este documento, puede ocurrir en cualquier átomo encontrado en los diversos espaciadores adicionales o enlazantes liberables.

En un aspecto de los diversos conjugados de administración de fármacos de unión al receptor descritos en este documento, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquiloximetiloxi, cuando el metilo está opcionalmente sustituido con alquilo o arilo sustituido.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilo, en el que el carbonilo forma una acilaziridina con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 1-alcoxícicloalquilenoxi.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar un carboxilato de alquilenaminocarbonil(dicarboxilarileno).

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar ditioalquilcarbonilhidrazida, en el que la hidrazida forma una hidrazona con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilhidrazida, en el que la hidrazida forma una hidrazona con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-tioalquilsulfonilalquilo (sililo disustituido) oxí, en el que el sililo disustituido está sustituido con alquilo o arilo opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende una pluralidad de enlazantes espaciadores adicionales seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos de origen natural y los estereoisómeros de los mismos.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbonato con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbonato con el agente A, o un análogo o derivado del mismo, y el arilo está opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-tiosuccinimid-1-ilalquioxialquioxialquilideno, en el que el alquilideno forma una hidrazona con el agente A, o un análogo o derivado del mismo, cada alquilo se selecciona de forma independiente, y el oxialquiloxi está opcionalmente sustituido con alquilo o arilo opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilhidrazida.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilamino, en el que el amino forma una amida viníloga con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilamino, en el que el amino forma una amida viníloga con el agente A, o un análogo o derivado del mismo, y el alquilo es etilo.

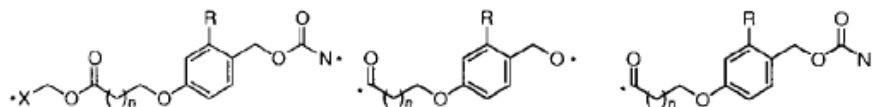
En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilaminocarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

5 En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquilaminocarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato con el agente A, o un análogo o derivado del mismo, y el alquilo es etilo.

En otro aspecto, el enlazante polivalente comprende un enlazante liberable, un enlazante espaciador adicional y un enlazante liberable tomados juntos para formar 3-ditioalquiloxicarbonilo, en el que el carbonilo forma un carbamato o una carbamoilaziridina con el agente A, o un análogo o derivado del mismo.

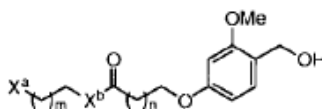
10 En otra realización, el enlazante polivalente (L) incluye un enlazante liberable de disulfuro. En otra realización, el enlazante polivalente (L) incluye al menos un enlazante liberable que no es un enlazante liberable de disulfuro.

En un aspecto, los enlazantes liberables y espaciadores se pueden disponer de tal manera que después de la escisión de un enlace en el enlazante polivalente, los grupos funcionales liberados ayuden químicamente a la rotura o escisión de enlaces adicionales, también denominados escisión con asistencia anquimérica o rotura. Una
15 realización ilustrativa de dicho enlazante polivalente o parte del mismo incluye compuestos que tienen las fórmulas:



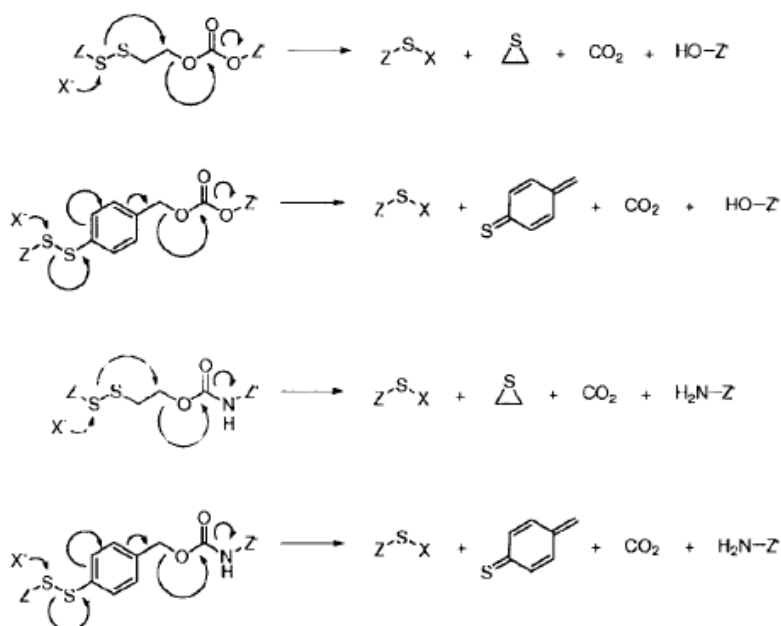
en las que X es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre, o un grupo carbonilo; n es un número entero seleccionado de 0 a 4; ilustrativamente 2; R es hidrógeno, o un sustituyente, que incluye un sustituyente capaz de estabilizar inductivamente una carga positiva o por resonancia en el anillo arilo, tal como alcoxi y similares, incluido el metoxi; y el símbolo (*) indica puntos de unión para un espaciador adicional, heteroátomo o enlazantes liberables
20 que forman el enlazante polivalente, o alternativamente para la unión del fármaco, o análogo o derivado del mismo, o la vitamina, o análogo o derivado del mismo. En una realización, n es 2 y R es metoxi. Se aprecia que otros sustituyentes pueden estar presentes en el anillo arilo, el carbono bencílico, el ácido alcanoico o el puente de metileno, incluidos, pero no se limitan a, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, halo y similares. La escisión asistida puede incluir mecanismos que impliquen intermedios de bencilo, intermedios de bencina, ciclación de lactona, intermedios de oxonio, eliminación beta y similares. Adicionalmente, se aprecia que, además de la fragmentación posterior a la
25 escisión del enlazante liberable, la escisión inicial del enlazante liberable se puede facilitar mediante un mecanismo asistido de forma anquimérica.

Los ejemplos ilustrativos de intermedios útiles en la formación de tales enlazantes incluyen:



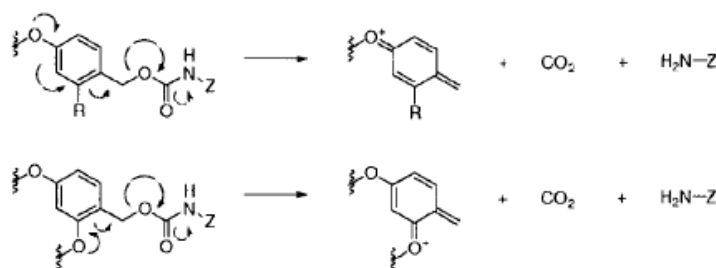
30 en la que X^a es un grupo electrófilo tal como maleimida, vinil sulfona, derivados de ácido carboxílico activo, y similares, X^b es NH, O o S; y m y n son cada uno números enteros seleccionados independientemente de 0-4. En una variación, m y n son cada uno números enteros seleccionados independientemente de 0-2. Tales intermedios se pueden acoplar a fármacos, ligandos de unión u otros enlazantes a través del ataque nucleofílico en el grupo electrofílico X^a, y/o formando éteres o derivados de ácido carboxílico. En una realización, el grupo hidroxilo bencílico se convierte en el correspondiente compuesto benciloxicarbonilo activo con fosgeno o un equivalente de fosgeno. Esta realización se puede acoplar a fármacos, ligandos de unión u otros enlazantes a través del ataque nucleófilo en el grupo carbonilo activo.

40 Los mecanismos ilustrativos para la escisión de los enlazantes bivalentes descritos en este documento incluyen los siguientes mecanismos de fragmentación 1,4 y 1,6



en los que X es un nucleófilo, glutatión o agente biorreductor exógeno o endógeno, y similares, y cualquiera de Z o Z' es la vitamina, o análogo o derivado del mismo, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o una vitamina o unidad estructural de fármaco junto con otras partes del enlazante polivalente. Se debe entender que aunque los mecanismos de fragmentación anteriores se representan como mecanismos concertados, puede tener lugar cualquier número de etapas discretas para efectuar la fragmentación final del enlazante polivalente a los productos finales mostrados. Por ejemplo, se aprecia que la escisión del enlace también puede producirse mediante la eliminación catalizada por ácido de la unidad estructural de carbamato, que puede ser asistida de forma anquímica mediante la estabilización proporcionada por ya sea el grupo arilo del azufre beta o disulfuro ilustrado en los ejemplos anteriores. En esas variaciones de esta realización, el enlazante liberable es la unidad estructural de carbamato. Alternativamente, la fragmentación se puede iniciar por un ataque nucleófilo en el grupo disulfuro, haciendo que la escisión forme un tiolato. El tiolato puede desplazar intermolecularmente un ácido carbónico o una unidad estructural ácido carbámico y formar el correspondiente tiaciclopropano. En el caso de los enlazantes polivalentes que contienen bencilo, después de una ruptura ilustrativa del enlace disulfuro, el fenilo tiolato resultante puede fragmentarse adicionalmente para liberar una unidad estructural de ácido carbónico o ácido carbámico formando un intermedio estabilizado por resonancia. En cualquiera de estos casos, la naturaleza liberable de los enlazantes polivalentes ilustrativos descritos en este documento puede realizarse mediante cualquier mecanismo que pueda ser relevante para las condiciones químicas, metabólicas, fisiológicas o biológicas presentes.

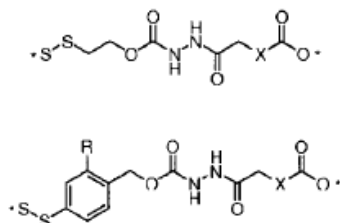
Otros mecanismos ilustrativos para la escisión del enlace del enlazante liberable incluyen la escisión asistida por oxonio como sigue:



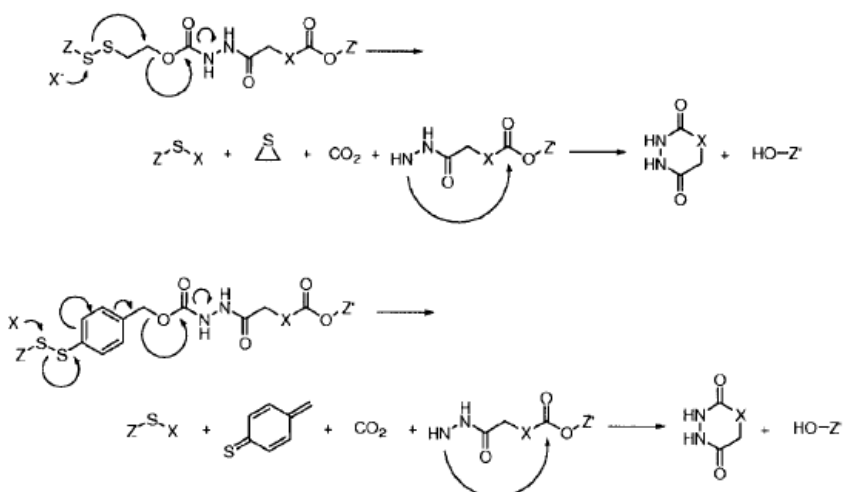
en los que Z es la vitamina, o análogo o derivado de la misma, o el fármaco, o análogo o derivado de la misma, o cada uno es una unidad estructural de vitamina o fármaco junto con otras partes del enlazante polivalente, tal como una unidad estructural de vitamina o fármaco que incluye uno o más enlazantes espaciadores y/u otros enlazantes liberables. Sin pretender imponer ninguna teoría, en esta realización, la catálisis ácida, tal como en un endosoma, puede iniciar la escisión a través de la protonación del grupo uretano. Además, la eliminación del carbamato

catalizada por ácido conduce a la liberación de CO₂ y la unidad estructural que contiene nitrógeno unido a Z, y la formación de un catión bencilo, que puede ser atrapado por el agua, o cualquier otra base de Lewis.

Otros enlaces ilustrativos incluyen compuestos de las fórmulas:

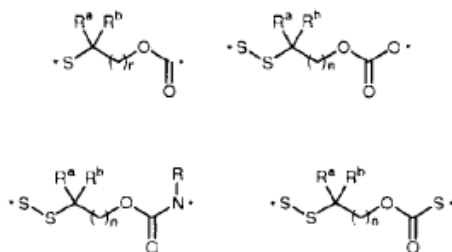


- 5 en las que X es NH, CH₂ u O; R es hidrógeno, o un sustituyente, que incluye un sustituyente capaz de estabilizar inductivamente una carga positiva o por resonancia en el anillo arilo, tal como alcoxi y similares, incluido el metoxi; y el símbolo (*) indica puntos de unión para un espaciador, heteroátomo o enlaces liberables adicionales que forman el enlace polivalente, o alternatively para la unión del fármaco, o análogo o derivado del mismo, o la vitamina, o análogo o derivado del mismo.
- 10 Los mecanismos ilustrativos para la escisión de tales enlaces polivalentes descritos en este documento incluyen los siguientes mecanismos de fragmentación 1,4 y 1,6 seguidos de la escisión asistida de forma anquimérica de la Z' acilada a través de la ciclación por el grupo hidrazida:



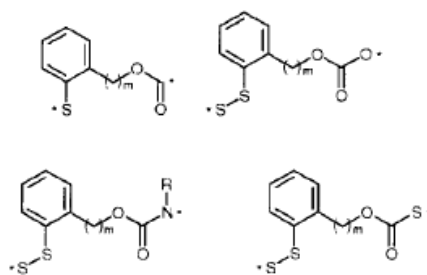
- 15 en los que X es un nucleófilo, glutatión o agente biorreductor exógeno o endógeno, y similares, y cualquiera de Z o Z' es la vitamina, o análogo o derivado del mismo, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o una vitamina o unidad estructural de fármaco junto con otras partes del enlace polivalente. Se debe entender que aunque los mecanismos de fragmentación anteriores se representan como mecanismos concertados, puede tener lugar cualquier número de etapas discretas para efectuar la fragmentación final del enlace polivalente a los productos finales mostrados. Por ejemplo, se aprecia que la escisión del enlace también puede producirse mediante la eliminación catalizada por ácido de la unidad estructural de carbamato, que puede ser asistida de forma anquimérica mediante la estabilización proporcionada por el grupo arilo del azufre beta o disulfuro ilustrado en los ejemplos anteriores. En esas variaciones de esta realización, el enlace liberable es la unidad estructural de carbamato. Alternativamente, la fragmentación se puede iniciar por un ataque nucleófilo en el grupo disulfuro, haciendo que la escisión forme un tiolato. El tiolato puede desplazar intermolecularmente una unidad estructural de ácido carbónico o ácido carbámico y formar el correspondiente tiaciclopropano. En el caso de los enlaces polivalentes que contienen bencilo, después de una ruptura ilustrativa del enlace disulfuro, el fenilo tiolato resultante se puede fragmentar adicionalmente para liberar una unidad estructural de ácido carbónico o ácido carbámico formando un intermedio estabilizado por resonancia. En cualquiera de estos casos, la naturaleza liberable de los enlaces polivalentes ilustrativos descritos en este documento se puede realizar mediante cualquier mecanismo que pueda ser relevante para las condiciones químicas, metabólicas, fisiológicas o biológicas presentes. Sin pretender imponer ninguna teoría, en esta realización, la catálisis ácida, tal como en un endosoma, también puede iniciar la escisión a través de la protonación del grupo uretano. Además, la eliminación del carbamato catalizada por ácido conduce a la liberación de CO₂ y la unidad estructural que contiene nitrógeno unido a Z, y la formación de un catión bencilo, que puede ser atrapado por el agua, o cualquier otra base de Lewis, como se describe de manera similar en este documento.

En una realización, los enlazantes polivalentes descritos en este documento son compuestos de las siguientes fórmulas



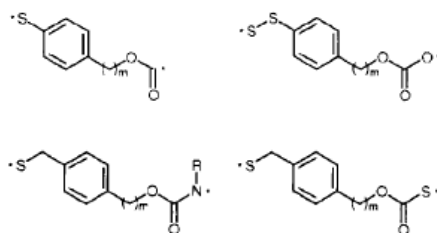
- 5 en las que n es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 4; R^a y R^b se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, incluyendo alquilo inferior tal como alquilo C₁-C₄ que están opcionalmente ramificados; o R^a y R^b se toman junto con el átomo de carbono unido para formar un anillo carbocíclico; R es un grupo alquilo opcionalmente sustituido, un grupo acilo opcionalmente sustituido o un grupo protector de nitrógeno adecuadamente seleccionado; y (*) indica puntos de unión para el fármaco, vitamina, agente de formación de imágenes, agente de diagnóstico, otros enlazantes polivalentes u otras partes del conjugado.

- 10 En otra realización, los enlazantes polivalentes descritos en este documento incluyen compuestos de las siguientes fórmulas



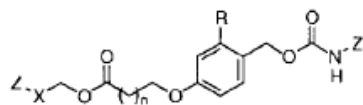
- 15 en las que m es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 4; R es un grupo alquilo opcionalmente sustituido, un grupo acilo opcionalmente sustituido o un grupo protector de nitrógeno adecuadamente seleccionado; y (*) indica puntos de unión para el fármaco, vitamina, agente de formación de imágenes, agente de diagnóstico, otros enlazantes polivalentes u otras partes del conjugado.

En otra realización, los enlazantes polivalentes descritos en este documento incluyen compuestos de las siguientes fórmulas



- 20 en las que m es un número entero seleccionado desde 1 a aproximadamente 4; R es un grupo alquilo opcionalmente sustituido, un grupo acilo opcionalmente sustituido o un grupo protector de nitrógeno adecuadamente seleccionado; y (*) indica puntos de unión para el fármaco, vitamina, agente de formación de imágenes, agente de diagnóstico, otros enlazantes polivalentes u otras partes del conjugado.

- 25 Otro mecanismo ilustrativo implica una disposición de los enlazantes liberables y espaciadores de tal manera que luego de la escisión de un enlace en el enlazante polivalente, los grupos funcionales liberados ayudan químicamente a la ruptura o escisión de enlaces adicionales, también denominados escisión con asistencia anquimérica o rotura. Una realización ilustrativa de dicho enlazante polivalente o parte del mismo incluye compuestos que tienen la fórmula:

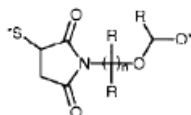


en la que X es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre, n es un número entero seleccionado desde 0, 1, 2 y 3, R es hidrógeno, o un sustituyente, que incluye un sustituyente capaz de estabilizar una carga positiva de forma inductiva o resonancia en el anillo de arilo, tal como alcoxi, y similares, y cualquiera de Z o Z' es la vitamina, o su análogo o derivado, o el fármaco, o análogo o derivado del mismo, o una vitamina o unidad estructural de fármaco junto con otras partes del enlazante polivalente. Se aprecia que pueden estar presentes otros sustituyentes en el anillo arilo, el carbono bencílico, el nitrógeno del carbamato, el ácido alcanoico o el puente de metileno, incluyendo, pero no limitando a, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, halo y similares. La escisión asistida puede incluir mecanismos que impliquen intermedios de bencilo, intermedios de bencina, ciclación de lactona, intermedios de oxonio, eliminación beta y similares. Se aprecia además que, además de la fragmentación posterior a la escisión del enlazante liberable, la escisión inicial del enlazante liberable puede ser facilitada por un mecanismo asistido de forma anquimérica.

En esta realización, el ácido hidroxialcanoico, que puede ciclarse, facilita la escisión del puente de metileno, mediante por ejemplo, un ion oxonio, y facilita la escisión del enlace o la posterior fragmentación después de la escisión del enlace del enlazante liberable. Alternativamente, la escisión asistida por iones de oxonio catalizada por ácido del puente de metileno puede comenzar una cascada de fragmentación de este ilustrativo enlazante polivalente, o fragmento del mismo. Alternativamente, la hidrólisis del carbamato catalizada por ácido puede facilitar la eliminación beta del ácido hidroxialcanoico, que puede ciclarse, y facilitar la escisión del puente de metileno, por ejemplo, por un ion oxonio. Se aprecia que otros mecanismos químicos de rotura o escisión de enlaces bajo las condiciones metabólicas, fisiológicas o celulares descritas en este documento pueden iniciar dicha cascada de fragmentación. Se aprecia que otros mecanismos químicos de rotura o escisión de enlaces bajo las condiciones metabólicas, fisiológicas o celulares descritas en este documento pueden iniciar dicha cascada de fragmentación.

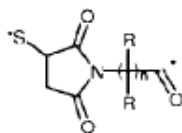
Otra realización ilustrativa de los enlazantes descritos en este documento, incluye enlazantes liberables que se escinden en las condiciones descritas en este documento por un mecanismo químico que implica la eliminación beta. En un aspecto, tales enlazantes liberables incluyen ácidos carboxílicos sustituidos con beta-tio, beta-hidroxilo y beta-amino y derivados de los mismos, tales como ésteres, amidas, carbonatos, carbamatos y ureas. En otro aspecto, tales enlazantes liberables incluyen 2- y 4-tioarilésteres, carbamatos y carbonatos.

En otra realización, el enlazante polivalente incluye enlazantes espaciadores adicionales y enlazantes liberables conectados para formar un grupo polivalente de 3-tiosuccinimid-1-ilalquilximetiloxi, ilustrado por la siguiente fórmula



en la que n es un número entero desde 1 a 6, el grupo alquilo está opcionalmente sustituido y el metilo está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo adicional o un grupo arilo opcionalmente sustituido, cada uno de los cuales está representado por un grupo R seleccionado independientemente. Los símbolos (*) indican puntos de unión del fragmento de enlazante polivalente a otras partes de los conjugados descritos en este documento.

En otra realización, el enlazante polivalente incluye enlazantes espaciadores adicionales y enlazantes liberables conectados para formar un grupo polivalente de 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilo, ilustrado por la siguiente fórmula



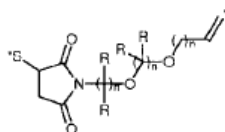
en la que n es un número entero de 1 a 6, y el grupo alquilo está opcionalmente sustituido. Los símbolos (*) indican puntos de unión del fragmento del enlazante polivalente a otras partes de los conjugados descritos en este documento. En otra realización, el enlazante polivalente incluye enlazantes espaciadores y enlazantes liberables conectados para formar un grupo polivalente 3-tioalquilsulfonilalquilo (sililo disustituido) oxi, en el que el sililo disustituido está sustituido con grupos alquilo y/o arilo opcionalmente sustituidos.

En otra realización, el enlazante polivalente incluye enlazantes espaciadores adicionales y enlazantes liberables conectados para formar un grupo polivalente ditioalquilcarbonilhidrazida, o un 3-tiosuccinimid-1-ilalquilcarbonilhidrazida polivalente, ilustrado por las siguientes fórmulas



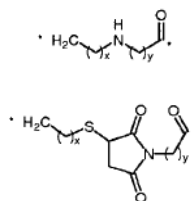
en las que n es un número entero desde 1 a 6, el grupo alquilo está opcionalmente sustituido y la hidrazida forma una hidrazona con (B), (D) u otra parte del enlazante polivalente (L). Los símbolos (*) indican puntos de unión del fragmento de enlazante polivalente a otras partes de los conjugados descritos en este documento.

- 5 En otra realización, el enlazante polivalente incluye enlazantes espaciadores adicionales y enlazantes liberables conectados para formar un grupo polivalente de 3-tiosuccinimid-1-ilalquiloxialquiloxialquilideno, ilustrado por la siguiente fórmula



- 10 en la que cada n es un número entero seleccionado independientemente desde 1 a 6, cada grupo alquilo se selecciona independientemente y está opcionalmente sustituido, tal como con alquilo o arilo opcionalmente sustituido, y en la que el alquilideno forma una hidrazona con (B), (D), u otra parte del enlazante polivalente (L). Los símbolos (*) indican puntos de unión del fragmento del enlazante polivalente a otras partes de los conjugados descritos en este documento.

- Los enlaces espaciadores adicionales ilustrativos adicionales incluyen alquilen - amino - alquilencarbonilo, alquilen- tio-carbonilalquilsuccinimid-3-ilo, y similares, como se ilustra adicionalmente mediante las siguientes fórmulas:



en las que los números enteros x e y son 1, 2, 3, 4 o 5:

- 20 En otra realización ilustrativa, el enlazante incluye uno o más aminoácidos. En una variación, el enlazante incluye un solo aminoácido. En otra variación, el enlazante incluye un péptido que tiene desde 2 a aproximadamente 50, 2 a aproximadamente 30, o 2 a aproximadamente 20 aminoácidos. En otra variación, el enlazante incluye un péptido que tiene desde aproximadamente 4 a aproximadamente 8 aminoácidos. Tales aminoácidos se seleccionan ilustrativamente de los aminoácidos de origen natural, o estereoisómeros de los mismos. El aminoácido también puede ser cualquier otro aminoácido, tal como cualquier aminoácido que tenga la fórmula general:

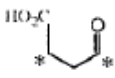
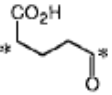
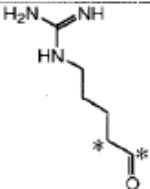
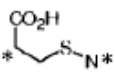
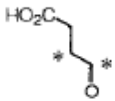
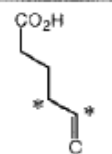
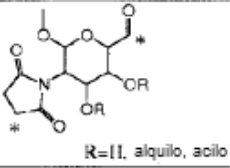
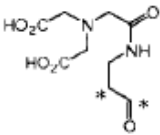
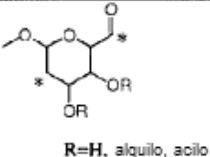
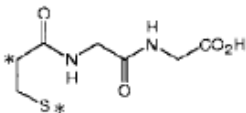
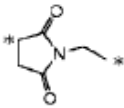
- 25 $-N(R)-(CR'R'')_q-C(O)-$

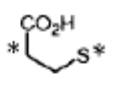
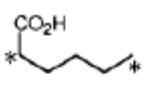
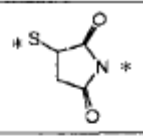
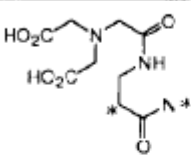
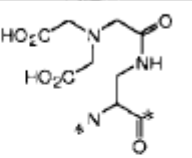
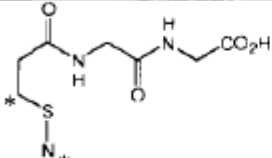
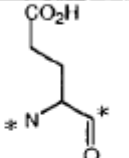
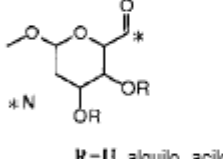
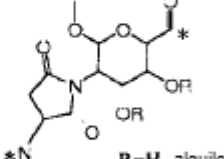
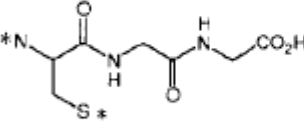
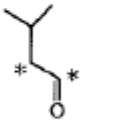
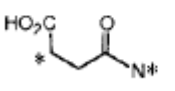
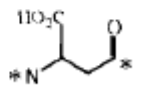
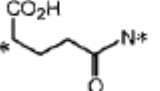
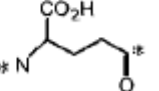
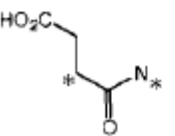
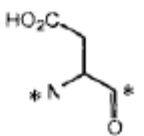
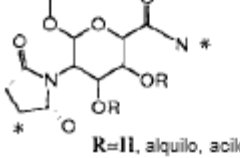
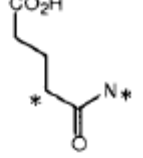
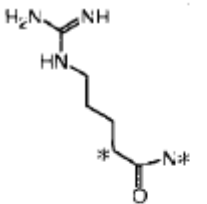
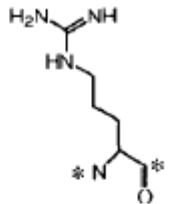
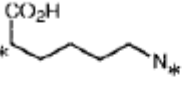
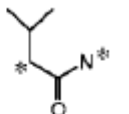
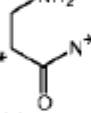
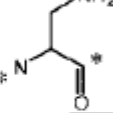
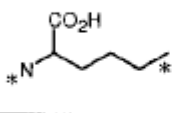
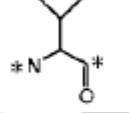
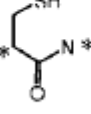
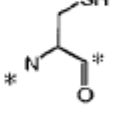
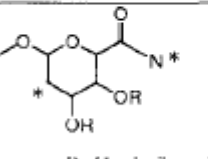
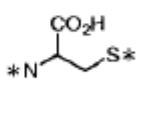
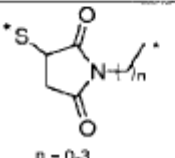
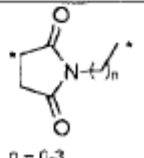
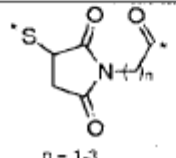
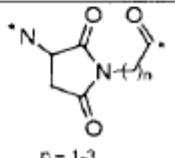
en la que R es hidrógeno, alquilo, acilo o un grupo protector de nitrógeno apropiado, R' y R'' son hidrógeno o un sustituyente, cada uno de los cuales se selecciona independientemente en cada aparición, y q es un número entero tal como 1, 2, 3, 4, o 5. Ilustrativamente, R' y/o R'' se corresponden independientemente, pero no se limitan a, hidrógeno o las cadenas laterales presentes en aminoácidos de origen natural, tales como metilo, bencilo, hidroximetilo, tiometilo, carboxilo, carboxilmetilo, guanidinopropilo, y similares, y derivados y derivados protegidos de los mismos. La fórmula descrita anteriormente incluye todas las variaciones estereoisoméricas. Por ejemplo, el aminoácido se puede seleccionar de asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, arginina, serina, ornitina, treonina y similares. En una variación, el enlazante liberable incluye al menos 2 aminoácidos seleccionados de asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, arginina, serina, ornitina y treonina. En otra variación, el enlazante liberable incluye entre 2 y aproximadamente 5 aminoácidos seleccionados de asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, arginina, serina, ornitina y treonina. En otra variación, el enlazante liberable incluye un tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido o hexapéptido que consiste en aminoácidos seleccionados desde ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, lisina, arginina y ornitina, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto ilustrativo del intermediario conjugado de administración de fármaco de unión al receptor de vitamina descrito en este documento, el fármaco, o un análogo o un derivado del mismo, incluye un nucleófilo alquiltiol.

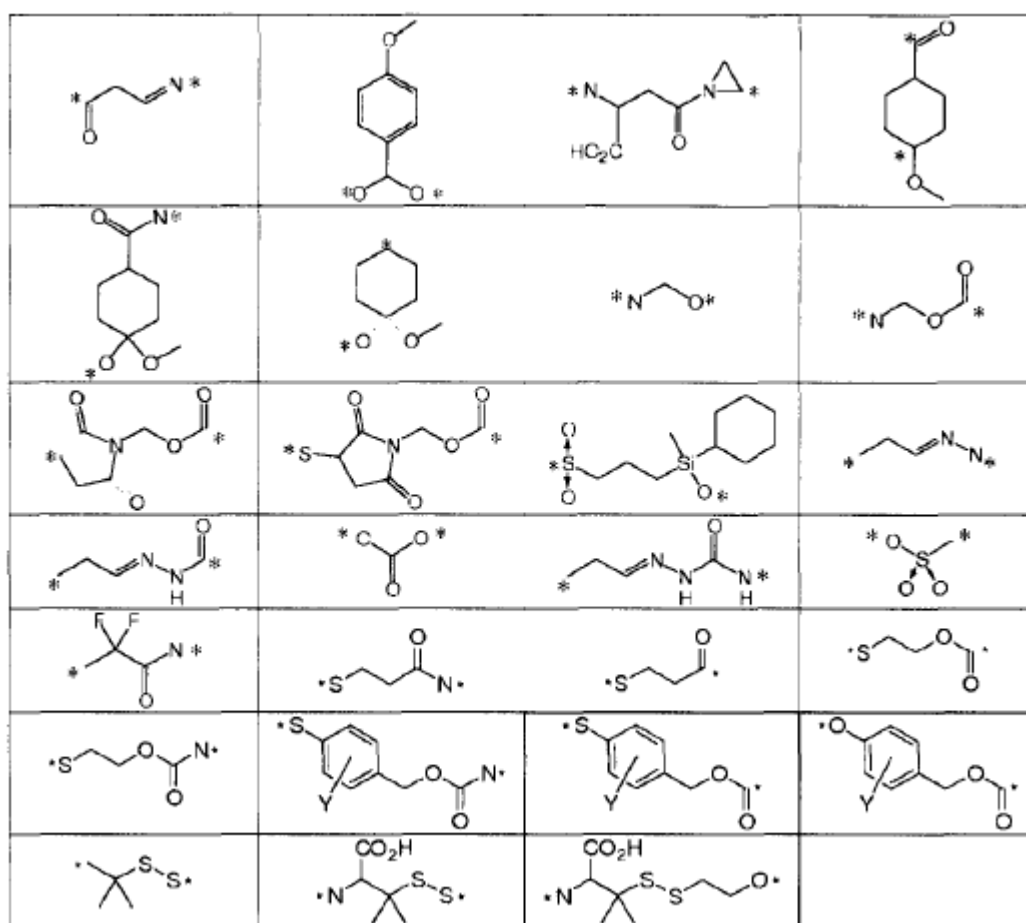
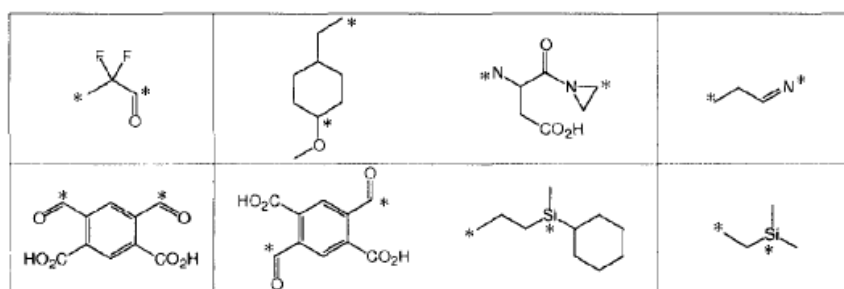
5 Los enlazantes adicionales se describen en las siguientes tablas, en las que el átomo (*) es el punto de unión de los enlazantes espaciadores adicionales o liberables, el fármaco y/o el ligando de unión.

Se describen los siguientes enlazantes espaciadores ilustrativos.

			
			
 R=H, alquilo, acilo	 R=H, alquilo, acilo		
			
		 R=H, alquilo, acilo	
			
			
		 R=H, alquilo, acilo	
 n = 0-3	 n = 0-3	 n = 1-3	 n = 1-3

Se describen los siguientes enlazantes liberables ilustrativos.



Se aprecia que tales enlazantes hidrófilos pueden alterar la estabilidad, el metabolismo y la distribución tisular de los conjugados, especialmente en comparación con otras formas de conjugados tales como las formas basadas en peptídicos descritas en la Patente de los Estados Unidos No. US 7,601,332. Por ejemplo, se entiende que en ciertas situaciones, las interacciones carbohidrato-proteína son más débiles que las interacciones péptido-proteína. De este modo, se aprecia que en diversas realizaciones descritas en este documento, los conjugados pueden conducir a una menor unión de las proteínas séricas. Estas y otras diferencias fisicoquímicas entre los conjugados descritos en este documento y otros ya informados pueden incluir un direccionamiento mejorado a las células diana y perfiles de biodistribución mejorados, esto es, más selectivos o diferencialmente selectivos. El aumento de la citotoxicidad puede ser una consecuencia natural de la disminución de la unión a proteínas séricas o la biodistribución mejor o diferencial (esto es, se desperdicia menos fármaco en compartimentos no específicos). Esto es especialmente cierto para el uso de espaciadores hidrófilos pero neutros. Sin pretender imponer ninguna teoría, también se sugiere que los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento pueden disminuir la toxicidad que podría deberse, al menos en parte, a interacciones de unión no específicas.

En una realización alternativa, el fármaco está unido a un enlazante espaciador hidrófilo, directa o indirectamente, para lograr el objetivo de disminuir la eliminación hepático. Se ha encontrado en este documento que la unión de grupos hidrófilos, ya sea liberables o no, y más específicamente grupos neutros hidrófilos, incrementa la administración específica de riñón.

Se ha observado que la eliminación hepática de conjugados de folato-fármaco que poseen enlazantes disulfuro y espaciadores peptídicos retiene perfiles de toxicidad residual y algunas veces sustanciales desfavorables. Incluyendo los espaciadores hidrófilos descritos en este documento también se introdujeron vectores para el suministro específico de riñón. Por lo tanto, se aprecia que la inclusión de dichos enlazantes en conjugados de fármacos dirigidos puede disminuir la absorción general del hígado y, en consecuencia, disminuir la toxicidad general. Sin pretender imponer ninguna teoría, se aprecia que la toxicidad en la MTD, tal como la de los conjugados alcaloides de la vinca, puede deberse a una eliminación hepática no específica, lo que lleva al metabolismo, a la liberación del fármaco libre, tal como la DAVLBH, a la bilis y luego al intestino. La toxicidad local, así como la toxicidad sistémica (debido a la reabsorción) luego pueden ocurrir. Al incluir enlazantes hidrófilos en los conjugados dirigidos y no dirigidos descritos en este documento, se cree que la eliminación a través del riñón puede ocurrir preferencialmente, disminuyendo y/o evitando de este modo la toxicidad concomitante basada en el metabolismo hepático. De acuerdo con lo anterior, se puede usar la medición de la eliminación biliar total del componente del fármaco, tal como DAVLBH, de una serie de conjugados de folato y fármaco, para predecir qué agente sería el menos tóxico.

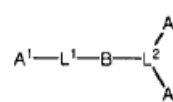
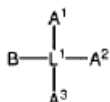
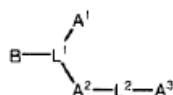
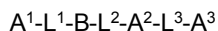
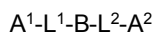
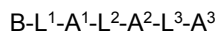
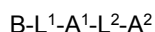
Como se describió anteriormente, los conjugados descritos en este documento se pueden usar para administrar agentes diana A las células de una manera selectiva o específica. En un aspecto de tal administración, también pueden evitarse mecanismos de eliminación no deseados. Se ha descubierto que los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento cuando se usan para formar conjugados de ligandos de unión al receptor B y agentes A, pueden disminuir la cantidad de eliminación por el hígado. Además, se ha descubierto que estos enlazantes espaciadores hidrófilos tienden a favorecer la eliminación a lo largo de las vías renales, tal como el riñón. Además, se ha descubierto que los conjugados descritos en este documento presentan una toxicidad menor que los agentes originales A por sí mismos cuando se administran de la misma manera. Sin pretender imponer ninguna teoría, se sugiere que la menor toxicidad se debe a la disminución observada en el mecanismo de eliminación hepática en favor de los mecanismos de eliminación renal.

En otra realización, se describen que los compuestos en este documento tienen una absorción reducida por el hígado y es menos probable que sean eliminados por el hígado. En un aspecto, tales compuestos se eliminan preferencialmente mediante los procedimientos renales en comparación con los procedimientos hepáticos. De acuerdo con lo anterior, en otra divulgación, los compuestos no dirigidos de la siguiente fórmula se describen en este documento:

L-A

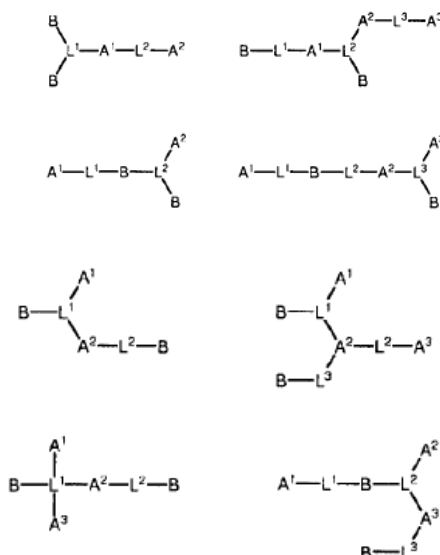
en la que L es un espaciador hidrófilo y A es un agente de diagnóstico, terapéutico o de formación de imágenes. Se aprecia que tales compuestos no dirigidos, aunque no se dirigen usando un ligando de unión B al receptor, pueden, sin embargo, exhibir una toxicidad disminuida que el agente original A cuando se administran de la misma manera. Los compuestos no dirigidos, como los conjugados dirigidos descritos anteriormente, incluyen el espaciador hidrófilo L. Por lo tanto, el agente que no llega a la célula tratada de forma deseable se eliminará mediante rutas metabólicas y biológicas ordinarias. Sin embargo, se aprecia que la presencia del espaciador hidrófilo L dirigirá la eliminación a través de vías renales en lugar de vías hepáticas.

En otra realización, los conjugados de multifármaco en este documento se describen. Varias configuraciones ilustrativas de tales conjugados de multifármaco se contemplan en este documento, e incluyen los compuestos y composiciones descritos en la Publicación Internacional PCT No. WO 2007/022494. Ilustrativamente, los enlazantes polivalentes pueden conectar el ligando de unión al receptor B a los dos o más agentes A en una variedad de configuraciones estructurales, que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes fórmulas generales ilustrativas:



en las que B es el ligando de unión al receptor, cada uno de (L^1), (L^2) y (L^3) es un enlazante polivalente como se describe en este documento que comprende un enlazante espaciador hidrófilo, y opcionalmente incluye uno o más enlazantes liberables y/o enlazantes espaciadores adicionales, y cada uno de (A^1), (A^2) y (A^3) es un agente A, o un análogo o derivado del mismo. Otras variaciones, que incluyen agentes adicionales A, o análogos o derivados de los mismos, enlazantes adicionales y configuraciones adicionales de la disposición de cada uno de (B), (L) y (A), también se contemplan en este documento.

En una variación, se incluye más de un ligando de unión B al receptor en los conjugados de administración descritos en este documento, incluyendo, pero no limitando a, las siguientes fórmulas generales ilustrativas:



en las que cada B es un ligando de unión al receptor, cada uno de (L^1), (L^2) y (L^3) es un enlazante polivalente como se describe en este documento que comprende un enlazante espaciador hidrófilo, y opcionalmente incluye uno o más enlazantes liberables y/o enlazantes espaciadores adicionales y cada uno de (A^1), (A^2) y (A^3) es un agente A, o un análogo o derivado del mismo. Otras variaciones, que incluyen agentes adicionales A, o análogos o derivados de los mismos, enlazantes adicionales y configuraciones adicionales de la disposición de cada uno de (B), (L) y (A), también se contemplan en este documento. En una variación, los ligandos de unión al receptor B son ligandos para el mismo receptor, y en otra variación, los ligandos de unión al receptor B son ligandos para diferentes receptores.

En otra realización ilustrativa, los fármacos se seleccionan basándose en la actividad frente a una o más poblaciones de células patógenas con un mecanismo de acción particular. Los mecanismos ilustrativos de acción incluyen agentes alquilantes, inhibidores de microtúbulos, incluidos los que estabilizan y/o desestabilizan la formación de microtúbulos, incluidos agentes de beta-tubulina, inhibidores de la quinasa dependiente de la ciclina (CDK), inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la proteína quinasa, incluidos los Ras, Raf, PKC, PI3K, e inhibidores similares, inhibidores de la transcripción, antifolatos, bloqueadores de proteínas de choque térmico, y similares.

Los agentes alquilantes ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, mitomicinas CBI, y similares. Los inhibidores ilustrativos de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) incluyen, pero no se limitan a, CYC202, seliciclib, R-roscovitina, AGM-1470, y similares. Los inhibidores ilustrativos de la topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, otras antraciclinas y similares. Los inhibidores ilustrativos de la síntesis de proteínas incluyen, pero no se limitan a, bruceantina, y similares. Los inhibidores ilustrativos de la proteína quinasa, incluidos los inhibidores de Ras, Raf, PKC, PI3K y similares, incluyen, pero no se limitan a, L-779,450, R115777 y similares. Los inhibidores ilustrativos de la transcripción incluyen, pero no se limitan a, α -amanatina, actinomicina y similares. Los antifolatos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, metotrexato y similares. Los bloqueadores de proteínas de choque térmico ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, geldanamicina y similares.

Inhibidores ilustrativos de microtúbulos, incluyendo aquellos que estabilizan y/o desestabilizan la formación de microtúbulos, incluyendo agentes de β -tubutina, venenos de microtúbulos, y similares. Los venenos de microtúbulos ilustrativos que se unen a receptores seleccionados incluyen, pero no se limitan a, inhibidores que se unen al sitio de unión de la vinca, tales como arenastatina, dolastatina, halicondrina B, maitansina, fomopsina A, rizoxina, ustiloxina, vinblastina, vincristina y similares, estabilizantes de unión al sitio de unión a taxol tal como discodermalida, epotilona, taxol, paclitaxol y similares, inhibidores de la unión al sitio de unión a colchicina tales como colchicina, combretastatina, curacina A, podofilotoxina, esteganacina y similares, y otros que se unen a sitios no definidos tales como criptoficina, tubulisinas y similares.

En una realización, la tubulisina es una tubulisina natural. En otra realización, la tubulisina es una tubulisina sintética o semisintética. La tubulisina adicional que se puede incluir en los conjugados descritos en este documento se describe en la Publicación Internacional PCT No. WO 2008/112873.

5 En una realización de los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento, al menos uno de los fármacos es un inhibidor de microtúbulos, o un análogo o derivado de los mismos. En otra realización, al menos uno de los fármacos es un agente de alquilación de ADN. En otra realización, al menos uno de los fármacos es un agente de alquilación de ADN, y al menos otro de los fármacos es un inhibidor de microtúbulos.

10 En otra realización de los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento, al menos uno de los fármacos es un inhibidor de la P-glicoproteína (PGP). En otra realización, al menos uno de los fármacos incluidos en los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento es un inhibidor de PGP, y al menos otro de los fármacos incluidos en los conjugados de administración de fármacos es un sustrato de PGP. Ilustrativamente en esta última realización, el sustrato de PGP es un agente alquilante de ADN. Con referencia a esta realización, se aprecia que el emparejamiento de un inhibidor de PGP con un sustrato de PGP, tal como un agente alquilante de ADN que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las mitomicinas como la mitomicina C, la mitomicina A y similares, puede mejorar el rendimiento general del fármaco que de otro modo es un sustrato PGP. En los conjugados liberables descritos en este documento, el fármaco inhibidor de PGP y el fármaco sustrato de PGP se liberan en la célula después de la endocitosis. De esa manera, el fármaco inhibidor de PGP puede mejorar la eficacia y/o la potencia global del fármaco sustrato de PGP. Además, el inhibidor de PGP puede reducir la expresión de PGP, lo que a su vez disminuirá el flujo de salida de uno o más de los fármacos incluidos en los conjugados de multifármaco descritos en este documento de la célula patógena. Se aprecia que las mitomicinas, o análogos o derivados de las mismas, tales como la mitomicina C, pueden operar como un inhibidor de la PGP, o un regulador descendente de la PGP. Se aprecia además que el alcaloide de la vinca, o análogo o derivado del mismo, tal como los análogos y derivados de vinblastina, puede ser un sustrato de PGP que está protegido del flujo de salida de la célula patógena por el inhibidor o regulador descendente de PGP.

25 En otra realización de los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento, al menos uno de los fármacos es un alcaloide de la vinca, o un análogo o derivado del mismo. Los alcaloides de la vinca descritos en este documento incluyen todos los miembros de la familia de alcaloides indolehidroindol de la vinca, tales como pero no limitados a vindesina, vinblastina, vincristina, catarantina, vindolina, leurosina, vinorelbina, imidocarb, sibutramina, toltrazuril, ácido vinblastinoico, y similares, y análogos y derivados de los mismos.

30 Los procedimientos para tratar enfermedades causadas o evidenciadas por poblaciones de células patógenas se describen en este documento. Los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión (B) se pueden usar para tratar estados de enfermedad caracterizados por la presencia de una población de células patógenas en el huésped, en los que los miembros de la población de células patógenas tienen un sitio de unión accesible para el ligando de unión (B), o análogo o derivado del mismo, en el que el sitio de unión se expresa de forma única, se sobreexpresa o se expresa preferencialmente por las células patógenas. La eliminación selectiva de las células patógenas está mediada por la unión de la unidad estructural de ligando del conjugado de administración de fármaco y ligando de unión (B) a un receptor de ligando, transportador u otra proteína presente en la superficie que se une específicamente al ligando de unión (B), o análogo o derivado del mismo, y que se expresa de forma única, se sobreexpresa o se expresa preferencialmente por las células patógenas. Una proteína presente en la superficie expresada de forma única, sobreexpresada o expresada preferencialmente por las células patógenas es un receptor no presente o presente en concentraciones más bajas en células no patógenas que proporciona un medio para la eliminación selectiva de las células patógenas.

45 Por ejemplo, los receptores de vitaminas expresados en la superficie, como el receptor de folato de alta afinidad, se sobreexpresan en las células cancerosas. Se ha informado que los cánceres epiteliales de ovario, glándula mamaria, colon, pulmón, nariz, garganta y cerebro expresan niveles elevados del receptor de folato. De hecho, se sabe que más del 90 % de todos los tumores ováricos humanos expresan grandes cantidades de este receptor. De acuerdo con lo anterior, los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión (B) descritos en este documento se pueden usar para tratar una variedad de tipos de células tumorales, así como otros tipos de células patógenas, tales como agentes infecciosos, que expresan preferencialmente receptores de ligandos, tales como receptores de vitaminas, y, de este modo, tienen sitios de unión accesibles a la superficie para ligandos, como vitaminas, o análogos de vitaminas o derivados. Los procedimientos en este documento se describen para dirigirse a los conjugados enlazante ligando de unión-fármaco para maximizar el direccionamiento de las células patógenas para su eliminación.

55 La invención contempla además el uso de combinaciones de conjugados de enlazante ligando de unión-fármaco para maximizar el direccionamiento de las células patógenas para su eliminación.

Los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión (B) descritos en este documento se pueden usar tanto para la medicina clínica humana como para aplicaciones veterinarias. De este modo, los animales hospedadores que albergan la población de células patógenas y se tratan con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión (por ejemplo, una vitamina), pueden ser humanos o, en el caso de aplicaciones veterinarias, pueden ser animales de laboratorio, de granja, domésticos o salvajes. Los procedimientos descritos en

este documento se pueden aplicar a animales hospedadores que incluyen, pero no se limitan a, humanos, animales de laboratorio tales como roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, etc.), conejos, monos, chimpancés, animales domésticos tales como perros, gatos, y conejos, animales de granja como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras y animales salvajes en cautiverio tales como osos, pandas, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines y ballenas.

Los procedimientos son aplicables a poblaciones de células patógenas que causan una variedad de patologías en estos animales hospedadores. El término células patógenas se refiere, por ejemplo, a células cancerosas, agentes infecciosos como bacterias y virus, células infectadas con bacterias o virus, macrófagos activados capaces de causar un estado de enfermedad, y cualquier otro tipo de células patógenas que expresan de manera única, expresan preferencialmente, o sobreexpresan los receptores de ligando de unión, tal como los receptores de vitaminas o los receptores que se unen a análogos o derivados de vitaminas. Las células patógenas también pueden incluir cualquier célula que cause un estado de enfermedad para el cual el tratamiento con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión descritos en este documento resulte en la reducción de los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, las células patógenas pueden ser células huésped que son patógenas en algunas circunstancias, tales como las células del sistema inmune que son responsables de la enfermedad de injerto contra huésped, pero no patógenas en otras circunstancias.

De este modo, la población de células patógenas puede ser una población de células cancerosas que es tumorigénica, incluyendo tumores benignos y tumores malignos, o puede ser no tumorigénica. La población de células cancerosas puede surgir espontáneamente o por procedimientos como las mutaciones presentes en la línea germinal del animal huésped o las mutaciones somáticas, o puede ser inducida químicamente, viralmente o por radiación. Los procedimientos se pueden usar para tratar cánceres tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, enfermedad de Hodgkin, melanomas, mesoteliomas, linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos, leucemias y mielomas. La población de células cancerosas puede incluir, pero no se limita a, cánceres oral, de tiroides, endocrino, piel, gástrico, esofágico, de laringe, páncreas, colon, vejiga, hueso, ovario, cervical, útero, mama, testicular, próstata, recto, riñón, de hígado y pulmón.

En las realizaciones en las que la población de células patógenas es una población de células cancerosas, el efecto de la administración de conjugado es una respuesta terapéutica medida por reducción o eliminación de masa tumoral o de inhibición de la proliferación de células tumorales. En el caso de un tumor, la eliminación puede ser una eliminación de las células del tumor primario o de las células que han hecho metástasis o están en procedimiento de disociarse del tumor primario. Un tratamiento profiláctico con el ligando de unión (B) conjugado de administración de fármacos (por ejemplo, una vitamina usada como ligando de unión) para prevenir el retorno de un tumor después de su extirpación mediante cualquier enfoque terapéutico, incluida la extirpación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia o también se describe la terapia biológica. El tratamiento profiláctico puede ser un tratamiento inicial con el conjugado de administración del fármaco y ligando de unión (B), tal como el tratamiento en un régimen diario de dosis múltiples, y/o puede ser un tratamiento adicional o una serie de tratamientos después de un intervalo de días o meses después del (los) tratamiento (s) inicial (es). De acuerdo con lo anterior, la eliminación de cualquiera de las poblaciones de células patógenas tratadas usando los procedimientos descritos incluye la reducción en el número de células patógenas, la inhibición de la proliferación de células patógenas, un tratamiento profiláctico que previene el retorno de células patógenas o un tratamiento de células patógenas que resulta en reducción de los síntomas de la enfermedad.

En los casos en los que se están eliminando células cancerosas, los procedimientos se pueden usar en combinación con la extirpación quirúrgica de un tumor, radioterapia, quimioterapia o terapias biológicas, tales como otras inmunoterapias que incluyen, pero no se limitan a, la terapia con anticuerpos monoclonales, el tratamiento con agentes inmunomoduladores, transferencia adoptiva de células efectoras inmunes, tratamiento con factores de crecimiento hematopoyéticos, citoquinas y vacunación.

Los procedimientos también son aplicables a poblaciones de células patógenas que causan una variedad de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los procedimientos son aplicables a poblaciones de células patógenas como bacterias, hongos, incluyendo levaduras, virus, células infectadas por virus, micoplasma y parásitos. Los organismos infecciosos que pueden tratarse con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión (B), descritos en este documento son cualquiera de los organismos infecciosos reconocidos en la técnica que causan patógenesis en un animal, incluidos organismos tales como bacterias que son cocos o bacilos gramnegativos o grampositivos. Por ejemplo, especies de *Proteus*, especies de *Klebsiella*, especies de *Providencia*, especies de *Yersinia*, especies de *Erwinia*, especies de *Enterobacter*, especies de *Salmonella*, especies de *Serratia*, especies de *Aerobacter*, especies de *Escherichia*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Shigella*, especies de *Vibrio*, especies de *Aeromonas*, especies de *Campylobacter*, especies de *Streptococcus*, Especies de *Staphylococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Micrococcus*, especies de *Moraxella*, especies de *Bacillus*, especies de *Clostridium*, especies de *Corynebacterium*, especies de *Eberthella*, especies de *Micrococcus*, especies de *Mycobacterium*, especies de *Neisseria*, especies de *Hautophilus*, especies de *Bacteroides*, especies de *Listeria*, especies de *Erysipelothrix*, especies de *Elyphophusus*, especies de *Listeria*, especies de *Equilophisus*, especies de *Acinetobacter*, especies de *Brucella*, especies de *Pasteurella*, especies de *Vibrio*, especies de *Flavobacterium*, especies de *Fusobacterium*, especies de *Streptobacillus*, especies de *Calymmatobacterium*, especies de *Legionella*, especies de *Treponema*, especies de *Borrelia*, especies de *Leptospira*, especies de *Actinomyces*, especies de

Nocardia, especies de Rickettsia y cualquier otra especie bacteriana que cause la enfermedad en un huésped se puede tratar con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión descritos en este documento.

De particular interés son las bacterias que son resistentes a los antibióticos, tales como las especies de Streptococcus resistentes a los antibióticos y las especies de Staphylococcus, o bacterias que son susceptibles a los antibióticos, pero causan infecciones recurrentes tratadas con antibióticos para que eventualmente se desarrollen organismos resistentes. Las bacterias que son susceptibles a los antibióticos, pero causan infecciones recurrentes tratadas con antibióticos para que los organismos resistentes se desarrollen eventualmente, se pueden tratar con los conjugados de administración del fármaco y ligando de unión (B) descritos en este documento en ausencia de antibióticos, o en combinación con dosis más bajas de antibióticos de lo que normalmente se administraría a un paciente, para evitar el desarrollo de estas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

Los virus, tales como los virus de ADN y ARN, también se pueden tratar con los procedimientos descritos. Tales virus incluyen, pero no se limitan a, virus de ADN tales como virus de papiloma, parvovirus, adenovirus, herpesvirus y virus de vaccinia, y virus de ARN, tales como arnavirus, coronavirus, rinovirus, virus respiratorios sincitiales, virus de la influenza, picornavirus, paramixovirus, reovirus, retrovirus, lentivirus y rabdovirus.

Los procedimientos también son aplicables a cualquier hongo, incluyendo levaduras, especies de micoplasmas, parásitos u otros organismos infecciosos que causan enfermedades en los animales. Los ejemplos de hongos que se puede tratar con los procedimientos y composiciones incluyen hongos que crecen como mohos o que son como levaduras, incluidos, por ejemplo, hongos que causan enfermedades tales como la tiña, histoplasmosis, blastomycosis, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis, coccidioidomycosis, paracoccidio-idomycosis, mucormycosis, cromoblastomycosis, dermatofitosis, prototocosis, fusariosis, pitiriasis, micetoma, paracoccidioidomycosis, Feohifomycosis, seudallescheriasis, esporotricosis, tricosporosis, infección por neumocistis y candidiasis.

Los procedimientos también se pueden usar para tratar infecciones parasitarias que incluyen, pero no se limita a, infecciones causadas por tenias, tales como Taenia, Hymenolepsis, Diphyllbothrium y especies de Echinococcus, tremátodos, tales como especies de Fasciolopsis, Heterophyes, Metagonimus, Clonorchis, Fasciola, Paragonimus, y Schistosoma, áscaris, tales como especies de Enterobius, Trichuris, Ascaris, Ancylostoma, Necator, Strongyloides, Trichinella, Wuchereria, Brugia, Loa Onchocerca, y Dracunculus, ameba, tales como especies de Naegleria y Acanthamoeba, y protozoans, tales como especies de Plasmodium, Trypanosoma, Leishmania, Toxoplasma, Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, y Enterocytozoon.

Las células patógenas a las que se dirigen los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión descritos en este documento también pueden ser células que albergan patógenos endógenos, tales como las células infectadas por virus, micoplasma, parásitos o bacterias, si estas células expresan preferencialmente receptores de ligando, tales como los receptores de vitaminas.

En una realización, los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión se pueden internalizar en las células patógenas diana tras la unión de la unidad estructural de ligando de unión a un receptor, transportador u otra proteína presente en la superficie que se une específicamente al ligando y que se expresa de manera preferente en las células patógenas. Tal internalización puede ocurrir, por ejemplo, a través de endocitosis mediada por receptor. Si el conjugado de administración del fármaco y ligando de unión (B) contiene un enlazante liberable, la unidad estructural ligando de unión y el fármaco se pueden disociar intracelularmente y el fármaco puede actuar sobre su objetivo intracelular.

En una realización alternativa, la unidad estructural de ligando de unión del conjugado de administración de fármaco se puede unir a la célula patógena colocando el fármaco en estrecha asociación con la superficie de la célula patógena. Luego el fármaco puede ser liberado por escisión del enlazante liberable. Por ejemplo, el fármaco puede ser liberado por una proteína disulfuro isomerasa si el enlazante liberable es un grupo disulfuro. El fármaco puede ser absorbido por la célula patógena a la que se une el conjugado de administración del fármaco y ligando de unión (B), o el fármaco puede ser captado por otra célula patógena muy cerca de él. Alternativamente, el fármaco podría ser liberado por una proteína disulfuro isomerasa dentro de la célula en la que el enlazante liberable es un grupo disulfuro. El fármaco también puede ser liberado por un mecanismo hidrolítico, tal como hidrólisis catalizada por ácido, como se describió anteriormente para ciertos mecanismos de eliminación beta, o por una escisión asistida por vía anquimérica a través de un mecanismo productor de ion oxonio o lactonio. La selección del enlazante liberable o los enlazantes dictará el mecanismo por el cual el fármaco se libera del conjugado. Se aprecia que tal selección puede estar predefinida por las condiciones en las que se usará el conjugado de fármaco. Alternativamente, los conjugados de administración de fármacos se pueden internalizar en las células diana tras la unión, y el ligando de unión y el fármaco pueden permanecer asociados intracelularmente con el fármaco que muestra sus efectos sin disociación de la unidad estructural de vitamina.

En otra realización más en la que el ligando de unión es una vitamina, el conjugado de administración de fármaco y vitamina puede actuar a través de un mecanismo independiente de los receptores celulares de vitamina. Por ejemplo, los conjugados de administración de fármacos se pueden unir a los receptores de vitaminas solubles presentes en el suero o a las proteínas séricas, tales como la albúmina, lo que da como resultado una circulación

prolongada de los conjugados con respecto al fármaco no conjugado, y una mayor actividad de los conjugados hacia la población de la célula patógena relativa al fármaco no conjugado.

En otra realización, cuando el enlazante no comprende un enlazante liberable, la unidad estructural de vitamina del conjugado de administración de fármaco se puede unir a la célula patógena colocando el fármaco en la superficie de la célula patógena para dirigir la célula patógena al ataque de otras moléculas capaces de unirse al fármaco. Alternativamente, en esta realización, los conjugados de administración de fármaco se pueden internalizar en las células diana tras la unión, y la unidad estructural de vitamina y el fármaco pueden permanecer asociados intracelularmente con el fármaco que muestra sus efectos sin disociación de la unidad estructural de vitamina.

En otra realización de esta invención, se proporciona un conjugado de administración de unión al receptor celular de fórmula general B-LA, en la que L es como se define en este documento, y A es un fármaco tal como un inmunógeno. El inmunógeno puede ser un hapteno, por ejemplo, fluoresceína, dinitrofenilo y similares. En esta realización, el conjugado de administración del fármaco de unión al receptor de la vitamina se une a la superficie de las células patógenas y "marca" las células con el inmunógeno, lo que desencadena una respuesta inmune dirigida a la población de células patógenas marcadas. Los anticuerpos administrados al huésped en una inmunización pasiva o anticuerpos existentes en el sistema huésped de una inmunidad innata o adquirida preexistente se unen al inmunógeno y desencadenan respuestas inmunes endógenas. La unión del anticuerpo al conjugado de inmunógeno y vitamina unido a la célula da lugar a citotoxicidad mediada por el complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, opsonización de anticuerpos y fagocitosis, agrupación de receptores inducida por anticuerpos que indica la muerte celular o la inactividad, o cualquier otra respuesta inmune humoral o celular estimulada por la unión del anticuerpo a conjugados ligando e inmunógeno unidos a la célula. En los casos en que un inmunógeno puede ser reconocido directamente por las células inmunes sin la opsonización previa del anticuerpo, puede ocurrir la muerte directa de las células patógenas. Esta realización se describe con más detalle en la Patente de los Estados Unidos No. US 7,033,594. Se aprecia que en ciertas variaciones de esta realización, cuando el fármaco es un inmunógeno, el enlazante polivalente también puede incluir enlazantes liberables, como se describió anteriormente, tal como un conjugado de administración de fármaco de unión al receptor de vitamina de la fórmula general B-L-A, en la que L es un enlazante que comprende uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos y enlazantes liberables.

Los conjugados de administración de fármacos y ligando de unión (B) descritos en este documento comprenden un ligando de unión, un enlazante polivalente (L), un fármaco y, opcionalmente, enlazantes heteroátomos para unir el ligando de unión y el fármaco al enlazante polivalente (L). El enlazante polivalente (L) puede comprender un enlazante espaciador, un enlazante liberable (esto es, escindible) y un enlazante heteroátomo, o combinaciones de los mismos.

El fármaco puede ser cualquier molécula capaz de modular o modificar de otro modo la función celular, incluidos los compuestos farmacéuticamente activos. Las moléculas apropiadas pueden incluir, pero no se limitan a: péptidos, oligopéptidos, oligopéptidos retroinversos, proteínas, análogos de proteínas en los que al menos un enlace no peptídico reemplaza a un enlace peptídico, apoproteínas, glicoproteínas, enzimas, coenzimas, inhibidores de enzimas, amino ácidos y sus derivados, receptores y otras proteínas de membrana; antígenos y anticuerpos a los mismos; haptenos y sus anticuerpos; hormonas, lípidos, fosfolípidos, liposomas; toxinas antibióticos; analgésicos; broncodilatadores; bloqueadores beta; agentes antimicrobianos; agentes antihipertensivos; agentes cardiovasculares que incluyen antiarrítmicos, glucósidos cardíacos, antianginales y vasodilatadores; agentes del sistema nervioso central, incluidos estimulantes, psicotrópicos, antimaníacos y depresivos; agentes antivirales; antihistamínicos; fármacos contra el cáncer que incluyen agentes quimioterapéuticos; tranquilizantes antidepresivos; antagonistas H-2; anticonvulsivos; antináuseas; prostaglandinas y análogos de prostaglandinas; relajantes musculares; sustancias antiinflamatorias; estimulantes; descongestionantes; antieméticos; diuréticos; antiespasmódicos; antiasmáticos; agentes antiparkinson; expectorantes; supresores de la tos; mucolíticos; y aditivos minerales y nutricionales.

Además, el fármaco puede ser cualquier fármaco conocido en la técnica que sea citotóxico, mejore la permeabilidad del tumor, inhiba la proliferación de células tumorales, promueva la apoptosis, disminuya la actividad antiapoptótica en células diana, se usa para tratar enfermedades causadas por agentes infecciosos, mejora una respuesta inmune endógena dirigida a las células patógenas, o es útil para tratar un estado de enfermedad causado por cualquier tipo de célula patógena. Los fármacos apropiados para su uso según esta invención incluyen adrenocorticoide y corticoesteroides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos, tales como citosina arabinósido, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, paclitaxel, derivados de paclitaxel, Taxotere®, ciclofosfamida, daunomicina, daunorubicina, doxorubicina, rizoxina, toxina T2, alcaloides de plantas, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, mitomicinas, discodermolidas, inhibidores de microtúbulos, epotilonas, tubulisina, ciclopropilbenz [e] indolona, seco-ciclopropilbenz [e] indolona, O-Ac-seco-ciclopropilbenz [e] indolona, bleomicina y cualquier otro antibiótico, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, análogos y derivados de los mismos, tales como la monohidrazida de desacetilvinblastina y otros alcaloides de la vinca, incluidos los descritos en la Publicación Internacional PCT No. WO 2007/022493, colchicina, derivados de la colchicina, alocolchicina, tiocolchicina, trisil cisteína, Halicondrin B, dolastatinas tal como dolastatin 10, amanitinas como α -amanitina, camptotecina, irinotecan, y otros derivados de camptotecina de la misma,

maitansinas, derivados de geldanamicina y geldanamicina, estramustina, nocodazol, MAP4, colcemid, agentes inflamatorios y proinflamatorios, inhibidores de la transducción de señales de péptidos y peptidomiméticos, y cualquier otro fármaco o toxina reconocido en la técnica. Otros fármacos que se pueden usar según la invención incluyen penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, eritromicina, clindamicina, rifampin, cloranfenicol, antibióticos aminoglucósidos, gentamicina, anfotericina B, aciclovir, trifluridina, ganciclovir, zidovudina, amantadina, ribavirina y cualquier otro compuesto antimicrobiano reconocido en la técnica.

En otra realización, el agente (A) es un fármaco seleccionado de un alcaloide de la vinca, tal como DAVLBH, criptoficina, bortezomib, tiobortezomib, una tubulisina, aminopterina, rapamycin, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, everolimus, α -amanatina, verucarin, didemnin B, geldanamicina, purvalanol A, everolimus, ispinesib, budesonida, dasatinib, una epotilona, una maitansina y un inhibidor de la tirosina quinasa, incluidos los análogos y derivados de los anteriores. En otra realización, el conjugado incluye al menos dos agentes (A) seleccionados de un alcaloide de la vinca, tal como DAVLBH, una criptoficina, bortezomib, tiobortezomib, una tubulisina, aminopterina, rapamicina, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, everolimus, α -amanatina, verucarin, didemnin B, geldanomicina, purvalanol A, everolimus, ispinesib, budesonida, dasatinib, una epotilona, una maitansina y un inhibidor de la tirosina quinasa, incluidos los análogos y derivados de los anteriores. En una variación, los agentes (A) son los mismos. En otra variación, los agentes (A) son diferentes.

En una realización, los fármacos para uso en los procedimientos descritos en este documento permanecen estables en suero durante al menos 4 horas. En otra realización, los fármacos tienen una IC_{50} en el rango nanomolar y, en otra realización, los fármacos son solubles en agua. Si el fármaco no es soluble en agua, el enlazante polivalente (L) se puede derivar para mejorar la solubilidad en agua. El término "fármaco" también significa cualquiera de los análogos o derivados de fármacos descritos anteriormente en este documento. Se debe apreciar que, según esta invención, un análogo o derivado de un fármaco puede significar un fármaco que incorpora un heteroátomo a través del cual el análogo o derivado del fármaco se une covalentemente al enlazante polivalente (L).

Los conjugados de administración de fármacos y ligando de unión pueden comprender un ligando de unión (B), un enlazante bivalente (L), un fármaco y, opcionalmente, enlazantes de heteroátomo para unir la unidad estructural de unión del receptor del ligando de unión (B) y el fármaco al enlazante bivalente (L). En una realización ilustrativa, se debe apreciar que un análogo o derivado de vitamina puede significar una vitamina que incorpora un heteroátomo a través del cual el análogo o derivado de vitamina se une covalentemente al enlazante bivalente (L). De este modo, en esta realización ilustrativa, la vitamina se puede unir covalentemente al enlazante bivalente (L) a través de un enlazante heteroátomo, o un análogo o derivado de la vitamina (esto es, que incorpora un heteroátomo) se puede unir directamente al enlazante bivalente (L). En realizaciones ilustrativas similares, un análogo o derivado de fármaco es un fármaco, y un análogo o derivado de fármaco puede significar un fármaco que incorpora un heteroátomo a través del cual el análogo o derivado de fármaco se une covalentemente al enlazante bivalente (L). De este modo, en estos aspectos ilustrativos, el fármaco se puede unir covalentemente al enlazante bivalente (L) a través de un enlazante heteroátomo, o un fármaco análogo o derivado (esto es, que incorpora un heteroátomo) se puede unir directamente al enlazante bivalente (L). El enlazante bivalente (L) puede comprender un enlazante espaciador, un enlazante liberable (esto es, escindible), y un enlazante heteroátomo para unir el enlazante espaciador al enlazante liberable en conjugados que contienen ambos tipos de enlazantes.

En general, se puede usar cualquier manera para formar un conjugado entre el enlazante bivalente (L) y el ligando de unión (B), o su análogo o derivado del mismo, entre el enlazante bivalente (L) y el fármaco, o análogo o derivado del mismo, incluyendo cualesquiera enlazantes heteroátomos intermedios. Además, se puede usar cualquier procedimiento reconocido en la técnica para formar un conjugado entre el enlazante espaciador, el enlazante liberable y el enlazante heteroátomo para formar el enlazante bivalente (L). El conjugado se puede formar por conjugación directa de cualquiera de estas moléculas, por ejemplo, a través de la formación de complejos, o a través de enlaces de hidrógeno, iónicos o covalentes. La unión covalente puede ocurrir, por ejemplo, a través de la formación de enlaces amida, éster, disulfuro o imino entre los grupos ácido, aldehído, hidroxilo, amino, sulfhidrilo o hidrazo.

En otra realización, el enlazante bivalente (L) incluye una cadena de átomos seleccionada de C, N, O, S, Si y P que conecta covalentemente el ligando de unión (B), el enlazante hidrófilo y/o el agente (A). El enlazante puede tener una gran variedad de longitudes, tal como en el intervalo desde aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos. Los átomos usados en la formación del enlazante pueden combinarse de todas las formas químicamente relevantes, tales como cadenas de átomos de carbono que forman grupos alquileo, alquilenilo y alquilinilo, y similares; cadenas de átomos de carbono y oxígeno que forman éteres, grupos polioxialquileo, o cuando se combinan con grupos carbonilo que forman ésteres y carbonatos, y similares; cadenas de átomos de carbono y nitrógeno que forman aminas, iminas, poliaminas, hidrazinas, hidrazonas, o cuando se combinan con grupos carbonilo que forman amidas, ureas, semicarbazidas, carbazidas y similares; cadenas de átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno que forman alcóxiaminas, alcóxilaminas, o cuando se combinan con grupos carbonilo que forman uretanos, aminoácidos, aciloxilaminas, ácidos hidroxámicos y similares; y muchos otros. Además, se debe entender que los átomos que forman la cadena en cada una de las realizaciones ilustrativas anteriores pueden ser ya sea saturados o insaturados, de manera que, por ejemplo, alcanos, alquenos, alquinos, iminas y similares pueden ser radicales que se incluyen en el enlazante. Además, se debe entender que los átomos que forman el enlazante

también se pueden ciclar uno sobre otro para formar estructuras cíclicas divalentes que forman el enlazante, incluidos los cicloalcanos, éteres cíclicos, aminas cíclicas, arilenos, heteroarilenos y similares en el enlazante.

En otra realización, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad de un conjugado de administración de fármaco y ligando de unión (B) eficaz para eliminar una población de células patógenas en un animal huésped cuando se administran en una o más dosis. El conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión se administra preferiblemente al animal huésped por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intratecal. Alternativamente, el conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión se puede administrar al animal huésped mediante otros procedimientos médicamente útiles, tales como por vía oral, y se puede usar cualquier dosis eficaz y forma de dosificación terapéutica apropiada, incluyendo formas de dosificación de liberación prolongada.

Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen soluciones acuosas del agente activo, en una solución salina isotónica, 5 % de glucosa u otros portadores líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos tales como alcoholes líquidos, glicoles, ésteres y amidas. La forma de dosificación parenteral puede estar en forma de un liofilizado reconstituible que comprende la dosis del conjugado de administración de fármaco. En un aspecto de la presente realización, se puede administrar cualquiera de una serie de formas de dosificación de liberación prolongada conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, las matrices de carbohidratos biodegradables descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,713,249; 5,266,333; y 5,417,982, o, alternativamente, se puede usar una bomba lenta (por ejemplo, una bomba osmótica).

En un aspecto ilustrativo, al menos una composición adicional que comprende un factor terapéutico se puede administrar al huésped en combinación o como un adyuvante de la metodología detallada anteriormente, para mejorar la eliminación mediada por conjugado de administración del fármaco y ligando de unión mediada de la población de células patógenas, o se puede administrar más de un factor terapéutico adicional. El factor terapéutico se puede seleccionar de un agente quimioterapéutico u otro factor terapéutico capaz de complementar la eficacia del conjugado de administración de fármaco y ligando de unión administrado.

En un aspecto ilustrativo, se pueden usar combinaciones terapéuticamente eficaces de estos factores. En una realización, por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces del factor terapéutico, por ejemplo, en cantidades que van desde aproximadamente 0,1 MIU/m²/dosis/día a aproximadamente 15 MIU/m²/dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, o por ejemplo, en cantidades que van desde aproximadamente 0,1 MIU/m²/dosis/día a aproximadamente 7,5 MIU/m²/dosis/día en un régimen diario de dosis múltiples, se pueden usar junto con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión para eliminar, reducir o neutralizar células patógenas en un animal huésped que alberga las células patógenas (MIU = millón de unidades internacionales; m² = área de superficie corporal aproximada de un humano promedio).

En otra realización, los agentes quimioterapéuticos, que son, por ejemplo, citotóxicos por sí mismos o que pueden funcionar para mejorar la permeabilidad del tumor, también son apropiados para su uso en los procedimientos descritos en combinación con los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión. Tales agentes quimioterapéuticos incluyen adrenocorticoides y corticosteroides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos, tales como arabinósido citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucil, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxiphen, taxol, paclitaxel, derivados de paclitaxel, Taxotere®, ciclofosfamida, daunomicina, daunorubicina, doxorubicina, rizoxina, toxina T2, alcaloides de plantas, prednisona, hidroxiaurea, tenipósido, mitomicinas, discodermólidos, inhibidores de microtúbulos, epotilonas, tubulisina, ciclopropilbenz [e] indolona, seco-ciclopropilbenz [e] indolona, O-Ac-seco-ciclopropilbenz [e] indolona, bleomicina y cualquier otro antibiótico, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina y análogos y derivados de los mismos, tales como la monohidrazida de deacetilvinblastina, colchicina, derivados de colchicina, alocolchicina, tiocolchicina, trisil cisteína, Halicondrin B, dolastatinas tal como dolastatin 10, amanitinas tal como α -amanitina, camptotecina, irinotecán y otros derivados de la camptotecina, geldanamicina y derivados de geldanamicina, estramustina, nocodazol, MAP4, colcemid, agentes inflamatorios y proinflamatorios, inhibidores de la transducción de señales de péptidos y peptidomiméticos, y cualquier otro fármaco o toxina reconocido en la técnica. Otros fármacos que se pueden usar incluyen penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, eritromicina, clindamicina, rifampicina, cloranfenicol, antibióticos aminoglucósidos, gentamicina, anfotericina B, aciclovir, trifluridina, ganciclovir, zidovudina, amantadina, ribavirina, maitansinas y análogos y derivados de los mismos, gemcitabina y cualquier otro compuesto antimicrobiano reconocido en la técnica.

El factor terapéutico se puede administrar al animal huésped antes, después o al mismo tiempo que los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión, y el factor terapéutico se puede administrar como parte de la misma composición que contiene el conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión o como parte de una composición diferente a la del conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión. Se puede usar cualquier composición terapéutica de este tipo que contenga el factor terapéutico a una dosis terapéuticamente eficaz.

Adicionalmente, se puede usar más de un tipo de conjugado de administración de fármaco y ligando de unión. Ilustrativamente, por ejemplo, el animal huésped se puede tratar con conjugados con diferentes vitaminas, pero el

mismo fármaco en un protocolo de dosificación conjunta. En otras realizaciones, el animal huésped se puede tratar con conjugados que comprenden el mismo ligando de unión unido a diferentes fármacos, o diversos ligandos de unión unidos a diversos fármacos. En otra realización ilustrativa, se podrían usar conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión con las mismas o diferentes vitaminas, y los mismos o diferentes fármacos que comprenden múltiples vitaminas y múltiples fármacos como parte del mismo conjugado de administración de fármacos.

La dosis diaria unitaria del conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión puede variar significativamente dependiendo de la condición del huésped, el estado de la enfermedad que se está tratando, el peso molecular del conjugado, su vía de administración y distribución tisular, y la posibilidad de uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos tal como la radioterapia. La cantidad eficaz que debe administrarse a un paciente se basa en el área de la superficie corporal, el peso del paciente y la evaluación médica del estado del paciente. En realizaciones ilustrativas, las dosis eficaces pueden variar, por ejemplo, desde aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg, desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg, desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg, desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 50 µg/kg, y desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 10 µg/kg.

En otro aspecto ilustrativo, se puede usar cualquier régimen eficaz para administrar los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión. Por ejemplo, los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión se pueden administrar como dosis únicas, o se pueden dividir y administrar como un régimen diario de dosis múltiples. En otras realizaciones, se puede usar un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a tres días por semana como alternativa al tratamiento diario, y dicho régimen diario intermitente o escalonado se considera que es equivalente a cada tratamiento diario y dentro del alcance de los procedimientos descritos en este documento. En una realización, el huésped se trata con múltiples inyecciones del conjugado de administración de fármaco y ligando de unión para eliminar la población de células patógenas. En otra realización, el huésped se inyecta varias veces (preferiblemente de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 veces) con el conjugado de administración de fármaco y ligando de unión, por ejemplo, a intervalos de 12-72 horas o a intervalos de 48-72 horas. En otras realizaciones, se pueden administrar al paciente inyecciones adicionales del conjugado de administración de fármacos y ligandos de unión en un intervalo de días o meses después de la (s) inyección (es) inicial (es) y las inyecciones adicionales previenen la recurrencia del estado de la enfermedad causada por las células patógenas.

En una realización, las vitaminas, o análogos o derivados de los mismos, que se pueden usar en los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión incluyen aquellos que se unen a receptores expresados específicamente en macrófagos activados, tales como el receptor de folato que se une al folato, o un análogo o derivado de los mismos. Los conjugados unidos a folato, por ejemplo, se pueden usar para matar o suprimir la actividad de los macrófagos activados que causan estados de enfermedad en el huésped. Tales conjugados dirigidos a macrófagos, cuando se administran a un paciente que padece un estado de enfermedad mediada por macrófagos activados, trabajan para concentrar y asociar el fármaco conjugado en la población de macrófagos activados para matar los macrófagos activados o suprimir la función de los macrófagos. La eliminación, reducción o desactivación de la población de macrófagos activados sirve para detener o reducir la patogénesis mediada por macrófagos activada característica del estado de la enfermedad que se está tratando. Las enfermedades de ejemplo que se sabe están mediadas por macrófagos activados se incluyen la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la osteomielitis, la esclerosis múltiple, la aterosclerosis, la fibrosis pulmonar, la sarcoidosis, la esclerosis sistémica, el rechazo de trasplantes de órganos (GVHD) y las inflamaciones crónicas. La administración del conjugado de administración de fármacos generalmente se continúa hasta que se reducen o eliminan los síntomas del estado de la enfermedad.

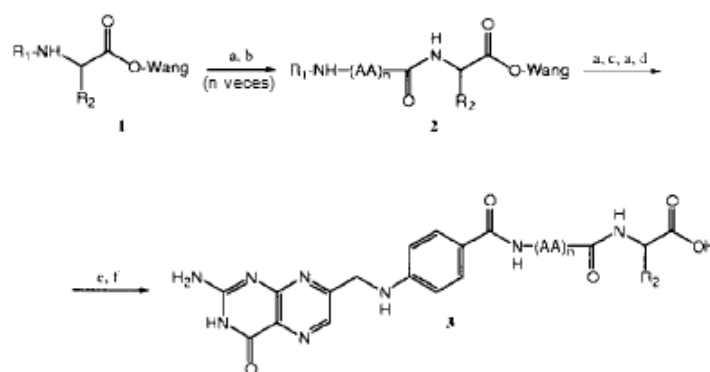
Ilustrativamente, los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión administrados para matar macrófagos activados o suprimir la función de los macrófagos activados se pueden administrar por vía parenteral al animal o paciente que padece la enfermedad, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o por vía intravenosa en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, los conjugados de administración de fármacos y ligandos de unión se pueden administrar al animal o paciente mediante otros procedimientos médicamente útiles y se pueden administrar dosis eficaces en formas de dosificación de liberación estándar o prolongada. En otro aspecto, el procedimiento terapéutico se puede usar solo o en combinación con otros procedimientos terapéuticos reconocidos para el tratamiento de estados de enfermedad mediados por macrófagos activados.

Los conjugados de administración de fármacos descritos en este documento se pueden preparar mediante procedimientos de síntesis reconocidos en la técnica. Los procedimientos de síntesis se eligen según la selección de los heteroátomos de adición opcionalmente o los heteroátomos que ya están presentes en los enlazantes espaciadores, enlazantes liberables, el fármaco, y/o el ligando de unión. En general, las reacciones de formación de enlaces relevantes se describen en Richard C. Larock. "Comprehensive Organic Transformations, a guide to functional group preparations," VCH Publishers, Inc. New York (1989), y en Theodora E. Greene & Peter G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 2d edition, John Wiley & Sons, Inc. New York (1991). Detalles adicionales para la preparación de grupos funcionales, que incluyen amidas y ésteres, cetales y acetales, succinimidas, sililoxis, hidrazonas, acil hidrazinas, semicarbazonas, disulfuros, carbonatos, sulfonatos y similares contenidos en el

enlazante, incluidos los enlazantes liberables se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2005/0002942 A1.

Formación general de folato-péptidos. El fragmento de peptídico que contiene folato Pte-Glu- (AA)_n-NH (CHR₂)CO₂H (3) se prepara mediante un enfoque secuencial con soporte de polímeros usando procedimientos estándar, tales como la estrategia Fmoc en una resina Fmoc-AA-Wang sensible al ácido (1), como se muestra en el Esquema 1.

Esquema 1



(a) 20 % de piperidina/DMF; (b) Fmoc-AA-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (c) Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (d) 1. *N*¹⁰(TFA)-Pte-OH; PyBop, DIPEA, DMSO; (e) TFAA, (CH₂SH)₂, *i*-Pr₃SiH; (f) NH₄OH, pH 10,3.

En esta realización ilustrativa de los procedimientos descritos en este documento, R¹ es Fmoc, R² es la cadena lateral de aminoácido protegida adecuadamente deseada, y DIPEA es diisopropilamina. Los procedimientos de acoplamiento estándar, tales como PyBOP y otros descritos en este documento o conocidos en la técnica se usan, cuando el agente de acoplamiento se aplica ilustrativamente como reactivo de activación para asegurar un acoplamiento eficiente. Los grupos protectores Fmoc se eliminan después de cada etapa de acoplamiento en condiciones estándar, tal como en el tratamiento con piperidina, fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), y similares. Se usan bloques de construcción de aminoácidos adecuadamente protegidos, tales como Fmoc-Glu-O-*t*-Bu, *N*¹⁰-TFA-Pte-OH, y similares, como se describe en el Esquema 1, y se representan en la etapa (b) por Fmoc-AA-OH. De este modo, AA se refiere a cualquier material de inicio de aminoácido, que está adecuadamente protegido. Se debe entender que el término aminoácido, como se usa en este documento, pretende referirse a cualquier reactivo que tenga un grupo funcional amina y un ácido carboxílico separados por uno o más carbonos, e incluye los aminoácidos alfa y beta de origen natural, también como derivados de aminoácidos y análogos de estos aminoácidos. En particular, los aminoácidos que tienen cadenas laterales que están protegidas, tales como serina, treonina, cisteína, aspartato protegidos y similares también se pueden usar en la síntesis de folato-péptido descrita en este documento. Además, también pueden incluirse gamma, delta, o aminoácidos homólogos más largos como materiales de partida en la síntesis de folato-péptido descrita en este documento. Además, los análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales homólogas o estructuras de ramificación alternativas, tal como norleucina, isovalina, β-metil-treonina, β-metil cisteína, β, β-dimetil cisteína y similares, también pueden incluirse como materiales de partida en la síntesis de folato-péptidos descrita en este documento.

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

Además, el siguiente procedimiento ilustrativo se puede usar para preparar los compuestos descritos en este documento, en los que es un número entero tal como 1 a aproximadamente 10.



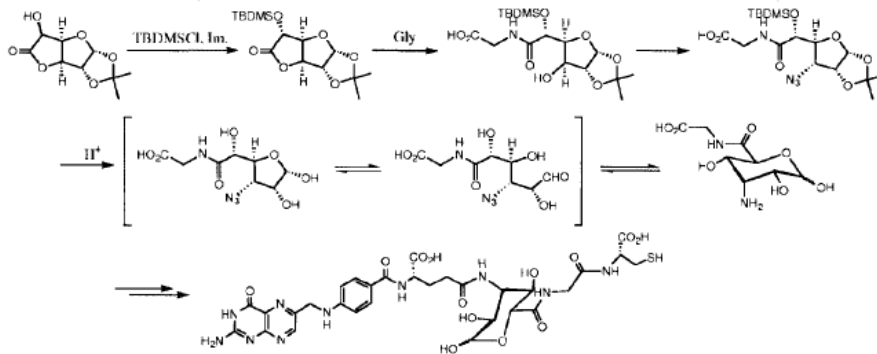
5

Los compuestos descritos en este documento se pueden preparar usando química orgánica de síntesis convencional. Además, el siguiente procedimiento ilustrativo se puede usar para preparar los compuestos descritos en este documento, en los que es un número entero tal como 1 a aproximadamente 10.



10

15



20

25

liberables se pueden unir a cualquiera de los extremos de los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento.

Ejemplos de procedimiento

Ensayo de afinidad relativa. La afinidad por los receptores de folato (FRs) en relación con el folato se determinó de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Westerhof, G. R., J. H. Schomagel, y otros (1995) Mol. Pharm. 48: 459-471) con una ligera modificación. En resumen, las células KB positivas para FR se sembraron intensamente en placas de cultivo celular de 24 pocillos y se dejaron adherir al plástico durante 18 h. El medio de incubación gastado se reemplazó en los pocillos designados con RPMI sin folato (FFRPMI) suplementado con ácido ^3H -fólico 100 nM en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de artículo de prueba o ácido fólico. Las células se incubaron durante 60 min a 37 °C y luego se enjuagaron 3 veces con PBS, pH 7,4. Se añadieron quinientos microlitros de SDS al 1 % en PBS, pH 7,4, por pocillo. Luego se recogieron los lisados celulares y se añadieron a viales individuales que contenían 5 ml de cóctel de centelleo y luego se contaron para determinar la radioactividad. Los tubos de control negativo contenían solo el ácido ^3H -fólico en FFRPMI (no competidor). Los tubos de control positivo contenían una concentración final de ácido fólico 1 mM, y los CPM medidos en estas muestras (que representan la unión no específica del marcador) se restaron de todas las muestras. En particular, las afinidades relativas se definieron como la relación molar inversa del compuesto requerido para desplazar el 50 % del ácido ^3H -fólico unido a la FR en las células KB, y la afinidad relativa del ácido fólico por la FR se estableció en 1.

Inhibición de la síntesis de ADN celular. Los compuestos descritos en este documento se evaluaron usando un ensayo de citotoxicidad in vitro que predice la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento de las células KB positivas para el receptor de folato. Los compuestos comprendían folato unido a un fármaco quimioterapéutico respectivo, según se preparó de acuerdo con los protocolos descritos en este documento. Las células KB se expusieron durante hasta 7 horas a 37 °C a las concentraciones indicadas de conjugado de folato-fármaco en ausencia o presencia de al menos un exceso de ácido fólico de 100 veces. Las células se enjuagaron una vez con medio de cultivo fresco y se incubaron en medio de cultivo fresco durante 72 horas a 37°C. La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo de incorporación de timidina ^3H .

Actividad citotóxica dependiente de la concentración in vitro. Las células se sembraron intensamente en placas Falcon de 24 pocillos y se les permitió formar monocapas casi confluentes durante la noche. Treinta minutos antes de la adición del artículo de prueba, se aspiró el medio gastado de todos los pocillos y se reemplazó con RPMI sin folato fresco (FFRPMI). Tenga en cuenta que los pocillos designados recibieron medios que contenían ácido fólico 100 μM ; y, las células dentro de los últimos pocillos se utilizaron para determinar la especificidad de direccionamiento, ya que la actividad citotóxica producida en presencia de exceso de ácido fólico (permite la competición por la unión de FR) significaría la parte de la actividad total que no estaba relacionada con el suministro específico de FR. Después de un enjuague con 1 ml de FFRPMI fresco que contenía un 10 % de suero de ternera fetal inactivado por calor, cada pocillo recibió 1 ml de medio que contenía concentraciones crecientes de artículo de prueba (4 pocillos por muestra) en presencia o ausencia de ácido fólico libre 100 μM (un competidor de sitio obligatorio). Las células tratadas se pulsaron durante 2 horas a 37 °C, se enjuagaron 4 veces con 0,5 ml de medio y luego se persiguieron en 1 ml de medio fresco hasta 70 horas. Los medios gastados se aspiraron de todos los pocillos y se reemplazaron con medios nuevos que contenían 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina. Después de 2 h más de incubación a 37 °C, las células se lavaron 3 veces con 0,5 ml de PBS y luego se trataron con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 5 % enfriado en hielo por pocillo. Después de 15 minutos, se aspiró el ácido tricloroacético y se solubilizó el material celular mediante la adición de 0,5 ml de hidróxido de sodio 0,25 N durante 15 minutos. Se transfirieron cuatrocientos cincuenta μl de cada muestra solubilizada a viales de centelleo que contenían 3 ml de cóctel de centelleo Ecolume y luego se contaron en un contador de centelleo líquido. Los resultados tabulados finales se expresaron como el porcentaje de incorporación de timidina ^3H en relación con los controles no tratados.

Como se muestra en las figuras de este documento, la citotoxicidad dependiente de la dosis fue medible, y en la mayoría de los casos, los valores de CI_{50} (concentración del conjugado de fármaco requerida para reducir la incorporación de timidina ^3H en el ADN recién sintetizado en un 50 %) estaban en el rango nanomolar bajo. Además, las citotoxicidades de estos conjugados se redujeron en presencia de exceso de ácido fólico libre, lo que indica que la destrucción celular observada estaba mediada por la unión al receptor de folato. La siguiente tabla ilustra datos para compuestos seleccionados contra células KB y contra células RAW264.7

Número de conjugado	Fármaco (s) base	Células KB		Células RAW264.7	
		IC ₅₀ (nM)	Compatible con xs folato	IC ₅₀ (nM)	Compatible con xs folato
EC0234	DAVLBH	56	Sí		
EC0246	DAVLBH		Sí		

(continuación)

Número de conjugado	Fármaco (s) base	Células KB		Células RAW264.7	
		IC ₅₀ (nM)	Compatible con xs folato	IC ₅₀ (nM)	Compatible con xs folato
EC0262	criptoficina	4	Sí		
EC0263	DAVLBH	11	Sí		
EC0409	DAVLBH	7	Sí		
EC0525	Tio-bortezomib			68	Sí
EC0543	Tubulisina A	1.6	Sí		
EC0551	Aminopterin			1	Sí
EC0552	Rapamicina			100	Sí
EC0561	Paclitaxel	53	Sí		
EC0563	Tio-bortezomib + Rapamicina			387	Sí
EC0582	Tio-bortezomib + Everolimus			51	Sí
EC0592	α -amanatina	~ 3	Sí	5	Sí
EC0595	Bis-Tio-bortezomib			4	Sí
EC0598	Verucarin			33	Sí
EC0605	Bis-Verucarin			14	Sí
EC0610	Didemnin B			4	Sí
EC0647	Bis-Aminopterin			0,3	Sí

Prueba in vitro contra diversas líneas celulares de cáncer. Las células se siembran intensamente en placas Falcon de 24 pocillos y se les permite formar monocapas casi confluentes durante la noche. Treinta minutos antes de la adición del compuesto de prueba, el medio gastado se aspira de todos los pocillos y se reemplaza con medio RPMI (FFRPMI) deficiente en folato fresco. Se designa un subconjunto de pocillos para recibir medios que contienen ácido fólico 100 μ M. Las celdas en los pocillos designados se utilizan para determinar la especificidad de la orientación. Sin pretender imponer ninguna teoría, se sugiere que la actividad citotóxica producida por los compuestos de prueba en presencia de exceso de ácido fólico, esto es, donde hay competencia por la unión de FR, corresponde a la parte de la actividad total que no está relacionada con la administración específica de FR. Después de un enjuague con 1 ml de FFRPMI nuevo que contiene un 10 % de suero de ternera fetal inactivado por calor, cada pocillo recibe 1 ml de medio que contiene concentraciones crecientes de compuesto de prueba (4 pocillos por muestra) en presencia o ausencia de ácido fólico libre 100 μ M según se indique. Las células tratadas se pulsan durante 2 horas a 37 °C, se enjuagan 4 veces con 0,5 ml de medio y luego se introducen en 1 ml de medio fresco hasta 70 horas. El medio gastado se aspira de todos los pocillos y se reemplaza con medio fresco que contiene 5 μ Ci/ml de ³H-timidina. Después de 2 h más de 37 °C de incubación, las células se lavan 3 veces con 0,5 ml de PBS y luego se tratan con 0,5 ml de ácido tricloroacético al 5 % enfriado en hielo por pocillo. Después de 15 minutos, se aspiró el ácido tricloroacético y se solubilizó el material celular mediante la adición de 0,5 ml de hidróxido de sodio 0,25 N durante 15 minutos. Una alícuota de 450 μ l de cada muestra solubilizada se transfiere a un vial de centelleo que contiene 3 ml de cóctel de centelleo Ecolume y luego se cuenta en un contador de centelleo líquido. Los resultados tabulados finales se expresan como el porcentaje de incorporación de ³H-timidina en relación con los controles no tratados.

Inhibición del crecimiento tumoral en ratones. Se compraron ratones de cuatro a siete semanas de edad (cepas Balb/c o nu/nu) de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN). La comida normal para roedores contiene una alta concentración de ácido fólico (6 mg/kg de comida); por consiguiente, los ratones utilizados se mantuvieron en la dieta sin folato (dieta Harlan No TD00434) durante 1 semana antes de la implantación del tumor para lograr concentraciones de folato en suero cercanas al rango del suero humano normal. Para la inoculación de células tumorales, se inyectaron 1×10^6 células M109 (cepa Balb/c) o 1×10^6 KB células (cepa nu/nu) en 100 μ l en el subcutis del área medial dorsal. Los tumores se midieron en dos direcciones perpendiculares cada 2-3 días usando un calibrador, y sus volúmenes se calcularon como $0.5 \times L \times W^2$, donde L = medición del eje más largo en mm y W = medición del eje perpendicular a L en mm. Los valores de destrucción de células de registro (LCK) y control sobre tratados (T/C) se calcularon de acuerdo con los procedimientos publicados (ver, por ejemplo, Lee et al., BMS-247550: un nuevo análogo de epotilona con un modo de acción similar al paclitaxel pero con una eficacia antitumoral superior "Clin Cancer Res 7: 1429-1437 (2001); Rose", quimioterapia de combinación a base de Taxol y otros estudios antitumorales preclínicos in vivo "J Natl Cancer Inst Monogr 47-53 (1993)). Las soluciones de dosificación se prepararon nuevas cada día en PBS y se administraron a través de la vena lateral de la cola de los ratones. La dosificación se inició cuando el s.c. los tumores tenían un volumen promedio entre 50 y 100 mm³ (t_0), típicamente 8 días después de la inoculación del tumor (PTI) para los tumores KB, y 11 días PTI para los tumores M109.

Ensayo general de tumores KB. La actividad antitumoral de los compuestos descritos en este documento, cuando se administró por vía intravenosa (i.v.) a animales portadores de tumores, se evaluó en ratones nu/nu que portaban tumores KB subcutáneos. Aproximadamente 8 días después de la inoculación del tumor en el subcutáneo de la axila derecha con 1×10^6 KB de células (volumen promedio del tumor a t_0 = 50-100 mm³), en ratones (5/grupo) se inyectaron i.v. tres veces a la semana (TIW), durante 3 semanas con 5 μ mol/kg del conjugado de administración del fármaco o con un volumen de dosis equivalente de PBS (control), a menos que se indique lo contrario. El crecimiento del tumor se midió usando calibradores a intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes de tumores se calcularon usando la ecuación $V = a \times b^2/2$, donde "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

Ensayo general de tumores M109. La actividad antitumoral de los compuestos descritos en este documento, cuando se administró por vía intravenosa (i.v.) a animales portadores de tumores, se evaluó en ratones Balb/c portadores de tumores M109 subcutáneos (un carcinoma de pulmón singénico). Aproximadamente 11 días después de la inoculación del tumor en el subcutáneo de la axila derecha con 1×10^6 células M109 (volumen promedio del tumor a t_0 = 60 mm³), se inyectaron ratones (5/grupo) i.v. tres veces a la semana (TIW), durante 3 semanas con 1500 nmol/kg del conjugado de administración del fármaco o con un volumen de dosis equivalente de PBS (control). El crecimiento del tumor se midió usando calibradores a intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes de tumores se calcularon usando la ecuación $V = a \times b^2/2$, donde "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

Ensayo general de tumores 4T-1. Se obtuvieron ratones de seis a siete semanas de edad (cepa Balb/c hembra) de Harlan, Inc., Indianapolis, IN. Los ratones se mantuvieron en el alimento sin ácido fólico de Harlan durante un total de tres semanas antes del inicio y durante este experimento. Se inocularon células tumorales 4T-1 con receptor de folato negativo (1×10^6 células por animal) en el subcutáneo de la axila derecha. Aproximadamente 5 días después de la inoculación del tumor cuando el volumen promedio del tumor 4T-1 fue de aproximadamente 100 mm³, se inyectaron ratones (5/grupo) i.v. tres veces a la semana (TIW), durante 3 semanas con 3 μ mol/kg de conjugado de administración de fármacos o con un volumen de dosis equivalente de PBS (control), a menos que se indique lo contrario en este documento. El crecimiento del tumor se midió usando calibradores a intervalos de 2 días o 3 días en cada grupo de tratamiento. Los volúmenes de tumores se calcularon usando la ecuación $V = a \times b^2/2$, donde "a" es la longitud del tumor y "b" es el ancho expresado en milímetros.

Los datos mostrados en las Figuras 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A y 10A indican que los conjugados descritos en este documento muestran una eficacia superior en el tratamiento de tumores en comparación con los correspondientes compuestos no conjugados. Tratamiento de ratones Balb/c con tumores M109 s.c. con EC0396 y EC145 (Figura 4A) llevaron a respuestas completas en todos los animales tratados (3/3 para EC0396 y 5/5 para EC145). Además, después de casi 70 días, no se observó recurrencia de la enfermedad. De manera similar, el tratamiento con EC0400 (Figura 5A) llevó a una respuesta completa y no a la recurrencia de la enfermedad después de casi 70 días. El tratamiento con los compuestos conjugados descritos en este documento que incluyen un enlazante espaciador hidrófilo (por ejemplo, EC0436) fue superior a los conjugados de comparación que carecen de enlazantes espaciadores hidrófilos (por ejemplo, EC0305) mostró una eficacia superior (Figura 8A). EC0436 mostró una respuesta completa en 5/5 animales sin recurrencia de la enfermedad después de 90 días.

Determinaciones de toxicidad de fármaco. La toxicidad persistente del fármaco se evaluó mediante la recolección de sangre mediante punción cardíaca y la presentación del suero para el análisis independiente de nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, proteína total, AST-SGOT, ALT-SGPT más un panel de células hematológicas estándar en Ani-Lytics, Inc. (Gaithersburg, MD). Además, los patólogos certificados por la junta de los Laboratorios de Patología de Referencia Animal (ARUP; Salt Lake City, Utah) realizaron una evaluación histopatológica del corazón, pulmones, hígado, bazo, riñón, intestino, músculo esquelético y hueso fijados con formalina).

Toxicidad medida por la pérdida de peso. El porcentaje de cambio de peso se determinó en ratones (5 ratones/grupo) en los días seleccionados después de la inoculación del tumor (PTI), en comparación con los controles, y se graficó. Como se muestra en las Figuras 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B y 10B, los compuestos conjugados descritos en este documento mostraron una toxicidad igual o menor en comparación con los compuestos no conjugados, según lo determinado por el porcentaje de pérdida de peso.

MTD_{app} de dosis única y múltiple en ratones. Los compuestos descritos en este documento pueden mostrar una proporción positiva entre el número de enlazantes espaciadores hidrófilos incluidos en el conjugado y la dosis máxima tolerada en ratones para una dosis única. Por ejemplo, los siguientes conjugados de vinblastina descritos en este documento en comparación con un conjugado de control se muestran en la siguiente tabla.

Compuesto	No. de enlazantes hidrófilos	Dosis única de MTD _{app} (μmol/kg)
EC145	0	15
EC0234	1	12*
EC0246	2	<20**
EC0263	3	>20
* dosis limitada por solubilidad; ** 1/3 ratones murió a 20 μmol/kg.		

EC0436 y el ejemplo comparativo EC0305 también se administraron i.v. a ratones Balb/c TIW durante 1 semana. La MTD resultante para la dosis múltiple fue EC0305 (6 mmol/kg) y EC0436 (9 mmol/kg). Los datos indican que EC0436 se puede dosificar a niveles 50 % mayores que EC0305.

Unión de suero. Unión en suero de conjugados de folato-DAVLBH que contienen enlazantes espaciadores hidrófilos en comparación con el ejemplo comparativo EC 145 que carece de un enlazante espaciador hidrófilo compuesto 50 μM en suero con filtración de 30 K de NMWL y evaluación por HPLC-UV detección (n = 3).

Compuesto	Suero humano (% unido)	SD	Suero de ratón (% unido)	SD
EC145	54,3	1,6	67,3	2,6
EC0396	42,7	4,4	72,2	5,2
EC0400	61,1	1,9	75,5	1,4

Eliminación biliar. Comparación de la eliminación biliar (% ID) del fármaco no conjugado, el conjugado de fármaco que carece de un enlazante espaciador hidrófilo y los conjugados descritos en este documento.

Compuesto	Espaciador	Eliminación biliar (%ID)
DAVLBH	Ninguno	58,0
EC145	espaciador no hidrófilo	8,7
EC0234	Mono-ribosilo	10,6
EC0246	Bis-ribosilo	4,7
EC0258	Tri-ribosilo	3,2
EC0434	Tetra-ribosilo	2,8

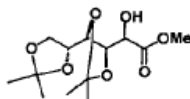
(continuación)

Compuesto	Espaciador	Eliminación biliar (%ID)
EC0400	Mono-glucurónido	6,3
EC0423	Bis-glucurónido	3,9
EC0409	PEG ₁₂	7,9
EC0429	Piperazina/Asp	8,6

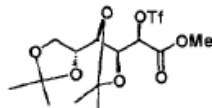
Los resultados mostrados en las Figuras 11 y 13 indican una disminución del 76 % en la eliminación hepática de EC0434, que incluye los enlazantes espaciadores hidrófilos descritos en este documento, en comparación con el EC145 estándar. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que estos resultados corresponden a una eliminación hepática no específico y, en consecuencia, se sugiere que se puedan administrar dosis significativamente más bajas de aquellos conjugados que incluyen el enlazante espaciador hidrófilos descrito en este documento en comparación con los conjugados correspondientes que no incluyen tales enlazantes. Además, sin limitarse a la teoría, se sugiere que la eliminación hepática conduce a la dosis que limita la toxicidad relacionada con GI que se observa con algunos conjugados.

Análisis de transferencia Western. Los datos que se muestran en la Figura 13 indican que EC0565 (folato-azúcar-everolimus) puede causar una reducción dependiente de la dosis y específica de los objetivos posteriores de mTOR (objetivo intracelular para everolimus). Sin pretender imponer ninguna teoría, creía que el folato libera everolimus dentro de la célula, donde everolimus inhibe el mTOR, que es el objetivo de la rapamicina en los mamíferos y la quinasa ser/thr. La inhibición de los objetivos de aguas abajo de mTOR (P70 S6-quinasa y Ribosomal S6) resulta, como se muestra en la transferencia de Western.

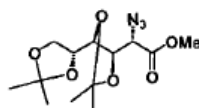
Ejemplos de compuestos (no todos los ejemplos son parte de la invención como se reivindica)



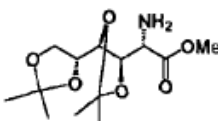
Ejemplo. (3,4), (5,6) éster metílico del ácido bisacetono-D-glucónico. En un matraz de fondo redondo seco de 250 ml, bajo argón δ -gluconolactona (4,14 g, 23,24 mmol) se suspendió en acetona-metanol (50 ml). A esta suspensión se le agregaron dimetoxipropano (17,15 ml, 139,44 mmol) seguido de una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico (200 mg). Esta solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La TLC (50 % de EtOAc en éter de petróleo) mostró que todo el material de partida se había consumido y se había formado el producto. La acetona-metanol se eliminó a presión reducida. El residuo de la reacción se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a sequedad. Este material se cargó luego en una columna de SiO_2 y se sometió a cromatografía (30 % de EtOAc en éter de petróleo) para producir éster metílico del ácido puro (3,4), (5,6) -bisacetono-D-glucónico (3,8 g, 56 %) y éster metílico del ácido regio-isómero (2,3), (5,6) -bisacetono-D-glucónico (0,71 g, 10 %). Los datos de ^1H RMN estaban de acuerdo con los productos requeridos. $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_7$; MW 290.31; Masa exacta: 290,14.



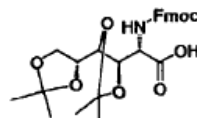
Ejemplo. (3,4), (5,6) éster metílico del ácido bisacetono-2-OTf-D-glucónico. En un matraz seco de fondo redondo de 100 ml, bajo argón (3,4), (5,6) se disolvió metil éster del ácido bisacetono-D-glucónico (3,9 g, 13,43 mmol) en cloruro de metileno (40 ml) y se enfrió a -20°C a -25°C . A esta solución se añadieron piridina (3,26 ml, 40,29 mmol) seguido de anhídrido triflico (3,39 ml, 20,15 mmol). Esta solución blanca turbia se agitó a -20°C durante 1 h. La TLC (EtOAc al 25 % en éter de petróleo) mostró que todo el material de partida se había consumido y se había formado el producto. La mezcla de reacción se vertió en hielo triturado y se extrajo con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró para producir (3,4), (5,6) éster metílico del ácido -bisacetono-2-OTf-D-glucónico (5,5 g, 97 %). Este material se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_9\text{S}$; MW 422,37; Masa exacta: 422,09.



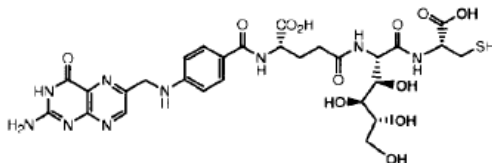
Ejemplo. Éster metílico del ácido (3,4), (5,6) -isacetonido-2-Deoxi-2-acido-D-manónico. En un matraz seco de fondo redondo de 100 ml, bajo argón (3,4), (5,6) se disolvió metil éster de ácido metis-acetonida-2-OTf-D-glucónico (5,5 g, 13,02 mmol) en DMF (20 ml). A esta solución se le añadió NaN₃ (0,93 g, 14,32 mmol). Esta solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La TLC (8 % de EtOAc en éter de petróleo, triple ciclo) mostró que se había consumido todo el material de partida y se había formado el producto. Se eliminó la DMF a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó con salmuera y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. Este material crudo se cargó luego en una columna de SiO₂ y se sometió a cromatografía (20 % de EtOAc en éter de petróleo) para producir ácido puro (3,4), (5,6) -bisacetonide-2-deoxi-2-acido-D-manónico metilo éster (3,8 g, 93 %). Los datos de ¹H RMN estaban de acuerdo con el producto. C₁₃H₂₁N₃O₆; MW 315.32; Masa exacta: 315,14.



Ejemplo. Éster metílico del ácido (3,4), (5,6) - bisacetonido - 2 - Desoxi - 2 - amino - D - manónico. En un matraz de hidrogenación Parr, se disolvió éster metílico del ácido (3,4), (5,6) -bisacetonido-2-deoxi-2-acido-D-manónico (3,5 g, 11,10 mmol) en metanol (170 ml). A esta solución se le añadió 10 % de Pd sobre carbono (800 mg, 5 % en moles). La hidrogenación se llevó a cabo usando hidrogenador Parr a 25 PSI durante 1 h. La TLC (metanol al 10 % en cloruro de metileno) mostró que todo el material de partida se había consumido y se había formado el producto. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite y se concentró a sequedad. Este material bruto se cargó luego en una columna de SiO₂ y se sometió a cromatografía (metanol al 2 % en cloruro de metileno) para producir ácido puro (3,4), (5,6) -bisacetonido-2-deoxi-2-amino-D-manónico. éster (2,61 g, 81 %). Los datos de ¹H RMN estaban de acuerdo con el producto. C₁₃H₂₃NO₆S MW 289,32; Masa exacta: 289,15.



Ejemplo. Ácido (3,4), (5,6) -bisacetonide-2-Deoxi-2-Fmoc-Amino-D-Manónico. En un matraz seco de fondo redondo de 100 ml, se disolvió éster metílico del ácido (3,4), (5,6) -bisacetonido-2-deoxi-2-amino-D-manónico (1,24 g, 4,29 mmol) en THF/MeOH (20 ml/5 ml). A esta solución, se agregó LiOH · H₂O (215,8 mg, 5,14 mmol) en agua (5 ml). Esta solución de color amarillo claro se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La TLC (metanol al 10 % en cloruro de metileno) mostró que todo el material de partida se había consumido y se había formado el producto. Se eliminó el THF/MeOH a presión reducida. La fase acuosa se resuspendió en sat. NaHCO₃ (10 ml). A esta suspensión se le añadió Fmoc-OSu (1,74 g, 5,14 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml). Esta solución heterogénea se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La TLC (metanol al 10 % en cloruro de metileno) mostró que la mayor parte del material de partida se había consumido y se había formado el producto. El dioxano se eliminó a presión reducida. La capa acuosa se extrajo con éter dietílico para eliminar menos impurezas polares. Luego, la capa acuosa se acidificó a pH 6 usando HCl 0,2 N y se volvió a extraer con EtOAc. La capa de EtOAc se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para producir (3,4), (5,6) -bisacetonide-2-deoxi-2-Fmoc-amino-D-manonónico (1,6 g, 76 %). Este material se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. Los datos de ¹H RMN estaban de acuerdo con el producto. C₂₇H₃₁O₈; MW 497.54; Masa exacta: 497,20.



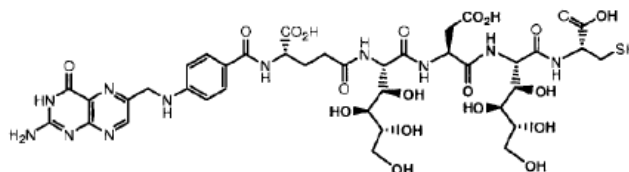
Ejemplo. EC0233 se sintetizó por SPPS en tres etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,56			1,0g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,7	1,25	497,54	0,348g
Fmoc-Glu-OtBu	1,12	2	425,5	0,477g
Ácido N ¹⁰ TFA-Pterico (disolver en 10ml DMSO)	0,70	1,25	408	0,286g
DIPEA	2,24	4	129,25 (d = 0,742)	0,390ml
PyBOP	1,12	2	520	0,583g

5 Etapas de acoplamiento. En un recipiente de síntesis de péptidos, agregue la resina, agregue la solución de aminoácidos, DIPEA y PyBOP. Burbuja de argón durante 1 h. y lavar 3X con DMF e IPA. Use 20 % de piperidina en DMF para la desprotección de Fmoc, 3X (10min), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. Continuar para completar las 3 etapas de acoplamiento. Al final, lave la resina con 2 % de hidrazina en DMF 3X (5min) para escindir el grupo protector de TFA en ácido pterico.

10 Etapa de escisión. Reactivo de escisión: 92,5 % (50 ml) TFA, 2,5 % (1,34 ml) H₂O, 2,5 % (1,34 ml) triisopropilsilano, 2,5 % (1,34 ml) etanoditiol. Se añaden 25 ml de reactivo de escisión y burbuja de argón durante 20 minutos, drene y lave 3X con el reactivo restante. Se coloca en el rotavapor hasta que queden 5 ml y se precipita en éter etílico. Centrifugar y secar.

Etapa de purificación por HPLC. Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: 1 % de B a 20 % de B en 40 minutos a 15 ml/min; rendimiento de ~202 mg, 50 %. C₂₈H₃₅N₉O₁₂S; MW 721.70; Masa exacta: 721,21.



15 Ejemplo. Enlazante Bis-Saccharo-Folato EC0244. EC0244 se sintetizó por SPPS en cinco etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

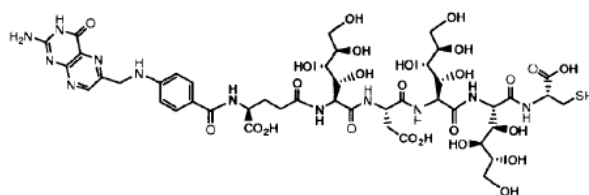
Reactivos	mmol	Equivalente	MW	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,56			1,0g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,7	1,25	497,54	0,348g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	1,12	2	411,5	0,461g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,7	1,25	497,54	0,348g
Fmoc-Glu-OtBu	1,12	2	425,5	0,477g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	cantidad
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,70	1,25	408	0,286g
DIPEA	2,24	4	129,25 (d = 0,742)	0,390m
PyBOP	1,12	2	520	0.583g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento de ~284 mg, 50 %. C₃₈H₅₁N₁₁O₂₀S; MW 1013.94; Masa exacta: 1013,30.

5

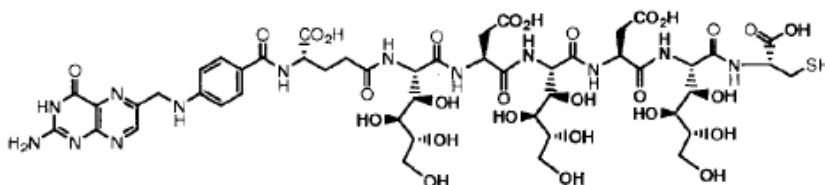


Ejemplo. EC0257 se sintetizó mediante SPPS en seis etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,2			0,333g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,4	2	411,5	0,165g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu-OtBu	0,4	2	425,5	0,170g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,25	1,25	408	0,119g
DIPEA	0,8	4	129,25 (d = 0,742)	0,139ml
PyBOP	0,4	2	520	0,208g

10

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento ~170 mg, 71 %. C₄₄H₆₂N₁₂O₂₅S; MW 1191.09; Masa exacta: 1190,37.

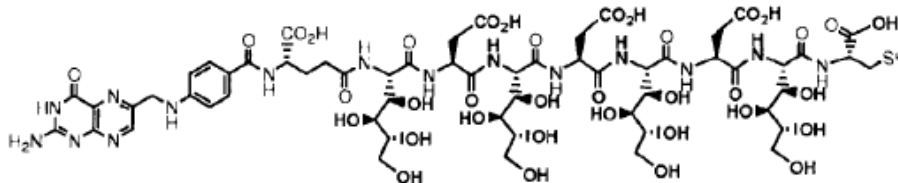


Ejemplo. EC0261 se sintetizó por SPPS en siete etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalen te	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina carga 0,56mmol/g)	0,2			0,333g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,4	2	411,5	0,165g
(Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,4	2	411,5	0,165g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu-OtBu	0,4	2	425,5	0,170g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,25	1,25	408	0,119g
DIPEA	0,8	4	129,25 (d = 0,742)	0,139ml
PyBOP	0,4	2	520	0,208g

5

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento ~170 mg, 65 %. C₄₈H₆₇N₁₃O₂₈S; MW 1306,18; Masa exacta: 1305,39.

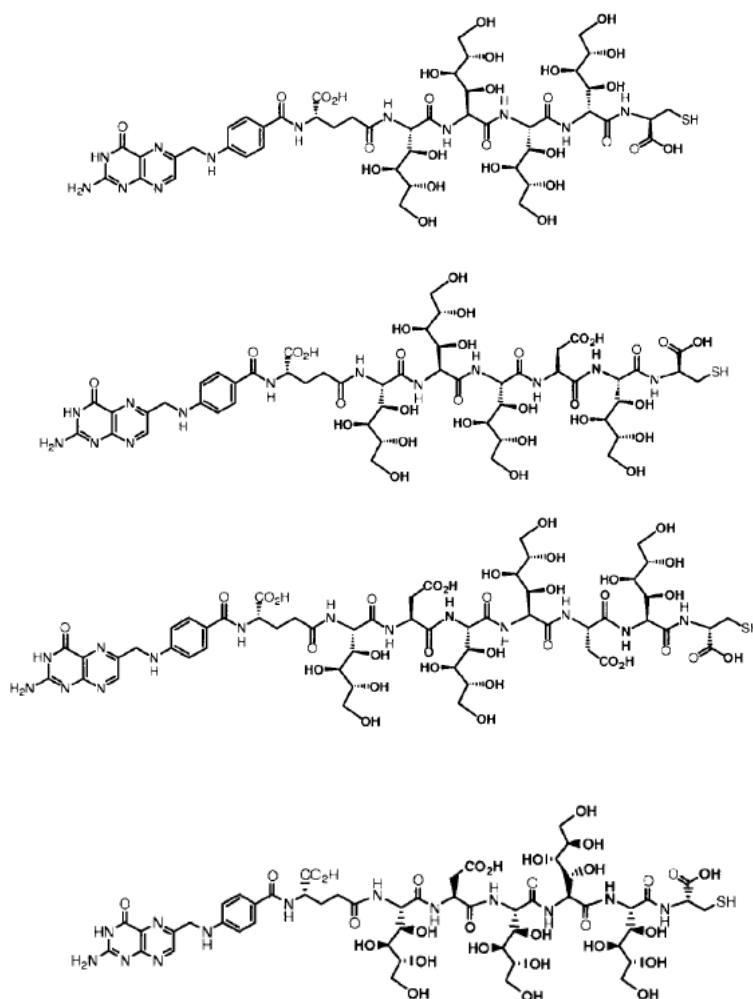


10 Ejemplo. Enlazante Tetra-Saccharo-Tris-Asp-Folato EC0268. EC0268 se sintetizó por SPPS en nueve etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,1			0,167g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,2	2	411,5	0,082g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,2	2	411,5	0,082g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,2	2	411,5	0,082g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Fmoc-Glu-OtBu	0,2	2	425,5	0,085g
Ácido N ¹⁰ TFA-Pterico (disolver en 10ml DMSO)	0,125	1,25	408	0,059g
DIPEA	0,4	4	129,25 (d = 0,742)	0,070ml
PyBOP	0,2	2	520	0.104g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento ~100 mg, 63 %. C₉₄H₁₂₅N₁₉O₃₇S₂; MW 2177,24; Masa exacta: 2175,79.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustrativos pueden prepararse de acuerdo con el procedimiento para EC0268:



Ejemplo. Enlazante Tetra-Saccharo-Asp-Folato EC0463. EC0463 se sintetizó mediante SPPS en siete etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

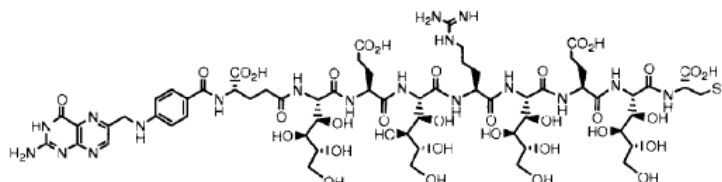
5

Reactivos	mmol	Equivalen te	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritilo)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,1			0,167g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
(Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,2	2	411,5	0,082g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,125	1,25	497,54	0,062g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
Fmoc-Glu-OtBu	0,2	2	425,5	0,085g
Ácido N ¹⁰ TFA-Pterico (disolver en 10ml DMSO)	0,125	1.25	408	0,059g
DIPEA	0,4	4	129,25 (d = 0,742)	0,070ml
PyBOP	0,2	2	520	0,104g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento ~63 mg, 46 %. C₅₀H₇₃N₁₃O₃₀S; MW 1368.25; Masa exacta: 1367,43.



Ejemplo. Enlazante Tetra-Saccharo-Bis-α-Glu-Arg-Folato EC0480. EC0480 se sintetizó mediante SPPS en nueve etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

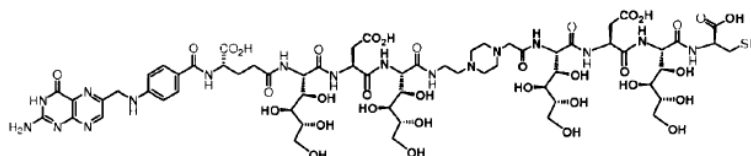
Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,2			0,333g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,250	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,4	2	425,5	0,170g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,250	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0,4	2	648,78	0,260g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,250	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,4	2	425,5	0,170g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,250	1,25	497,54	0,124g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalent e	MW	Cantidad
Fmoc-Glu-OtBu	0,4	2	425,5	0,170g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,250	1,25	408	0,119g
DIPEA	0,8	4	129,25 (d = 0,742)	0,139ml
PyBOP	0,4	2	520	0,208g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión, el reactivo de escisión y la etapa de purificación por HPLC fueron idénticas a las descritas anteriormente; rendimiento ~100 mg, 33 %. C₆₂H₉₄N₁₈O₂₀S; MW 1667.58; Masa exacta: 1666,59.

Ejemplo. Enlazante tetra-sacaro-bis-asp-folato EC0452:



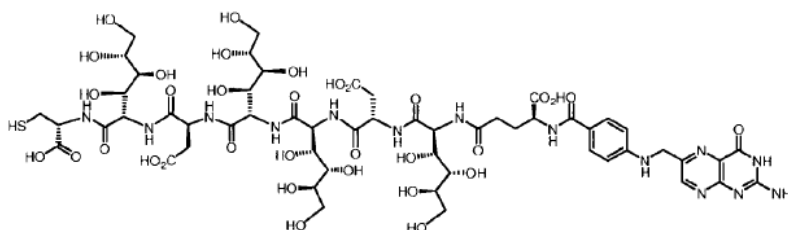
Ejemplo. Enlazante tetra-sacaro-bis-asp-folato EC0452. EC0452 se sintetizó mediante SPPS en nueve etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos SPPS

Reactivos	mmol	Equivalen te	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,6mmol/g)	0,15			0,250g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetone-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,188	1,25	497,54	0,094g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,3	2	411,5	0,123g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetone-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,188	1,25	497,5	0,094g
Fmoc-4-(2-aminoetil)-1-carboximetil- diclorhidrato de piperazina	0,3	2	482,42	0,145g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetone-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,188	1,25	497,54	0,094g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,3	2	411,5	0,123g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetone-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,188	1,25	497,54	0,094g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
Fmoc-Glu-OtBu	0,3	2	425,5	0,128g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,188	1,25	408	0,077g
DIPEA	0,6	4	129,25 (d = 0,742)	0,105ml
PyBOP	0,3	2	520	0,156g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión y el reactivo de escisión fueron idénticos a los descritos anteriormente. Paso de purificación por HPLC. Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x 19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: 1 % de B a 20 % de B en 40 minutos a 25 ml/min; rendimiento de ~98 mg, 40 %. C₆₂H₉₃N₁₇O₃₄S; MW 1652.56; Masa exacta: 1651,58.



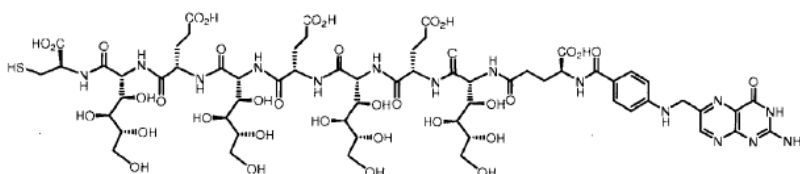
Ejemplo. Enlazante Tetra-Saccharo-bis-Asp-Folato EC0457. EC0457 se sintetizó mediante SPPS en ocho etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos SPPS

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0, 6mmol/g)	0,20			0,333g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,30	1,5	411,5	0,123g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,30	1,5	411,5	0,123g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu-OtBu	0,30	1,5	425,5	0,128g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,25	1,25	408	0,102g
DIPEA		2 eq. de aminoácido	129,25 (d = 0,742)	87µl o 105 µl
PyBOP		2 eq. de aminoácido	520	260 mg o 312mg

5 Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión y el reactivo de escisión fueron idénticos a los descritos anteriormente. Paso de purificación por HPLC. Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x 19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: 0 % B a 20 % B en 40 minutos a 25 ml/min; Rendimiento -210 mg, 71 %. C₅₄H₇₈N₁₄O₃₃S; MW 1483.34; Masa exacta: 1482,46.



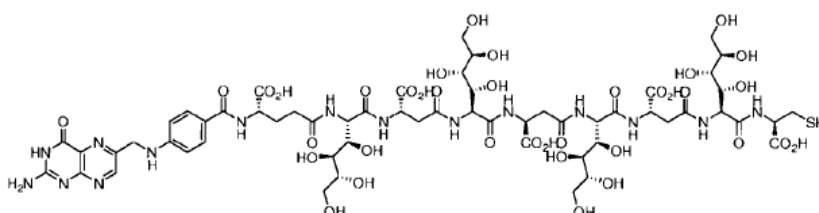
10 Ejemplo. Enlazante Tetra-Saccharo-tris-Glu-Folato EC0477. EC0477 se sintetizó por SPPS en nueve etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina. y los siguientes reactivos SPPS

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,6mmol/g)	0,20			0,333g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,30	1,5	425,5	0,128g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,30	1,5	425,5	0,128g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,30	1,5	425,5	0,128g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,25	1,25	497,54	0,124g
Fmoc-Glu-OtBu	0,30	1,5	425.5	0,128g

(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
Ácido N ¹⁰ TFA-Pteroico (disolver en 10ml DMSO)	0,25	1,25	408	0,102g
DIPEA		2 eq. de aminoácido	129,25 (d = 0,742)	87µl o 105 µl
PyBOP		1 eq. de aminoácido	520	130 mg o 156mg

5 Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión y el reactivo de escisión fueron idénticos a los descritos anteriormente. Paso de purificación por HPLC. Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: del 0 % de B al 20 % de B en 40 minutos a 25 ml/min; Rendimiento -220 mg, 67 %. C₆₁H₈₉N₁₅O₃₆S; MW 1640.50; Masa exacta: 1639,53.



Ejemplo. EC0453 se sintetizó mediante SPPS de acuerdo con el procedimiento de síntesis de péptidos general descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalent e	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resin (carga 0,56mmol/g)	0,162			0,290 g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,203	1,25	497,54	0,101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,324	2	411,5	0,133 g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,203	1,25	497,54	0,101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,324	2	411,5	0,133 g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,203	1,25	497,54	0,101 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,324	2	411,5	0,133 g
Ácido (3,4), (5,6)-bisacetono-2-desoxi-2-Fmoc-amino-D-mannónico	0,203	1,25	497,54	0,101 g
Fmoc-Glu-OtBu	0,324	2	425,5	0,138 g
Ácido N ¹⁰ TFA-Pteroico (disolver en 10ml DMSO)	0,203	1,25	408	0,083 g

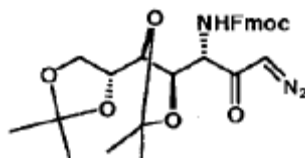
(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalent e	MW	Cantidad
DIPEA		2 eq de AA		71 μ l o 85 μ l
PyBOP		1 eq de AA		211 mg o 253 mg

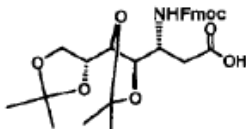
5 Etapas de acoplamiento. En un recipiente de síntesis de péptidos, agregue la resina, agregue la solución de aminoácidos, DIPEA y PyBOP. Burbuja de argón durante 1 h. y lavar 3X con DMF e IPA. Use 20 % de piperidina en DMF para la desprotección de Fmoc, 3X (10min), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. Continuar para completar las 9 etapas de acoplamiento. Al final, trate la resina con un 2 % de hidrazina en DMF 3X (5min) para escindir el grupo protector de TFA en ácido ptericoico, lave la resina con DMF (3X), IPA (3X), MeOH (3X) y burbujee la resina con argón durante 30 min.

10 Etapa de escisión. Reactivo de escisión: 92,5 % de TFA, 2,5 % de H₂O, 2,5 % de triisopropilsilano, 2,5 % de etanoditiol. Tratar la resina con reactivo de escisión 3 veces (15 min, 5 min, 5 min) con burbujeo de argón, escurrir, recoger y combinar la solución. Se coloca en el rotavapor hasta que queden 5 ml y se precipita en éter dietílico (35 ml). Centrifugar, lavar con éter dietílico y secar. El sólido bruto se purificó por HPLC.

15 Etapa de purificación por HPLC. Columna: Waters Xterra Prep MS C₁₈ 10 μ m 19x250 mm; Solvente A: acetato de amonio 10 mM, pH 5; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 0 % B a 40 min 20 % B 25 ml/min; Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron para dar 60 mg de EC0453 (rendimiento del 23 %). ¹H RMN y LC/MS fueron consistentes con el producto. C₅₈H₈₃N₁₅O₃₆S; MW 1598.43; Masa exacta: 1597.48. C, 43,58; H, 5,23; N, 13,14; O, 36,03; S, 2,01.

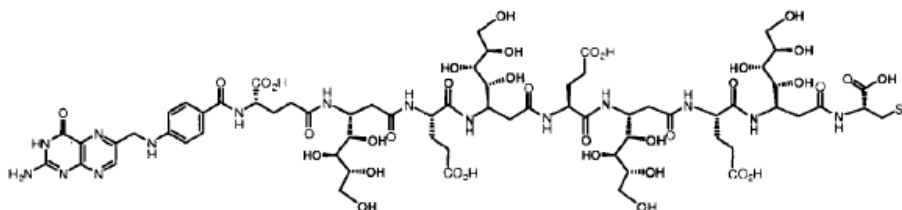


20 Ejemplo. ácido (3,4), (5,6) -bisacetono-2-deoxi-2-Fmoc-amino-D- manónico-diazo-cetona. En un matraz de fondo redondo seco de 100 ml, se disolvió (THG) (3,4 g, 2,01 mmol) ácido (3,4), (5,6) -bisacetono-2-deoxi-2-Fmoc-amino-D-manonónico (1,0 g, 2,01 mmol) ml, no completamente disuelto) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a -25°C. A esta solución, se añadieron NMM (0,23 ml, 2,11 mmol) y cloroformato de etilo (228,98 mg, 2,11 mmol). Esta solución se agitó a -20°C durante 30 min. La suspensión blanca resultante se dejó calentar a 0°C y se añadió una solución de diazometano en éter hasta que persistió el color amarillo. Se continuó la agitación a medida que la mezcla se dejaba calentar a temperatura ambiente. Se agitó durante 2 h, se destruyó el exceso de diazometano mediante la adición de unas pocas gotas de ácido acético con agitación vigorosa. La mezcla se diluyó con éter, se lavó con una solución sat. aq. de NaHCO₃, sat. aq. NH₄Cl, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. Este material bruto se cargó luego en una columna de SiO₂ y se sometió a cromatografía (30 % de EtOAc en éter de petróleo) para producir (3,4), (5,6) -bisacetono-2-deoxi-2-Fmoc-amino-D-manonónico. ácido-diazo-cetona (0,6 g, 57 %). Los datos de ¹H RMN estaban de acuerdo con el producto. C₂₈H₃₁N₃O₇; MW 521.56; Masa exacta: 521,22.



35 Ejemplo. Ácido (3R, 4R, 5S, 6R) - (4,5), (6,7) - bisacetono-2-deoxi-2-Fmoc-amino-D-manonónico ácido-diazo-cetona (0,15 g, 0,29 mmol) en THF (1,6 ml) bajo atmósfera de argón. A esta solución se le añadió en la oscuridad trifluoroacetato de plata (6,6 mg, 0,03 mmol) en agua (0,4 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La TLC (10 % de MeOH en cloruro de metileno) mostró que se había consumido todo el material de partida y se había formado el producto. El Solvente (THF) se eliminó a presión reducida, el residuo se diluyó con agua (el pH fue de 3,5-4,0) y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y

se concentró a sequedad. Este material bruto se cargó luego en una columna de SiO₂ y se sometió a cromatografía (elución en gradiente de MeOH al 1 % en cloruro de metileno a MeOH al 5 % en cloruro de metileno) para dar pureza (3R, 4R, 5S, 6R) - (4,5), (Ácido 6,7) -bisacetono-3-Fmoc-amino-heptanoico (0,10 g, 68 %). Los datos de ¹H RMN estaban de acuerdo con el producto. C₂₈H₃₃NO₈; MW 511.56; Masa exacta: 511,22.

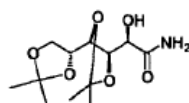


5

Ejemplo. Tetra-Homosaccharo-Tris-αGlu-Folato Espaciador EC0478. EC0478 se sintetizó por SPPS en nueve etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

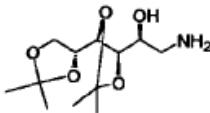
Reactivos	mmol	Equivalen te	MW	Cantida d
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,1			0,167g
Homo azúcar	0,12	1,2	511,56	0,061g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,2	2	425,5	0,085g
Homo azúcar	0,12	1,2	511,56	0,061g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,2	2	425,5	0,085g
Homo azúcar	0,12	1,2	511,56	0,061g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,2	2	425,5	0,085g
Homo azúcar	0,12	1,2	511,56	0,061g
Fmoc-Glu-OtBu	0,2	2	425.5	0,085g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,12	1,2	408	0,049g
DIPEA	0,4	4	129,25 (d = 0,742)	0,070ml
PyBOP	0,2	2	520	0,104g

- 10 Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión y el reactivo de escisión fueron idénticos a los descritos anteriormente. Paso de purificación de HPLC: Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: 100 % de A durante 5 min, luego de 0 % de B a 20 % de B en 20 minutos a 26 ml/min; rendimiento ~88 mg, 52 %. C₆₅H₉₇N₁₅O₃₆S; MW 1696.61; Masa exacta: 1695,59.

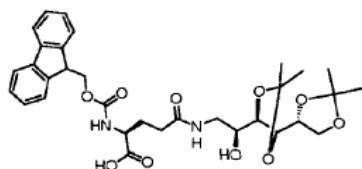


- 15 Ejemplo. (3,4), (5,6) -isacetono-D-amida glucónica. Se disolvieron 20 g del éster metílico en 100 ml de metanol, se enfrió el recipiente de reacción a alta presión con hielo seco/acetona, se cargó con 100 ml de amoníaco líquido, se calentó a temperatura ambiente y se calentó a 160°C/850 PSI durante 2 horas. El recipiente de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se liberó la presión. La evaporación del Solvente dio un jarabe pardo y se añadió una cantidad mínima de alcohol isopropílico para obtener una solución homogénea con reflujo. La solución se enfrió a -20°C y el sólido resultante se filtró para dar 8,3 g de sólido. El líquido madre se evaporó, y al residuo resultante, se

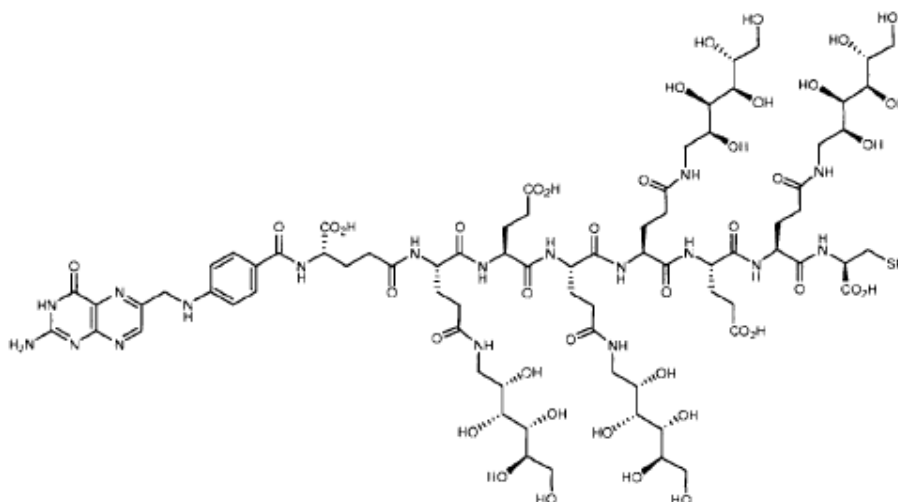
añadió éter a reflujo hasta que se logró una solución homogénea. La solución se enfrió luego a -20°C y el sólido resultante se filtró para dar 4,0 g de producto. El sólido se combinó y se recrystalizó en alcohol isopropílico para dar 11,2 g (59 %) del producto de amida blanca. $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_6$; MW 275,30; Masa exacta: 275,14.



- 5 Ejemplo. (3,4), (5,6) -bisacetono-1-Deoxi-1-amino-D-Glucitol. En un matraz de fondo redondo seco de 100 ml, bajo argón, se disolvió LiAlH_4 (450 mg, 11,86 mmol) en THF (10 ml) y se enfrió a 0°C . A esta suspensión (3,4), (5,6) -bisacetono-1-D-glucónica amida (1,09 g, 3,96 mmol) en THF (30 ml) se añadió muy lentamente durante 15 minutos. Esta mezcla se sometió a reflujo durante 5 h. La TLC (10 % de MeOH en cloruro de metileno) mostró que se había consumido todo el material de partida y se había formado el producto. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y luego se enfrió a temperatura de baño de hielo, se diluyó con éter dietílico (40 ml), se añadieron lentamente 0,5 ml de agua, 0,5 ml de solución acuosa al 15 % NaOH, y luego se añaden 1,5 ml de agua. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. Se añadió MgSO_4 y se agitó durante 15 minutos adicionales y se filtró. La capa orgánica se concentró a sequedad para dar (3,4), (5,6) -bisacetono-1-desoxi-1-amino-D-glucitol. Los datos de ^1H RMN estaban de acuerdo con el producto. $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_5$; MW 261,31; Masa exacta: 261,16.



- Ejemplo. EC0475. Se añadió Fmoc-Glu protegido con O-alilo (2,17 g, 1 eq), PyBOP (2,88 g, 1 eq) y DIPEA (1,83 ml, 2 eq) a una solución de (3,4), (5,6) -bisacetono-1-desoxi-1-amino-D-glucitol (1,4 g, 5,3 mmol) en DMF seco (6 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo Ar durante 2 h. La solución se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con salmuera (10 ml x 3), la capa orgánica se separó, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró para dar un residuo, que se purificó mediante una columna instantánea (gel de sílice, 60 % de EtOAc/éter de petróleo) para proporcionar 1,72 g (50 %) de EC0475 protegido con alilo como un sólido. Se añadió $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (300 mg, 0,1 eq) a una solución de EC0475 protegido con alilo (1,72 g, 2,81 mmol) en NMM/ACOH/ CHCl_3 (2 ml/4 ml/74 ml). La solución amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo Ar durante 1 h, a lo que se añadió una segunda porción de $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (300 mg, 0,1 eq). Después de agitar durante 1 h adicional, la mezcla se lavó con HCl 1 N (50 ml x 3) y salmuera (50 ml), se separó la capa orgánica, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró para dar un sólido espumoso amarillo, que se sometió a cromatografía (gel de sílice, MeOH/ CHCl_3 al 1 % seguido de MeOH/ CHCl_3 al 3,5 %) para dar 1,3 g (81 %) de EC0475 como un material sólido. MW 612,67; Masa exacta: 612,27.

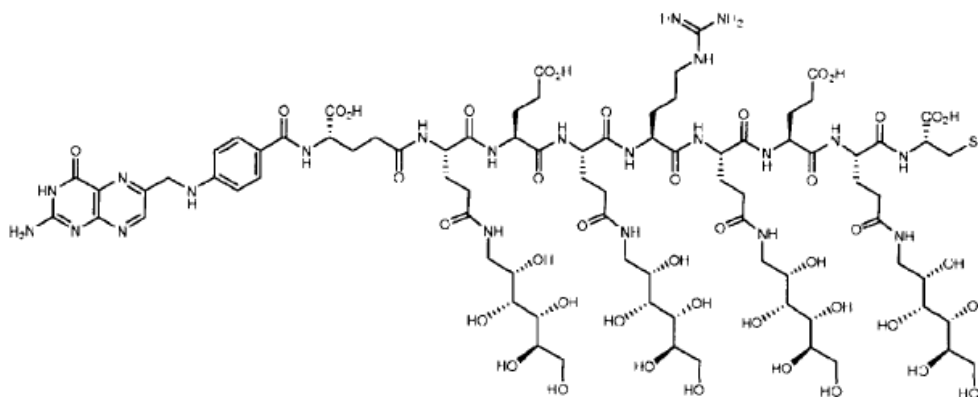


- 30 Ejemplo. Espaciador Tetra-Saccharo-glutamato-Bis-αGlu-Folato EC0491. EC0491 fue sintetizado por SPPS en ocho etapas de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) - 2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos SPPS:

Reactivos	Mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,56mmol/g)	0,1			0,167g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,2	2	425,5	0,085g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,080g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,080g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,2	2	425,5	0,085g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,080g
Fmoc-Glu-OtBu	0,2	2	425,5	0,085g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,2	2	408	0,105g
DIPEA	0,4	4	129,25 (d = 0,742)	0,070ml
PyBOP	0,2	2	520	0,104g

Las etapas de acoplamiento, la etapa de escisión y el reactivo de escisión fueron idénticos a los descritos anteriormente. Paso de purificación de HPLC: Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm; Solución reguladora A = acetato de amonio 10 mM, pH 5; B = ACN; Procedimiento: 100 % de A durante 5 min, luego de 0 % de B a 20 % de B en 20 minutos a 26 ml/min; rendimiento ~100 mg, 51 %. C₇₆H₁₁₈N₁₈O₄₁S; MW 1971.91; Misa exacta: 1970,74.

5



Ejemplo. EC0479 se sintetizó mediante SPPS de acuerdo con el procedimiento de síntesis de péptidos general descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0,6mmol/g)	0,094			0,16 g
EC0475	0,13	1,4	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,19	2,0	425,47	0,080 g

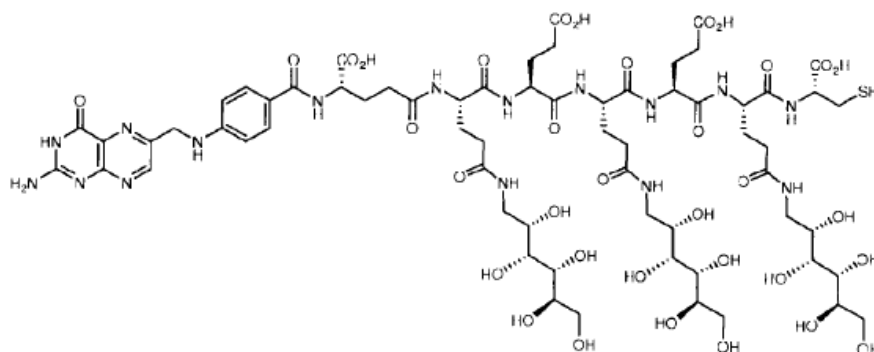
(continuación)

Reactivos	mmol	Equivalente	MW	Cantidad
EC0475	0,13	1,4	612,67	0,082 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0,19	2,0	648,77	0,12 g
EC0475	0,13	1,4	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,19	2,0	425,47	0,080 g
EC0475	0,13	1,4	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0,19	2,0	425,47	0,080 g
Ácido N ¹⁰ TFA-Pterico (disolver en 10ml DMSO)	0,16	1,7	408,29	0,066 g
DIPEA		2.0 eq de AA		41 ml o 49 ml
PyBOP		1.0 eq de AA		122 µg o 147 µg

5 Etapas de acoplamiento. En un recipiente de síntesis de péptidos, agregue la resina, agregue la solución de aminoácidos, DIPEA y PyBOP. Burbuja de argón durante 1 h. y lavar 3X con DMF e IPA. Use 20 % de piperidina en DMF para la desprotección de Fmoc, 3X (10min), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. Continuar para completar las 9 etapas de acoplamiento. Al final, trate la resina con un 2 % de hidrazina en DMF 3X (5min) para escindir el grupo protector de TFA en ácido pterico, lave la resina con DMF (3X), IPA (3X), MeOH (3X) y burbujee la resina con argón. durante 30 min.

10 Etapa de escisión. Reactivo: 92,5 % de TFA, 2,5 % de H₂O, 2,5 % de triisopropilsilano, 2,5 % de etanoditiol. Tratar la resina con reactivo de escisión durante 15 minutos con burbujeo de argón, escurrir, lavar la resina una vez con reactivo de escisión y combinar la solución. Se coloca en el rotavapor hasta que queden 5 ml y se precipita en éter dietílico (35 ml). Centrifugar, lavar con éter dietílico y secar. El sólido bruto se purificó por HPLC.

15 Etapa de purificación por HPLC. Columna: Waters Atlantis Prep T3 10 µm OBD 19x250 mm; Solvente A: acetato de amonio 10 mM, pH 5; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 0 % B a 20 min 20 % B 26 ml/min. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron para dar ~ 70 mg EC0479 (35 % de rendimiento). ¹H RMN y LC/MS fueron consistentes con el producto. MW 2128.10; Masa exacta: 2126,84.



20 EC0488. Este compuesto se preparó mediante SPPS de acuerdo con el procedimiento general de síntesis de péptidos descrito en este documento a partir de H-Cys (4-metoxitritil) -2-clorotritil-resina, y los siguientes reactivos de SPPS:

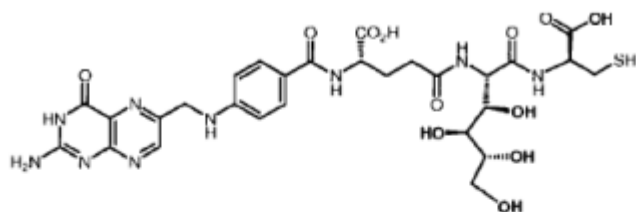
Reactivos	mmol	Equivalente	MW	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina carga 0,6mmol/g)	0,10			0.17 g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,19	1,9	425,47	0,080 g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,19	1,9	425,47	0,080 g
EC0475	0,13	1,3	612,67	0,082 g
Fmoc-Glu-OtBu	0,19	1,9	425,47	0,080 g
Ácido N ¹⁰ TFA-Ptericoico (disolver en 10ml DMSO)	0,16	1,6	408,29	0,066 g
DIPEA		2,0 eq de AA		
PyBOP		1,0 eq de AA		

5 Etapas de acoplamiento. En un recipiente de síntesis de péptidos, agregue la resina, agregue la solución de aminoácidos, DIPEA y PyBOP. Burbuja de argón durante 1 h. y lavar 3X con DMF e IPA. Use 20 % de piperidina en DMF para la desprotección de Fmoc, 3X (10min), antes de cada acoplamiento de aminoácidos. Continuar para completar las 9 etapas de acoplamiento. Al final, tratar la resina con 2 % de hidracina en DMF 3X (5min) para escindir el grupo protector de TFA en ácido ptericoico, lave la resina con DMF (3X), IPA (3X), MeOH (3X) y dejar burbujear la resina con argón durante 30 min.

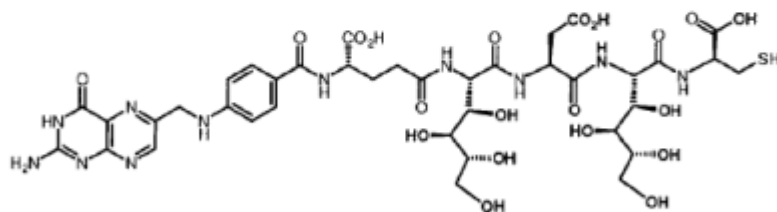
10 Etapa de escisión. Reactivo: 92,5 % de TFA, 2,5 % de H₂O, 2,5 % de triisopropilsilano, 2,5 % de etanoditol. Tratar la resina con el reactivo de escisión 3X (10 min, 5 min, 5 min) con burbujeo de argón, escurrir, lavar la resina una vez con el reactivo de escisión y combinar la solución. Se coloca en el rotavapor hasta que queden 5 ml y se precipita en éter dietílico (35 ml). Centrifugar, lavar con éter dietílico y secar. Aproximadamente la mitad del sólido bruto (~100 mg) se purificó por HPLC.

15 Etapa de purificación por HPLC. Columna: Waters Xterra Prep MS C₁₈ 10 µm 19x250 mm; Solvente A: acetato de amonio 10 mM, pH 5; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 0 % B a 25 min 20 % B 26 ml/min. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y se liofilizaron para dar 43 mg EC0488 (51 % de rendimiento). La ¹H RMN y la LC/MS (masa exacta 1678,62) fueron consistentes con el producto. MW 1679,63; Masa exacta: 1678,62.

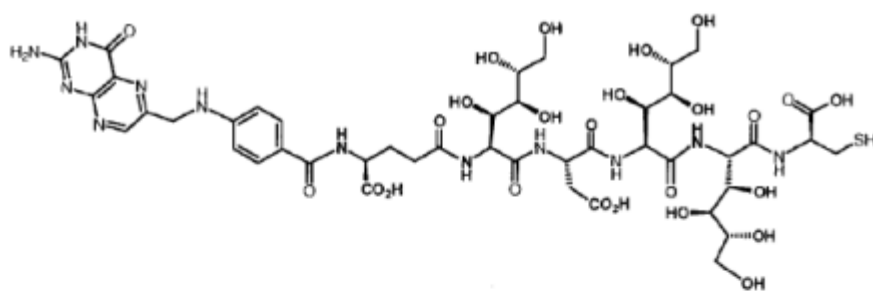
Los siguientes ejemplos de intermedios enlazantes ligandos de unión, EC0233, EC0244, EC0257 y EC0261, se prepararon como se describe en este documento.



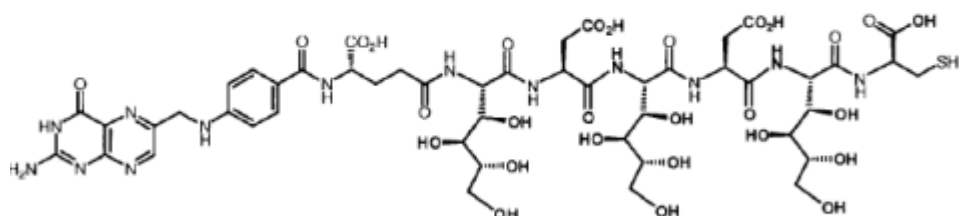
EC0233: $C_{28}H_{35}N_9O_{12}S$; MW 721,70; Masa Exacta: 721,21



EC0244: $C_{38}H_{51}N_{11}O_{20}S$; MW 1013,94; Masa Exacta 1013,30

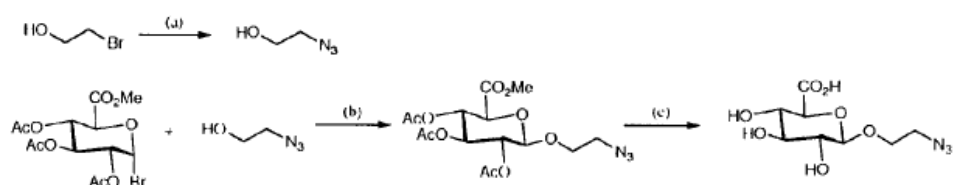


EC0257: $C_{44}H_{62}N_{12}O_{25}S$; MW 1191,09; Masa Exacta: 1190,37

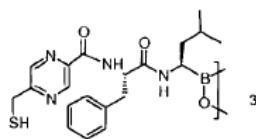


EC0261: $C_{48}H_{67}N_{13}O_{28}S$; MW 1306,18; Masa Exacta: 1305,39

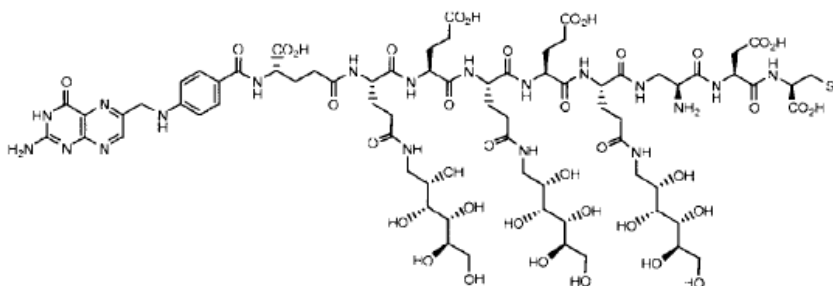
Los siguientes ejemplos de intermedios ilustrativos se prepararon como se describe en este documento.



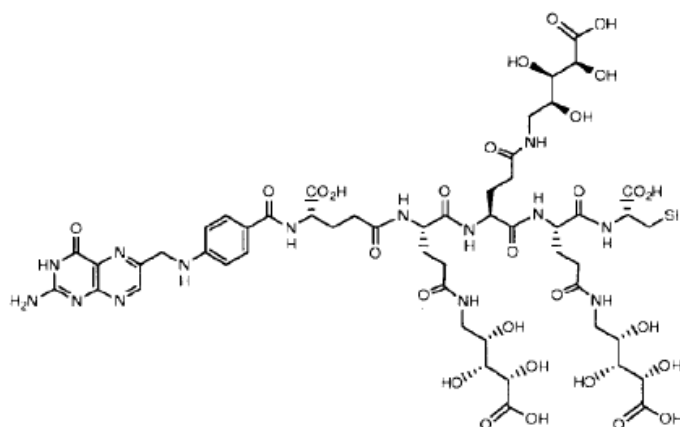
Huisgen azida para formar 1,2,3-triazol; (a) NaN_3 ; (b) Ag_2CO_3 , DCM, tamices moleculares; (c) $LiOH$, $MeOH$, H_2O .



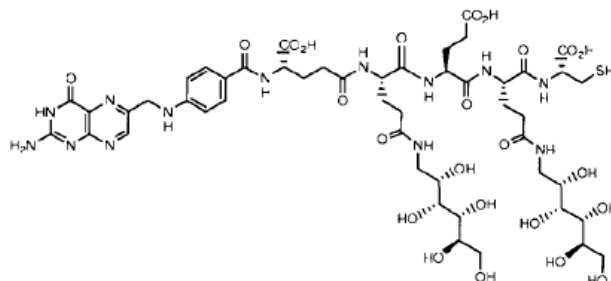
EC0501 Tio bortezomib



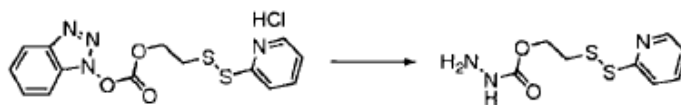
EC0536 Intermedio conjugado



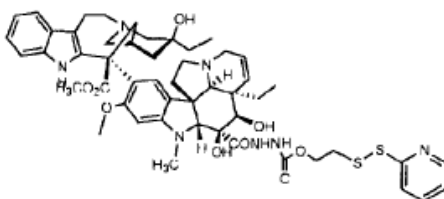
5 EC0632 Intermedio conjugado. C₅₂H₇₂N₁₄O₂₈S, MW 1373,27, Masa exacta: 1372,44, preparado a partir de los correspondientes carboxilatos protegidos con tert-butilo.



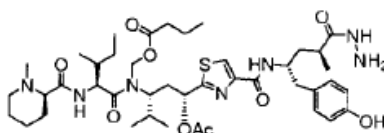
EC0669 Intermedio conjugado. C₄₉H₇₁N₁₃O₂₄S, MW 1258,23, Masa exacta: 1257,45



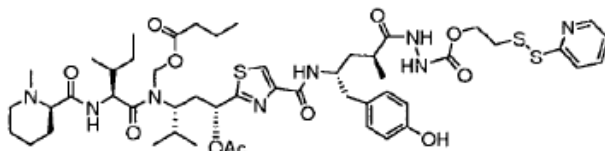
Ejemplo. Síntesis del reactivo de acoplamiento EC0311. Se añadió DIPEA (0,60 ml) a una suspensión de HOBt- $\text{OCO}_2\text{-CH}_2)_2\text{-SS-2-piridina HCl}$ (685 mg, 91 %) en DCM anhidro (5,0 ml) a 0 °C, se agitó bajo argón durante 2 minutos, y a la cual se le añadió hidrazina anhidra (0,10 ml). La mezcla de reacción se agitó bajo argón a 0 °C, durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales, se filtró y el filtrado se purificó por cromatografía instantánea (gel de sílice, MeOH al 2 % en DCM) para proporcionar EC0311 como un aceite espeso transparente (371 mg), solidificado al reposar.



Ejemplo. Disulfuro de vinblastina piridinilo. 2 - [(Benzotriazol-1-il- (oxicarbonilo) -etil)disulfanil] -piridina HCl (601 mg) y 378 μL de DIPEA se añadieron secuencialmente a una solución de desacetil vinblastina hidrazida (668 mg) en 5 ml de DCM a 0 °C. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La TLC (MeOH al 15 % en DCM) mostró una conversión completa. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice (1: 9 MeOH/DCM). Las fracciones combinadas se evaporaron, se volvieron a disolver en DCM y se lavaron con Na_2CO_3 al 10 %, salmuera, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron a 550 mg (80 %); HPLC-RT 12,651 min., 91 % de pureza, espectro ^1H RMN consistente con la estructura asignada, y MS (ESI+): 984,3, 983,3, 982,4, 492,4, 491,9, 141,8. Detalles adicionales de este procedimiento se describen en la Publicación de Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. US 2005/0002942 A1.

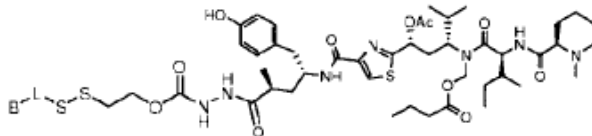


Ejemplo. Preparación de hidrazidas de tubulisina. Ilustrada mediante la preparación del EC0347. Se añadieron N, N-diisopropiletilamina (DIPEA, 6,1 μL) y cloroformiato de isobutilo (3,0 μL) con una jeringa en tándem en una solución de tubulisina B (0,15 mg) en EtOAc anhidro (2,0 ml) a -15 °C. Después de agitar durante 45 minutos a -15°C bajo argón, la mezcla de reacción se enfrió a -20 °C y a esta se le añadió hidrazina anhidra (5,0 μL). La mezcla de reacción se agitó bajo argón a -20 °C, durante 3 horas, se inactivó con solución reguladora de fosfato sódico 1,0 mM (pH 7,0, 1,0 ml) y se inyectó en una HPLC preparativa para purificación. Columna: Waters XTerra Prep MS C_{18} 10 μm , 19X250 mm; Fase móvil A: solución reguladora de fosfato de sodio 1,0 mM, pH 7,0; Fase móvil B: acetonitrilo; Procedimiento: 10 % B a 80 % B durante 20 minutos, velocidad de flujo = 25 ml/min. Las fracciones de 15,14-15,54 minutos se recogieron y se liofilizaron para producir EC0347 como un sólido de color blanco (2,7 mg). El procedimiento anterior es igualmente aplicable para preparar otras hidrazidas de tubulisina mediante la selección apropiada del compuesto de partida tubulisina.

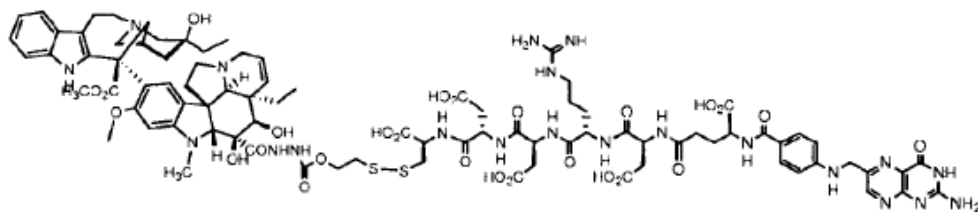


Ejemplo. Preparación de disulfuros de tubulisina (procedimiento por etapas). Ilustrado para EC0312. Se añadieron DIPEA (36 μL) y cloroformiato de isobutilo (13 μL) con la ayuda de una jeringa en tándem en una solución de tubulisina B (82 mg) en EtOAc anhidro (2,0 ml) a -15 °C. Después de agitar durante 45 minutos a -15 °C bajo argón, a la mezcla de reacción se le añadió una solución de EC0311 en EtOAc anhidro (1,0 ml). La solución resultante se agitó bajo argón a -15 °C, durante 15 minutos y a temperatura ambiente durante 45 minutos adicionales, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía instantánea (gel de sílice, MeOH al 2 a 8 % en DCM) para dar

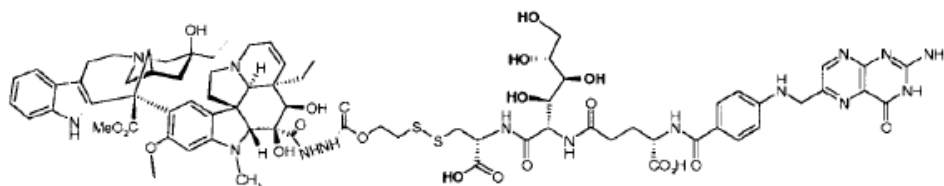
EC0312 como un sólido de color blanco (98 mg). El procedimiento anterior es igualmente aplicable para preparar otros derivados de tubulisina mediante la selección apropiada del compuesto de partida tubulisina.



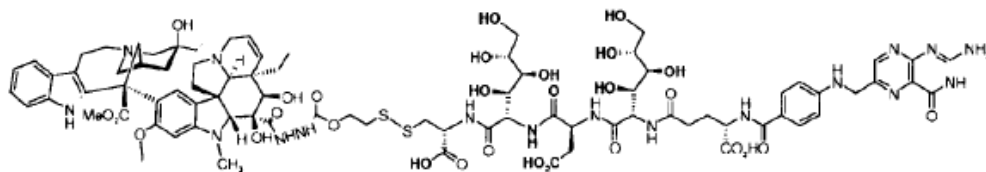
Ejemplo. Síntesis general de disulfuro que contiene conjugados de tubulisina. Ilustrado con EC0312. Un intermedio de enlazante ligando de unión que contiene un grupo tiol se toma en agua desionizada (aproximadamente 20 mg/ml, se burbujea con argón durante 10 minutos antes de su uso) y el pH de la suspensión se ajusta con NaHCO_3 saturado (se burbujea con argón durante 10 minutos minutos antes de su uso) a aproximadamente 6,9 (la suspensión puede convertirse en una solución cuando el pH aumenta). Se añade agua desionizada adicional (aproximadamente 20-25 %) a la solución según sea necesario, y a la solución acuosa se le añade inmediatamente una solución de EC0312 en THF (aproximadamente 20 mg/ml). La mezcla de reacción se vuelve homogénea rápidamente. Después de agitar bajo argón, por ejemplo durante 45 minutos, la mezcla de reacción se diluye con solución reguladora de fosfato sódico 2,0 mM (pH 7,0, aproximadamente 150 por ciento en volumen) y el THF se elimina por evacuación. La suspensión resultante se filtra y el filtrado se puede purificar mediante HPLC preparativa (como se describe en este documento). Las fracciones se liofilizan para aislar los conjugados. El procedimiento anterior es igualmente aplicable para preparar otros conjugados de tubulisina mediante la selección apropiada del compuesto de partida de tubulisina.



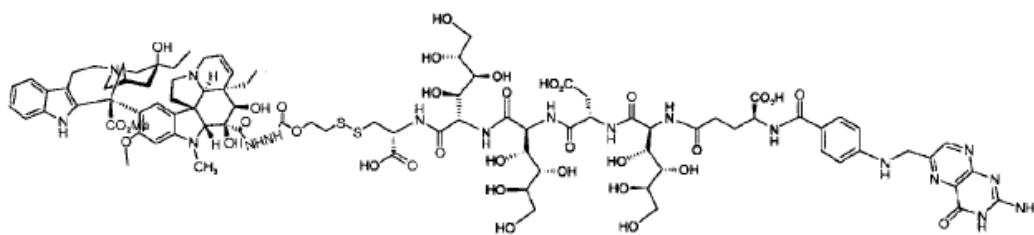
Ejemplo comparativo de vinblastina. EC145 que carece de un enlazante espaciador hidrófilo. El fragmento de peptidilo Pte- Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH (Ejemplo 13) en THF se trató con ya sea la vinblastina activada con tiosulfonato o el disulfuro de vinblastina piridinilo como una solución de color amarillo que resulta de la disolución en NaHCO_3 0,1 M a pH > 6.5 bajo argón. La liofilización y HPLC dieron un rendimiento del 70 %; ^1H RMN (D_2O) δ 8,67 (s, 1H, FA H-7), 7,50 (br s, 1H, VLB H-11'), 7,30-7,40 (br s, 1H, VLB H-14'), 7,35 (d, 2H, J = 7,8 Hz, FA H-12 & 16), 7,25 (m, 1H, VLB H-13'), 7,05 (br s, 1H, VLB H-12'), 6,51 (d, 2H, J = 8,7 Hz, FA H-13 & 15), 6,4 (s, 2H, VLB H-14 & 17), 5,7 (m, 1H, VLB olefina), 5,65 (m, 1H, VLB H-7), 5,5 (d, 1H, VLB olefina), 5,5 (m, 1H, VLB H-6), 4,15 (m, 1H, VLB H-8'), 3,82 (s, 3H, VLB C18'-CO₂CH₃), 3,69 (s, 3H, VLB C16 -OCH₃), 2,8 (s, 3H, VLB N-CH₃), 1,35 (br s, 1H, VLB H-3'), 1,15 (m, 1H, VLB H-2'), 0,9 (t, 3H, J = 7 Hz, VLB H-21'), 0,55 (t, 3H, J = 6,9 Hz, VLB H-21); LCMS (ESI, m+H⁺) 1918.



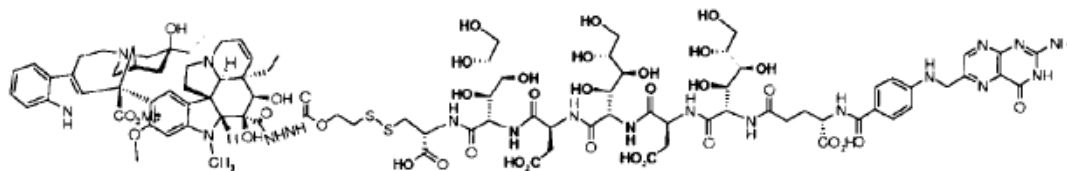
Ejemplo. EC0234 (Conjugado Mono-Saccharo-Folato Vinblastina) que incluye un enlazante espaciador hidrófilo. En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0233, 22 mg, 0,030 mmol) en 2 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (27 mg, 0,028 mmol) en 2 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (10 mM de acetato de amonio, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra C18, 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-saccharo-folato (EC0234) se aisló después de la liofilización durante 48 h (34 mg, 76 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{74}\text{H}_{93}\text{N}_{15}\text{O}_{21}\text{S}_2$; MW 1592,75; Masa exacta: 1591,61.



Ejemplo. EC0246 (Conjugado de Bis-Saccharo-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0244, 30 mg, 0,030 mmol) en 5 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 minutos. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (27 mg, 0,028 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra C18, 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-bis-saccharo-folato (EC0246) se aisló después de la liofilización durante 48 h (34 mg, 66 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{84}\text{H}_{109}\text{N}_{17}\text{O}_{29}\text{S}_2$; MW 1884,99; Masa exacta: 1883,70.

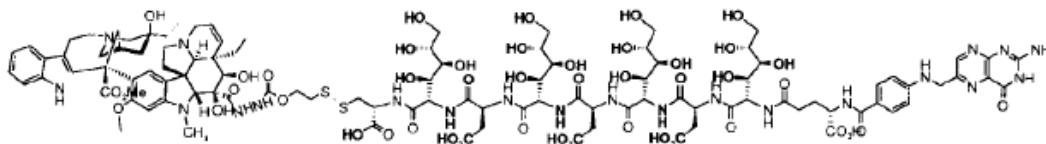


Ejemplo. EC0258 (Conjugado Tris-Saccharo-Asp-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0257, 37 mg, 0,031 mmol) en 5 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 minutos. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (27,5 mg, 0,028 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Xterra C18, 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tris-saccharo-Asp-folato (EC0258) se aisló después de la liofilización durante 48 h (36 mg, 62 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{90}\text{H}_{120}\text{N}_{18}\text{O}_{34}\text{S}_2$; MW 2062,15; Masa exacta: 2060,77.



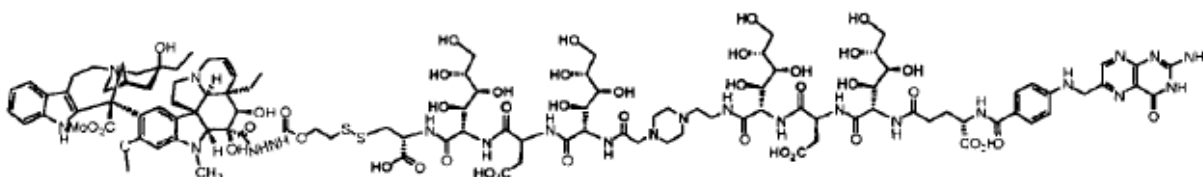
Ejemplo. EC0263 (Conjugado Tris-Saccharo-Bis-Asp-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0261, 37 mg, 0,029 mmol) en 5 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 minutos. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (25,5 mg, 0,026 mmol) en 5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Xterra C18, 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el

producto. El conjugado Vinblastina-tris-saccharo-bis-Asp-folato (EC0263) se aisló después de la liofilización durante 48 h (36 mg, 64 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{94}\text{H}_{125}\text{N}_{19}\text{O}_{37}\text{S}_2$; MW 2177,24; Masa exacta: 2175,79.

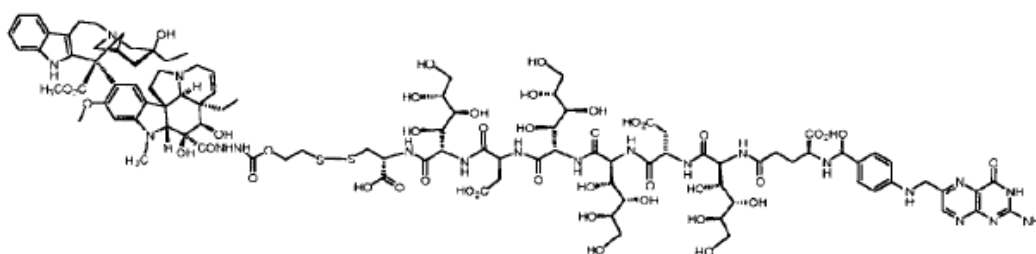


5

Ejemplo. EC0434 (Conjugado de vinblastina tetra-saccharo-tris-Asp-folato). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0268, 20 mg, 0,012 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (12 mg, 0,012 mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Xterra C_{18} , 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-tris-Asp-folato (EC0434) se aisló después de la liofilización durante 48 h (26 mg, 62 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{104}\text{H}_{141}\text{N}_{21}\text{O}_{45}\text{S}_2$; MW 2469,48; Masa exacta: 2467,88.



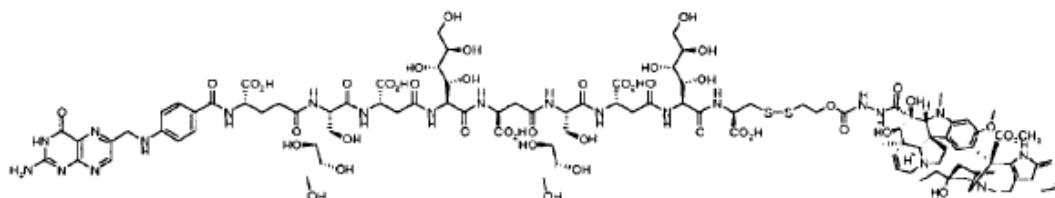
Ejemplo. EC0454 (Conjugado de vinblastina tetra-saccharo-bis-Asp-folato). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0452, 34 mg, 0,02 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (20 mg, 0,02 mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Xterra C_{18} , 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-bis-Asp-folato (EC0454) se aisló después de la liofilización durante 48 h (35 mg, 70 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{108}\text{H}_{151}\text{N}_{23}\text{O}_{43}\text{S}_2$; MW 2523,62; Masa exacta: 2521,98.



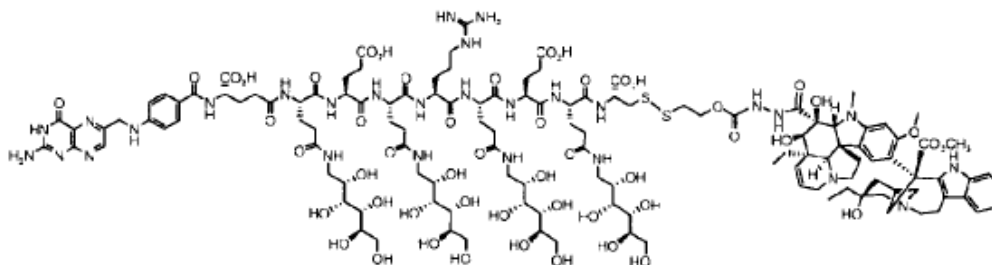
Ejemplo. EC0455 (Conjugado de vinblastina tetra-saccharo-bis-Asp-folato). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0457, 20 mg, 0,013 mmol) en 1,5 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. Se añadió lentamente a la solución anterior el disulfuro de vinblastina piridinilo (18 mg, 0,018 mmol) en 1,5 ml de tetrahidrofurano (THF). La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 30 min. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra

35

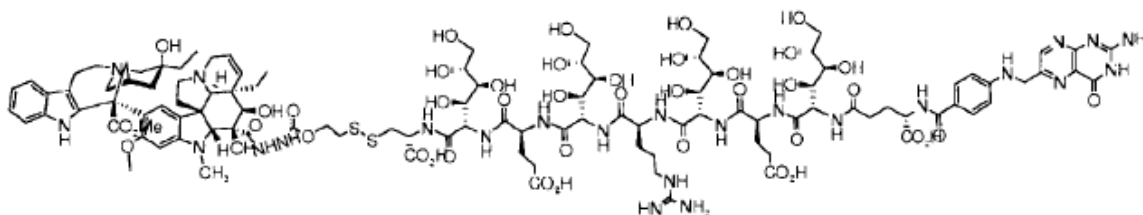
C₁₈, 19 X 300 mm). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-bis-Asp-folato (EC0455) se aisló después de la liofilización durante 48 h (19 mg, 62 %). Los datos de ¹H RMN fueron según el conjugado de folato. C₁₀₀H₁₃₆N₂₀O₄₂S₂; MW 2354,39.



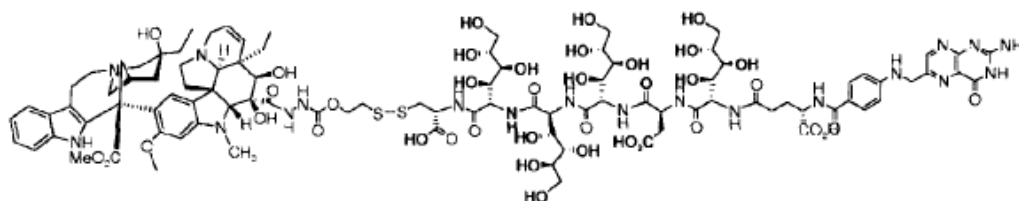
Ejemplo. EC0456. En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0453, 46 mg, 0,029 mmol) en 3 ml de agua, que se había burbujeado con argón durante 10 min. En otro matraz, se burbujeó argón una solución saturada de NaHCO₃ durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente, con burbujeo de argón, a 6,9 usando la solución de NaHCO₃. El disulfuro de vinblastina piridinilo (32 mg, 1,1 eq) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió rápidamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (solución reguladora de fosfato 2 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). Después de 30 minutos, a la reacción se le añadieron 12 ml de solución reguladora de fosfato 2 mM (pH 7), la solución turbia resultante se filtró y el filtrado se inyectó en una HPLC preparativa de columna: Waters Xterra Prep MS C₁₈ 10 μm 19x250 mm; Solvente A: fosfato de sodio 2 mM, pH 7; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 1 % de B a 40 min. 80 % de B 25 ml/min. Las fracciones que contenían EC0456 se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 41,6 mg de un sólido de color amarillo esponjoso, que consiste en 30 mg de EC0456 (42 % de rendimiento) y 11,6 sal de fosfato de sodio. ¹H RMN y LC/MS fueron consistentes con el producto C₁₀₄H₁₄₁N₂₁O₄₅S₂; MW 2469,48; Masa exacta: 2467,88. C, 50,58; H, 5,76; N, 11,91; O, 29,15; S, 2,60.



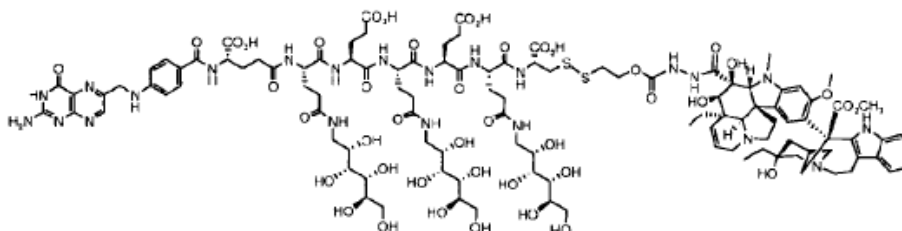
Ejemplo. EC0481. En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0479, 12 mg, 0,0058 mmol) en 2,5 ml de agua, que se había burbujeado con argón durante 10 min. En otro matraz, se burbujeó argón una solución saturada de NaHCO₃ durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente, con burbujeo de argón, a 6,9 usando la solución de NaHCO₃. El disulfuro de vinblastina piridinilo (5,7 mg, 1,0 eq) en 2,5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió rápidamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (solución reguladora de fosfato 2 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). Después de 20 min, a la reacción se añadieron 12 ml de solución reguladora de fosfato 2 mM (pH 7), la solución turbia resultante se filtró y el filtrado se inyectó en una HPLC prep.: Columna: Waters Atlantis Prep T3 10 μm OBD 19x250 mm; Solvente A: fosfato de sodio 2 mM, pH 7; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 1 % B a 25 min 50 % B 26 ml/min. Las fracciones que contenían EC0481 se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 15,5 mg de un sólido de color amarillo esponjoso, que consiste en 10,5 mg de EC0481 (60 % de rendimiento) y 5,0 sal de fosfato de sodio. ¹H RMN y LC/MS fueron consistentes con el producto. MW 2999,15; Masa exacta: 2997,24.



Ejemplo. EC0484 (Conjugado de vinblastina tetra-saccharo-bis- α -Glu-Arg-folato). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0480, 15 mg, 0,009 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (8,8 mg, 0,009 mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra C_{18} , 19 X 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-bis- α -Glu-Arg-folato (EC0484) se aisló después de la liofilización durante 48 h (16 mg, 70 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{108}\text{H}_{152}\text{N}_{24}\text{O}_{43}\text{S}_2$; MW 2538,63; Masa exacta: 2536,99.

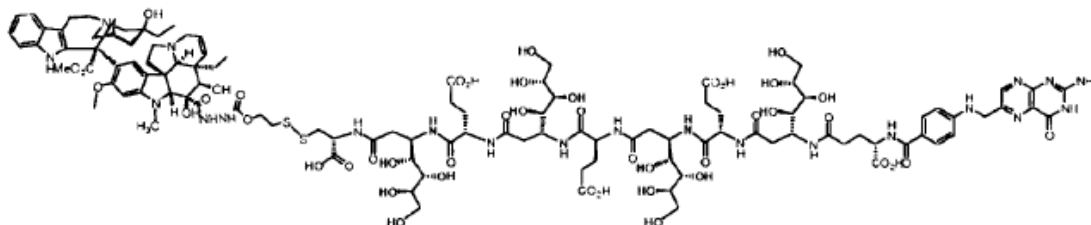


Ejemplo. EC0487 (Conjugado de Tetra-Saccharo-Asp-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0463, 21 mg, 0,015 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. Se añadió lentamente a la solución anterior el disulfuro de vinblastina piridinilo (15 mg, 0,015 mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF). La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Atlantis, 19 x 300 mM). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. El conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-Asp-folato (EC0487) se aisló después de la liofilización durante 48 h (28 mg, 84 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. $\text{C}_{96}\text{H}_{131}\text{N}_{19}\text{O}_{39}\text{S}_2$; MW 2239,30; Masa exacta: 2237,83.

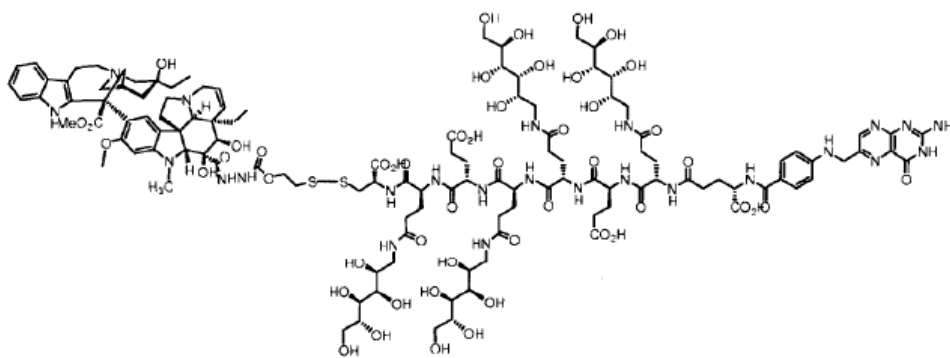


Ejemplo. EC0489. En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0488, 26 mg, 0,015 mmol) en 2,5 ml de agua, que se había burbujeado con argón durante 10 minutos. En otro matraz, se burbujeó argón una solución saturada de NaHCO_3 durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente, con burbujeo de argón, a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 . El disulfuro de vinblastina piridinilo (15 mg, 1,0 eq) en 2,5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió rápidamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica

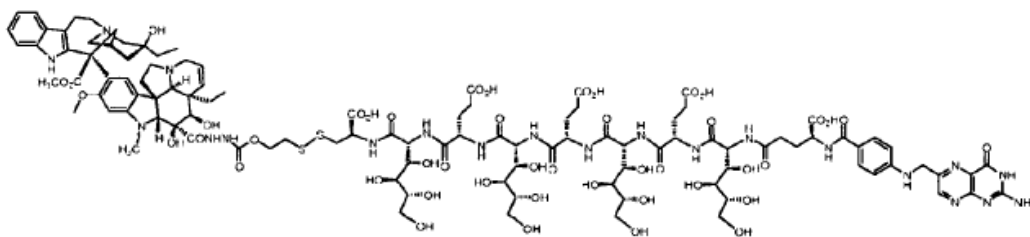
(solución reguladora de fosfato 2 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). Después de 20 minutos, a la reacción se le añadieron 12 ml de solución reguladora de fosfato 2 mM (pH 7), la solución turbia resultante se filtró y el filtrado se inyectó en una HPLC preparativa: Columna: Waters Xterra Prep MS C₁₈ 10 µm 19x250 mm; Solvente A: fosfato de sodio 2 mM, pH 7; Solvente B: ACN; Procedimiento: 5 min 1 % B a 25 min 50 % B 26 ml/min. Las fracciones que contenían EC0489 se recogieron y se liofilizaron para proporcionar 35 mg de un sólido de color amarillo esponjoso, que consiste en 27,5 mg de EC0489 (rendimiento del 71 %) y 7,5 de sal de fosfato de sodio. ¹H RMN y LC/MS fueron consistentes con el producto. MW 2550,68; Masa exacta: 2549,01.



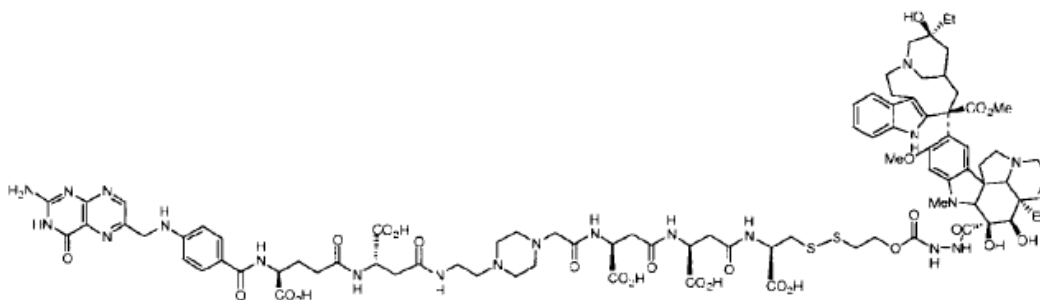
Ejemplo. EC0490 (Conjugado Tetra-HomoSaccharo-Tris-αGlu-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0478, 22 mg, 0,013 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO₃ 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO₃ 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (mg, mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna Xterra C₁₈, 19 X 300 mm). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. Se aisló el conjugado de vinblastina-tetra-Homosaccharo-tris-Glu-folato (EC0490) después de la congelación y secado durante 48 h (15 mg, 45 %). Los datos de ¹H RMN fueron según el conjugado de folato. C₁₁₁H₁₅₅N₂₁O₄₅S₂; MW 2567,66; Masa exacta: 2565,99.



Ejemplo. EC0492 (Conjugado de tetra-HomoSaccharo-Tris-αGlu-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0491, 26 mg, 0,013 mmol) en 3 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO₃ 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO₃ 0,1N. Se añadió a la solución anterior el disulfuro de vinblastina piridinilo (13 mg, 0,013 mmol) en 3 ml de tetrahidrofurano (THF). La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 15 min a 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra C₁₈, 19 X 300 mm). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. Se aisló el conjugado de vinblastina-tetra-homosaccharo-tris-Glu-folato (EC0492) después de la liofilización durante 48 h (22 mg, 60 %). Los datos de ¹H RMN fueron según el conjugado de folato. C₁₂₂H₁₇₆N₂₄O₅₀S₂; MW 2842,97; Masa exacta: 2841,14.

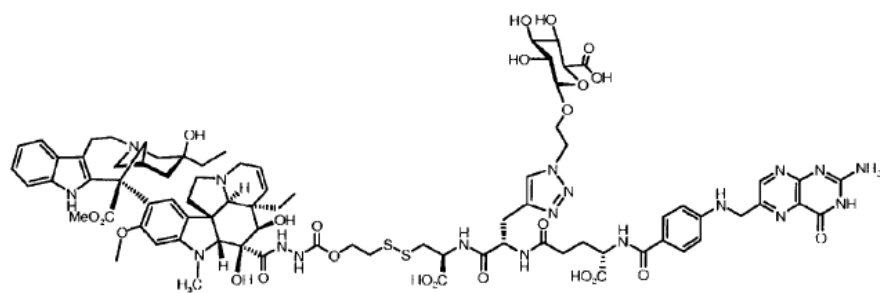


Ejemplo. EC0493 (Conjugado Tetra-Saccharo-tris-Glu-Folato Vinblastina). En una botella de polipropileno centrífuga, se disolvió el enlazante de folato (EC0477, 25 mg, 0,015 mmol) en 1,5 ml de agua y se burbujeó con argón durante 10 min. En otro matraz, una solución de NaHCO_3 0,1N se burbujeó con argón durante 10 min. El pH de la solución de enlazante se ajustó cuidadosamente a 6,9 usando la solución de NaHCO_3 0,1N. El disulfuro de vinblastina piridinilo (20 mg, 0,020 mmol) en 1,5 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadió lentamente a la solución anterior. La solución transparente resultante se agitó bajo argón durante 30 min. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC analítica (acetato de amonio 10 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo). El THF se eliminó a presión reducida y la solución acuosa se filtró y se inyectó en una columna de HPLC preparativa (Columna X-terra C₁₈, 19 X 300 mm). La elución con fosfato de sodio 1 mM, pH = 7,0 y acetonitrilo dio como resultado fracciones puras que contenían el producto. Se aisló el conjugado de vinblastina-tetra-saccharo-tris-Glu-folato (EC0493) después de la liofilización durante 48 h (23 mg, 61 %). Los datos de ^1H RMN fueron según el conjugado de folato. C₁₀₇H₁₄₇N₂₁O₄₅S₂; MW 2511,56; Masa exacta: 2509,93.

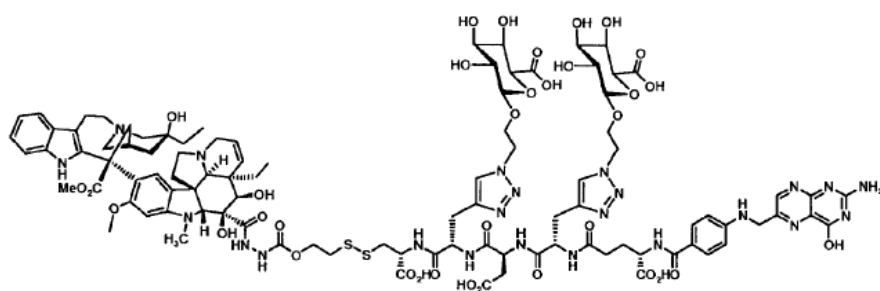


Ejemplo. EC0429. Este Ejemplo, que incluye un espaciador hidrófilo de oligoamida representado por la aminoetilpiperazinilacetamida de Asp-Asp-Cys, se preparó usando los procedimientos descritos en este documento.

Los siguientes ejemplos ilustrativos de compuestos de glucurónido, EC0400 y EC0423, en los que el grupo basado en sacáridos se introduce de manera ilustrativa usando la química de clic, también se prepararon como se describe en este documento.

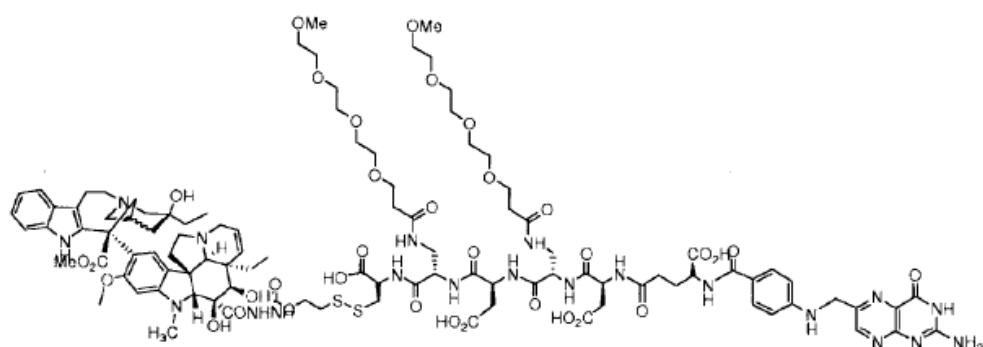


EC0400

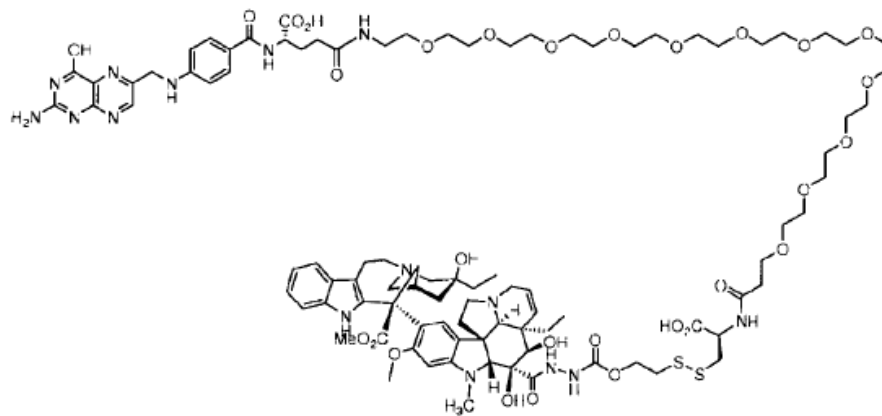


EC0423

Los siguientes ejemplos ilustrativos de compuestos espaciadores de PEG, EC0367 y EC0409, también se prepararon como se describe en este documento.

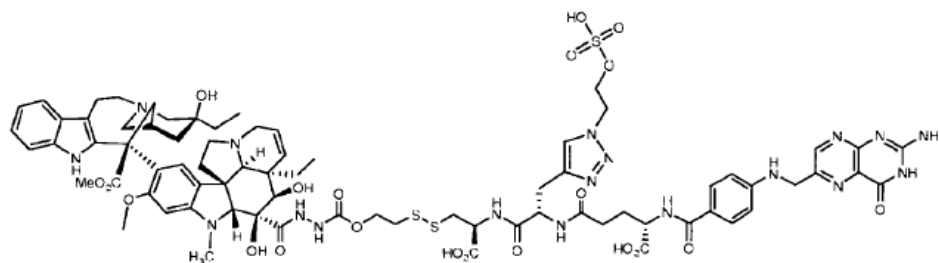


EC0367

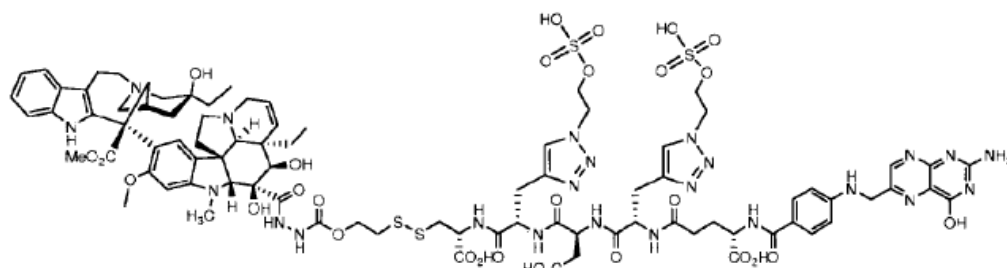


EC0409

Los siguientes ejemplos ilustrativos de compuestos de éster alquílico de ácido sulfúrico, EC0418 y EC0428, en los que el fragmento de ácido sulfúrico se introduce ilustrativamente a través de la química de clic, se prepararon como se describe en este documento.



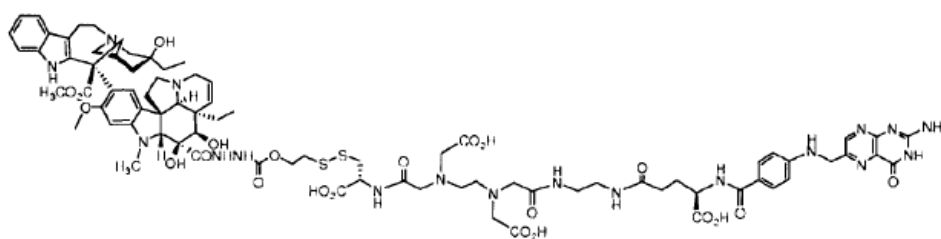
EC0418 Conjugado de DAVLBH



EC0428 Conjugado de DAVLBH

5

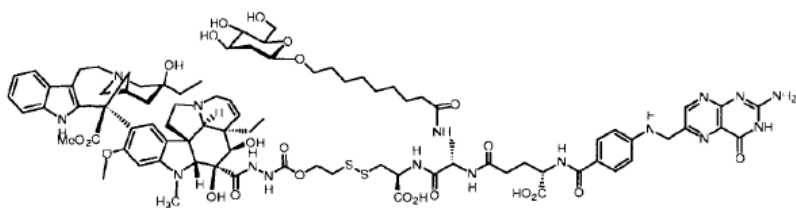
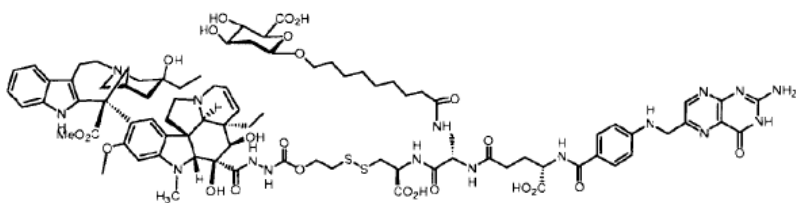
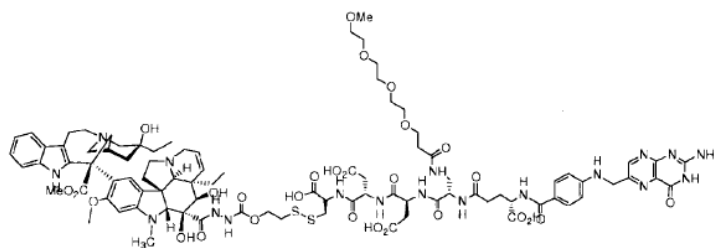
Los siguientes ejemplos ilustrativos de compuestos espaciadores de oligoamida adicionales, en los que la oligoamida incluye un derivado de EDTE, se prepararon como se describe en este documento.



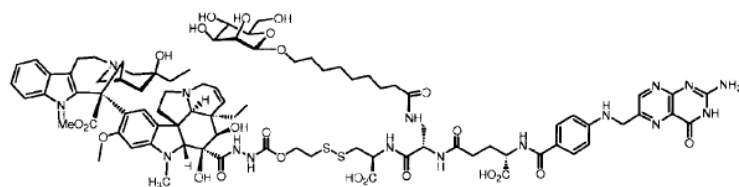
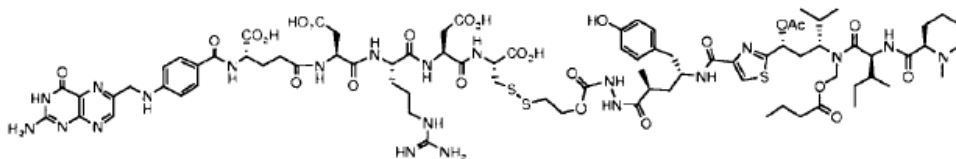
EC0396 Conjugado de DAVLBH

10

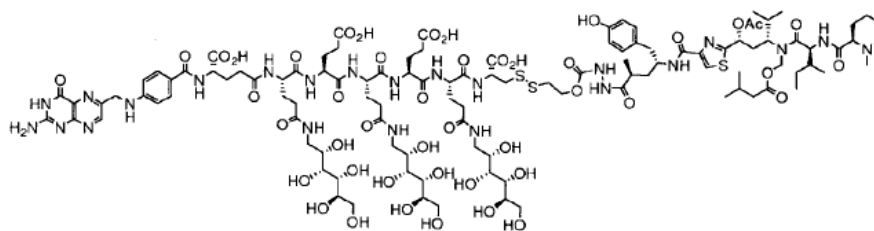
Los siguientes ejemplos ilustrativos de β -alquil glicósidos de compuestos de 2-desoxihexapiranos y compuestos unidos a PEG se pueden preparar como se describe en este documento, usando la química de clic para unir los grupos hidrófilos al enlazante espaciador.

Conjugado de DAVLBH incluyendo un β - alquil 2-desoxiglucosaConjugado de DAVLBH incluyendo un β - alquil 2-desoxiglucuronida

Conjugado de DAVLBH incluyendo un PEG.

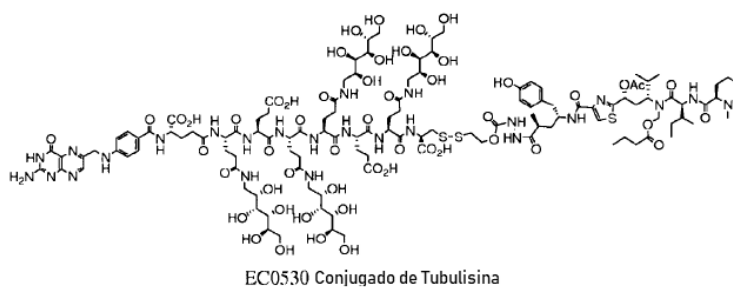
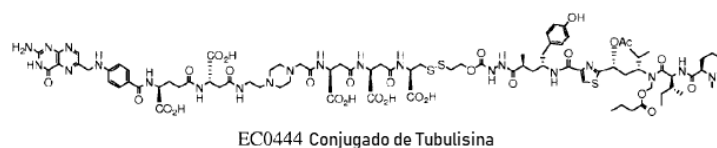
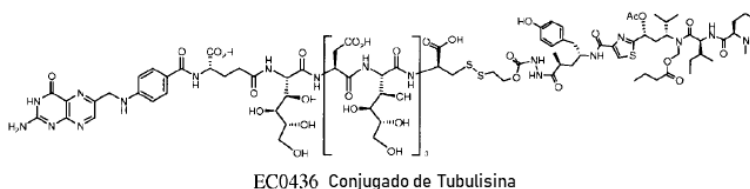
Conjugado de DAVLBH incluyendo un β -alquil manopiranosido

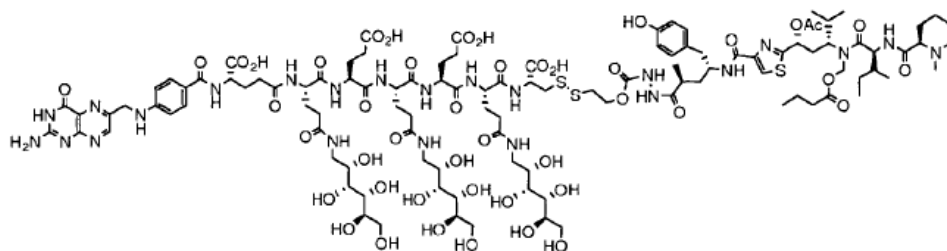
Ejemplo comparativo de tubulicina. EC0305 que carece de un enlazante espaciador hidrófilo. Se tomó EC89 (86 mg) en agua desionizada (4,0 ml, se burbujeó con argón durante 10 minutos antes de su uso) y el pH de la suspensión se ajustó con NaHCO₃ saturado (se burbujeó con argón durante 10 minutos antes de su uso) a aproximadamente 6,9 (la suspensión se convirtió en una solución cuando el pH aumentó. Se añadió agua desionizada adicional a la solución para obtener un volumen total de 5,0 ml y a la solución acuosa se añadió inmediatamente una solución de EC0312 (97 mg) en THF (5,0 ml). La mezcla de reacción se volvió homogénea rápidamente. Después de agitar bajo argón durante 45 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con solución reguladora de fosfato de sodio 2,0 mM (pH 7,0, 15 ml) y el THF se eliminó en un Rotavapor. La suspensión resultante se filtró y el filtrado se inyectó en una HPLC preparativa para la purificación (Columna: Waters XTerra Prep MS C₁₈ 10 μ m, 19X250 mm; Fase móvil A: solución reguladora de fosfato de sodio 2,0 mM, pH 7,0; Fase móvil B: acetonitrilo; Procedimiento: 5 % B a 80 % B durante 25 minutos, velocidad de flujo = 25 ml/min). Las fracciones de 10,04-11,90 minutos se recogieron y se liofilizaron para dar EC0305 en forma de un sólido esponjoso de color amarillo pálido (117 mg).



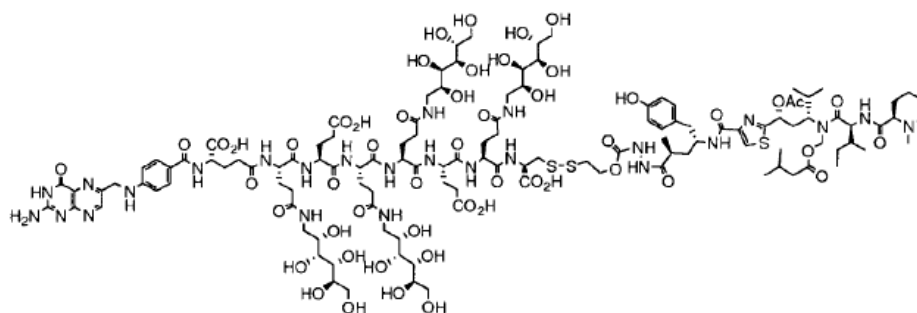
Ejemplo. Procedimiento general 2 para preparar conjugados que tienen un enlazante espaciador hidrófilo (un solo recipiente). Ilustrado con la preparación de EC0543. Se añadieron DIPEA (7,8 μ L) y cloroformato de isobutilo (3,1 μ L) con la ayuda de una jeringa en tándem en una solución de tubulinsina A (18 mg) en EtOAc anhidro (0,50 ml) a -15 °C. Después de agitar durante 35 minutos a -15 °C bajo argón, a la mezcla de reacción se le añadió una solución de EC0311 (5,8 mg) en EtOAc anhidro (0,50 ml). El enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se agitó bajo argón durante 45 minutos adicionales, se concentró, se aspiró y el residuo se disolvió en THF (2,0 ml). Mientras tanto, se disolvió EC0488 (40 mg) en agua desionizada (se burbujeó con argón durante 10 minutos antes de su uso) y el pH de la solución acuosa se ajustó a 6,9 con NaHCO_3 saturado. Se añadió agua desionizada adicional a la solución de EC0488 para obtener un volumen total de 2,0 ml y a esto se añadió inmediatamente la solución THF que contiene la tubulinsina activada. La mezcla de reacción, que se volvió homogénea rápidamente, se agitó bajo argón durante 50 minutos y se detuvo con una solución reguladora de fosfato de sodio 2,0 mM (pH 7,0, 15 ml). La solución turbia resultante se filtró y el filtrado se inyectó en una HPLC preparativa para la purificación. Columna: Waters XTerra Prep MS C_{18} 10 μ m, 19X250 mm; Fase móvil A: solución reguladora de fosfato de sodio 2,0 mM, pH 7,0; Fase móvil B: acetonitrilo; Procedimiento: 1 % de B durante 5 minutos, luego 1 % de B a 60 % de B durante los siguientes 30 minutos, velocidad de flujo = 26 ml/min. Las fracciones de 20,75-24,50 minutos se recogieron y se liofilizaron para proporcionar EC0543 en forma de un sólido esponjoso de color amarillo pálido (26 mg). El procedimiento anterior es igualmente aplicable para preparar otros conjugados de tubulinsina mediante la selección apropiada del compuesto de partida de tubulinsina.

Los siguientes ejemplos ilustrativos adicionales de conjugados de tubulinsina que incluyen un enlazante espaciador hidrófilo se prepararon usando el procedimiento y las síntesis descritas en este documento a partir de tubulinsinas.



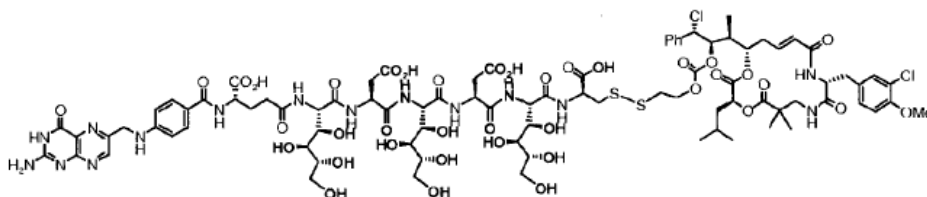


EC0531 Conjugado de Tubulisina

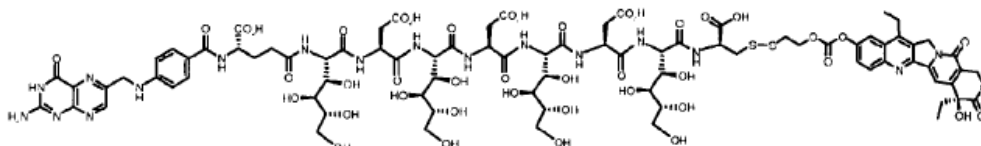


EC0533 Conjugado de Tubulisina

Los siguientes ejemplos también se prepararon como se describe en este documento.



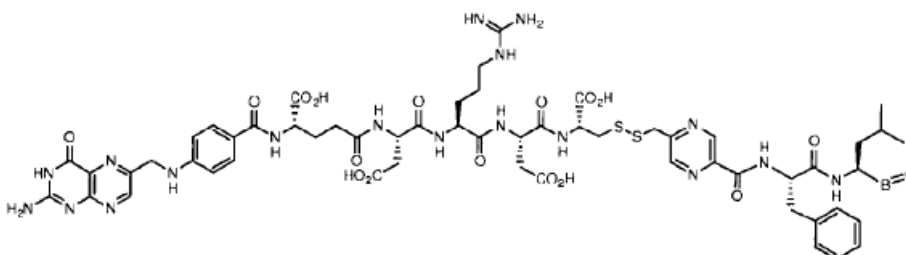
- 5 EC0262 Conjugado de criptoficina-carbonato-CH₂CH₂-SS-Cys-Saccharo-Asp-Saccharo-Asp-Saccharo-Folato. C₈₇H₁₁₅Cl₂N₁₅O₃₈S₂; MW 2113.96; Masa exacta: 2111.63



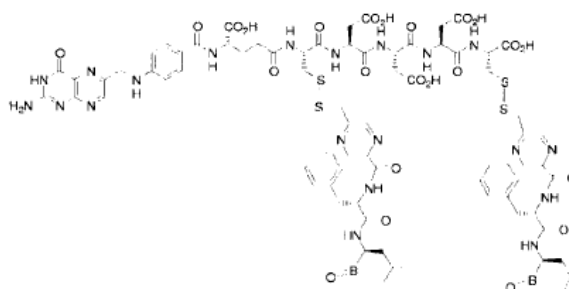
EC0278

Ejemplos de bortezomib comparativos. Los siguientes ejemplos comparativos de conjugados de bortezomib (Velcade) (EC0522 y EC0587) que carecen de un enlazante espaciador hidrófilo también se prepararon como se describe en este documento y en la Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos de Serie No. 2005/0002942.

10

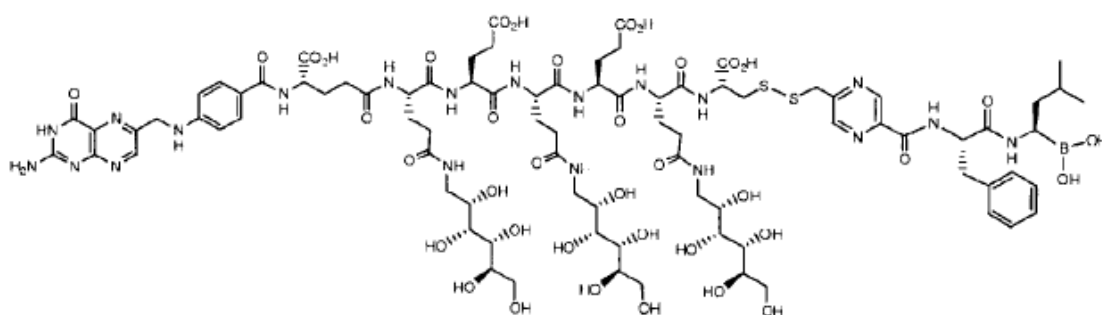


EC0522 C56H69BN18O17S2, C, 50,15; H, 5,19; B, 0,81; N, 18,80; O, 20,28; S, 4,78, MW 1341,20, Masa exacta: 1340,46

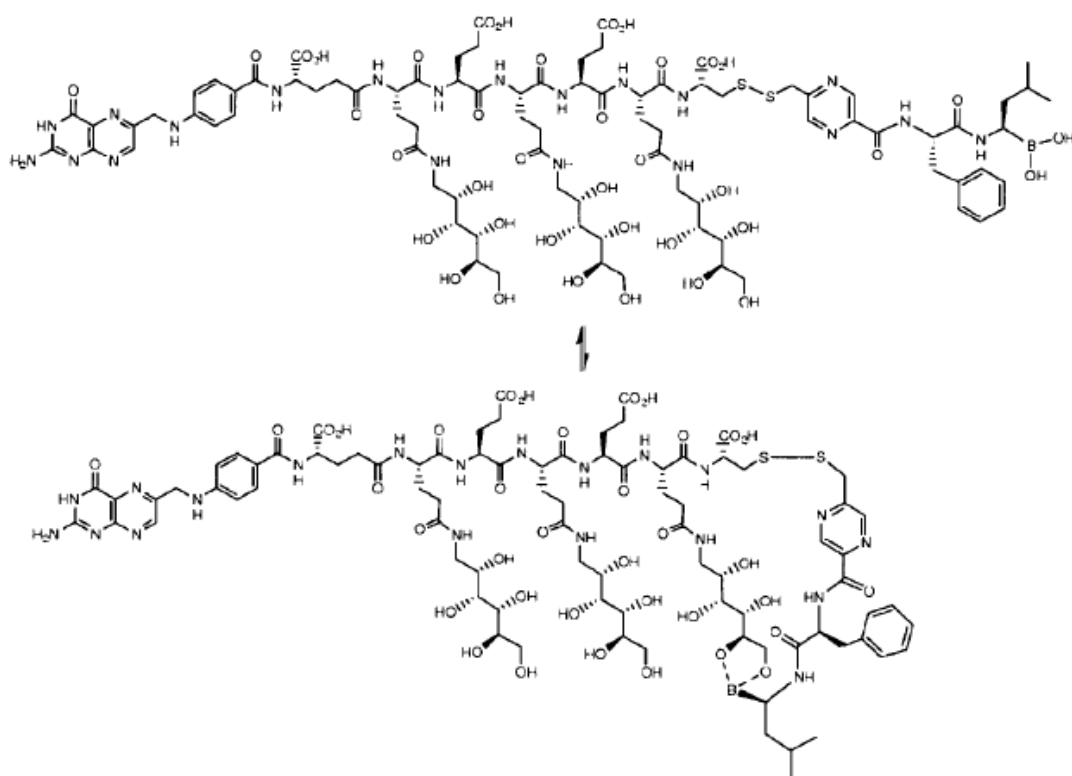


EC0587 C77H90B2N20O23S4, MW 1813,55, Masa exacta: 1812,56

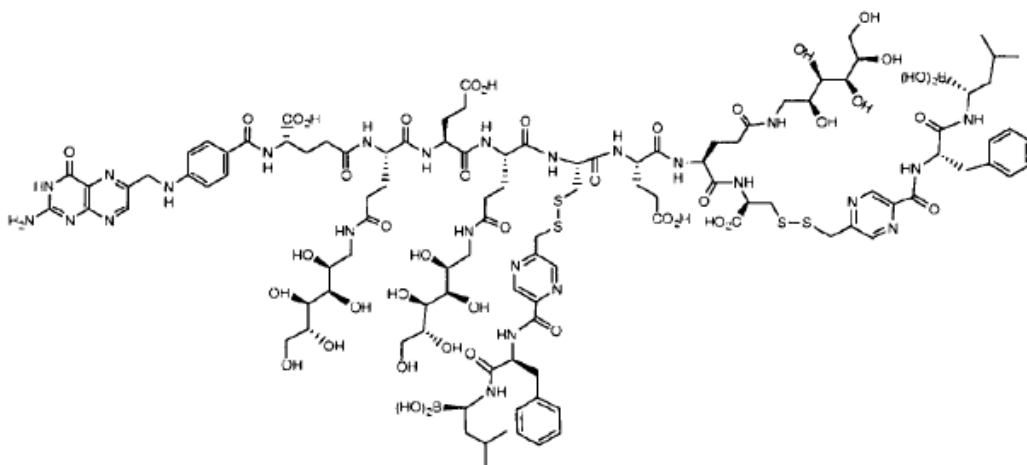
- 5 Los siguientes ejemplos de conjugados de bortezomib que incluyen un enlazante espaciador hidrófilo también se prepararon como se describe en este documento.



- 10 EC0525 Conjugado de bortezomib (Velcade). C85H119BN20O36S2, MW 2071.91, masa exacta: 2070,76. Sin pretender imponer ninguna teoría, se aprecia que en los conjugados de velcade, el ácido borónico y el enlazante pueden formar interacciones intermoleculares con las cadenas laterales de carbohidratos. Ilustrativamente, el ácido borónico forma complejos de éster de boronato con uno o dos grupos hidroxilo. Dichos complejos éster pueden formarse con hidroxilos vecinos, así como con 1,3-hidroxilos. Se aprecia que los complejos de éster de boronato pueden formarse al final del fragmento de carbohidrato, o en el interior del fragmento de carbohidrato. Se aprecia además que, en solución acuosa, los complejos de éster de boronato pueden estar en equilibrio con el ácido borónico.
- 15



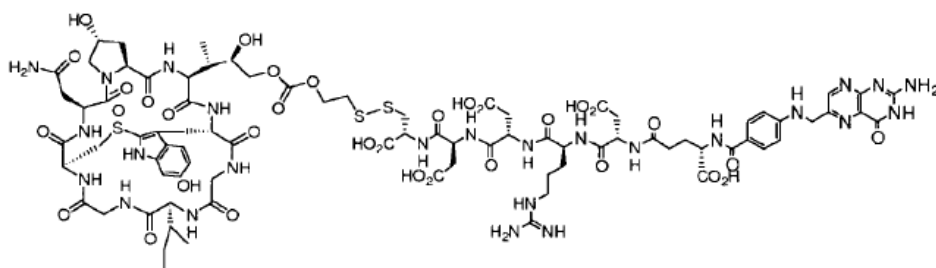
EC0525 (hidratado). C₈₅H₁₁₉BN₂₀O₃₆S₂, MW 2071,91, Masa exacta: 2070,76; EC0525 (coordinado). C₈₅H₁₂₃BN₂₀O₃₈S₂, MW 2107,94, Masa exacta: 2106,78.



5

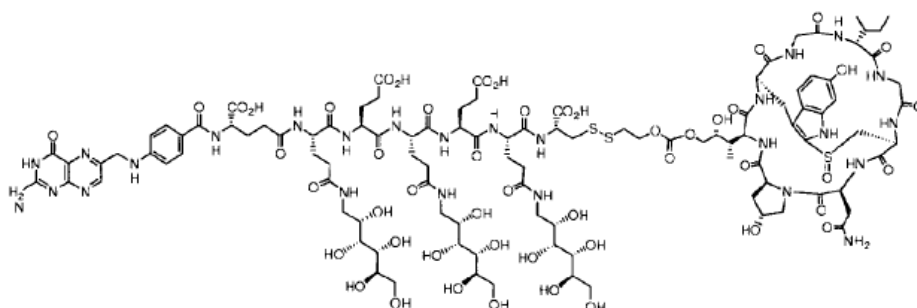
EC0595 conjugado de bis-bortezomib. C₁₀₈H₁₄₅B₂N₂₅O₃₉S₄, MW 2567,34, masa exacta: 2565,92

Ejemplo comparativo de α -amantina. El siguiente ejemplo comparativo de un conjugado de α -amantina que carece de un enlazante espaciador hidrófilo también se preparó como se describe en este documento y en la Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos de Serie No. 2005/0002942.



EC0323 no era competitivo con el ácido fólico y presentaba la misma IC₅₀ con y sin exceso de ácido fólico presente.

Los siguientes ejemplos de un conjugado de α -amanitina que incluye un enlazante espaciador hidrófilo también se prepararon como se describe en el presente documento.

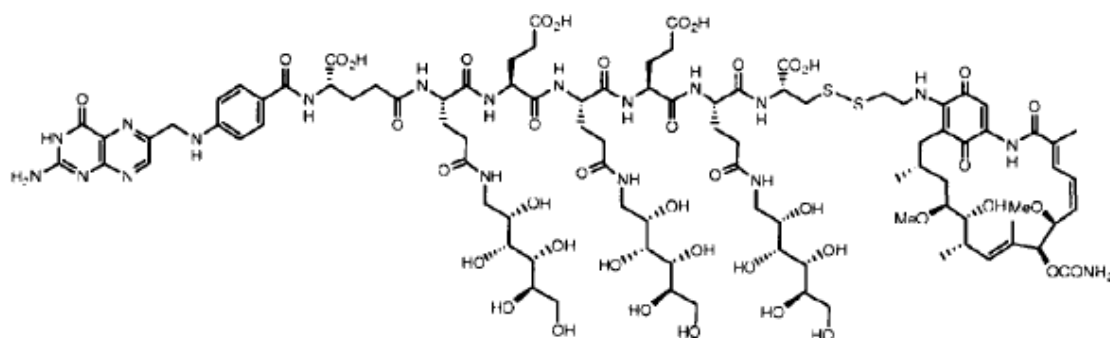


5

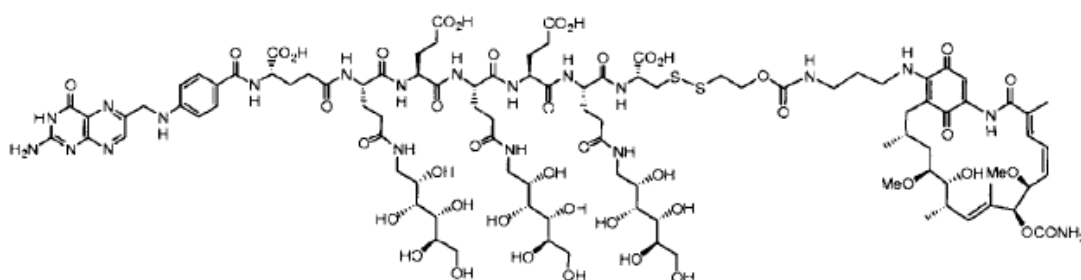
EC0592 Conjugado de α -amanitina. C₁₀₇H₁₅₄N₂₆O₅₀S₃, MW 2700,71. Masa exacta: 2698,95. EC0592 muestra una IC₅₀ de ~3 nM, que puede competir con el exceso de ácido fólico, contra las células KB en el ensayo de incorporación de 3H-timidina.

Los siguientes ejemplos de conjugados ilustrativos se prepararon como se describe en el presente documento.

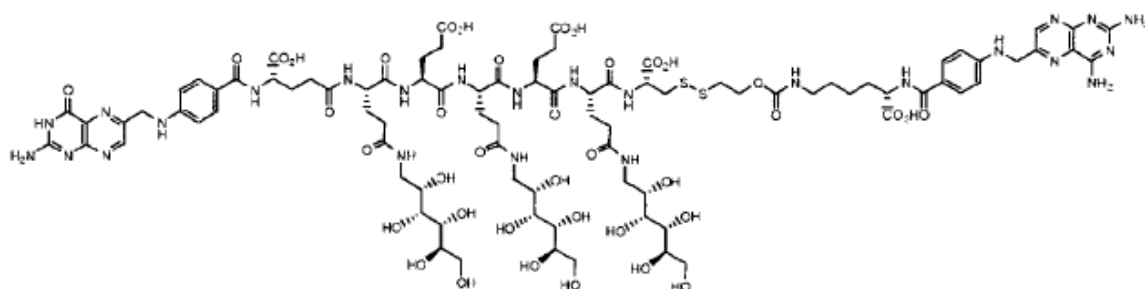
10



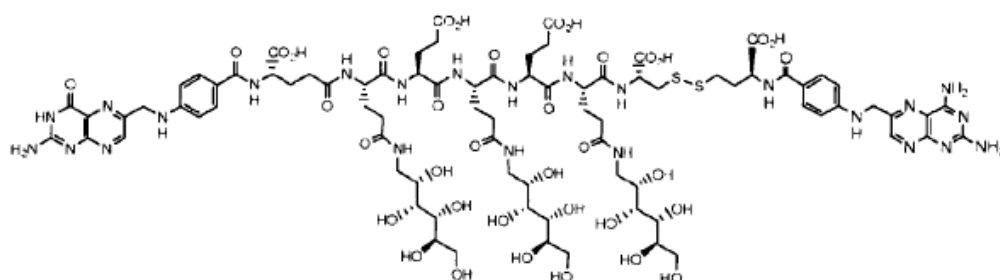
EC0535 Conjugado de geldanomicina. C₉₅H₁₃₉N₁₉O₄₂S₂, MW 2283,35, Masa exacta: 2281,88



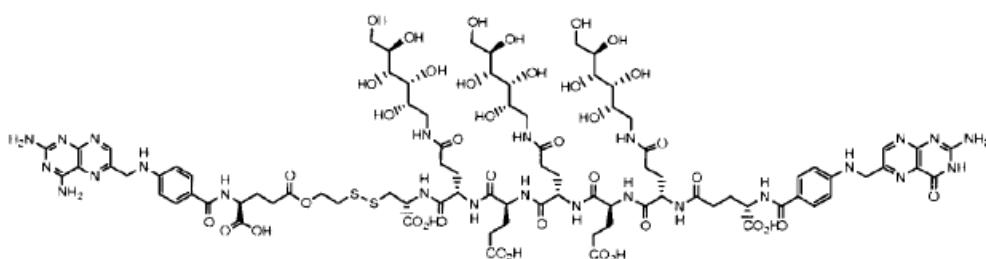
EC0568 Conjugado de geldanomicina. C₉₉H₁₄₆N₂₀O₄₄S₂, MW 2384,46, Masa exacta: 2382,92



EC0539 Conjugado de análogo lisina de aminopterina.

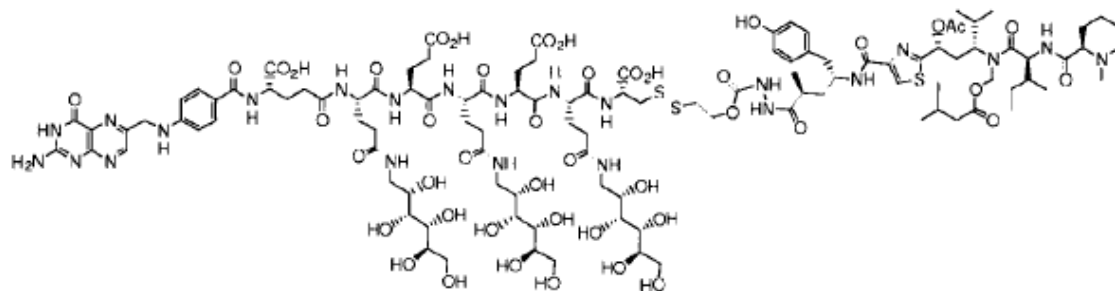


5 C0544 Conjugado de análogo cisteína de aminopterina. C₈₃H₁₁₆N₂₄O₃₇S₂, C, 47,33; H, 5,55; N, 15,96; O, 28,11; S, 3,05, MW 2106,08, masa exacta: 2104,74

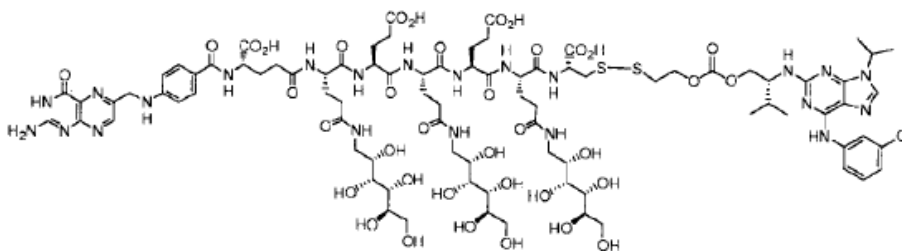


EC0551 Conjugado de aminopterina. C₈₆H₁₂₀N₂₄O₃₉S₂, C, 47,42; H, 5,55; N, 15,43; O, 28,65; S, 2,94, MW 2178,14, Masa exacta: 2176,76

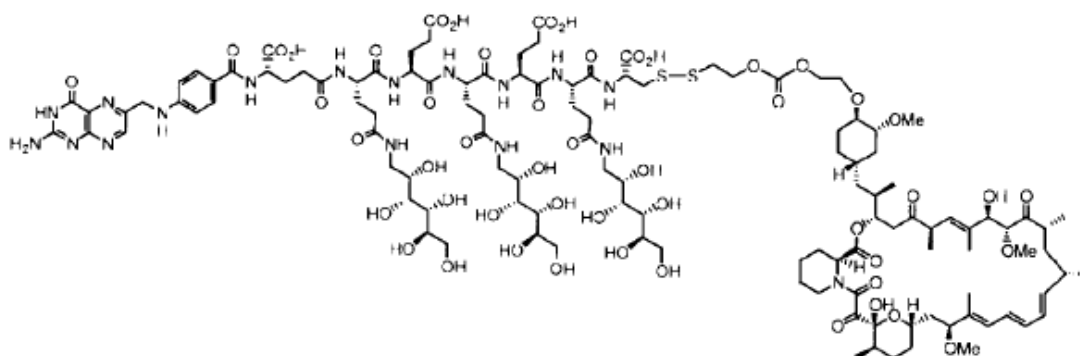
10



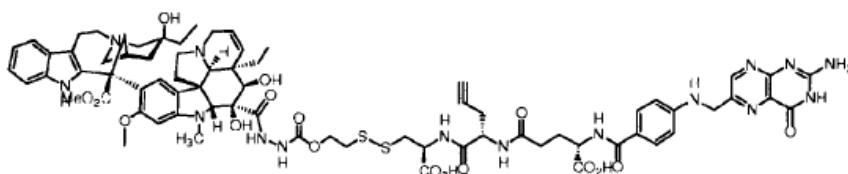
EC0543 Conjugado de tubulisin A. C₁₁₁H₁₆₇N₂₃O₄₅S₃, C, 50,50; H, 6,38; N, 12,20; O, 27,27; S, 3,64, MW 2639,84, m/z: 2639,07 (100,0 %), 2638,06 (80,8 %), 2640,07 (79,6 %)



EC0545 Conjugado de purvalanol A. C₈₇H₁₂₅CIN₂₂O₃₇S₂; MW 2170,63, Masa exacta: 2168,77

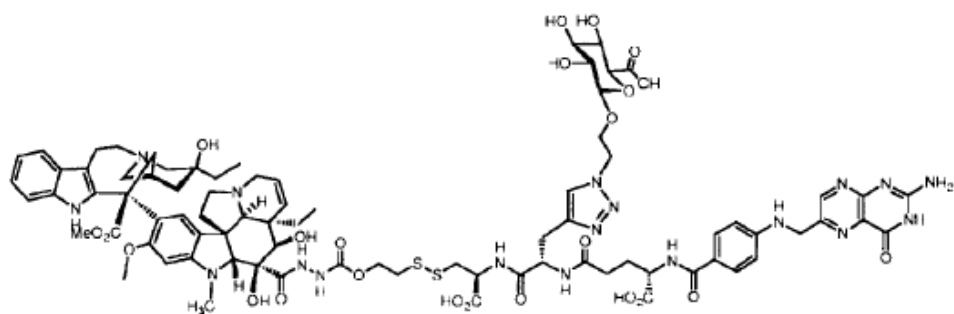


EC0565 Conjugado de everolimus. C₁₂₁H₁₈₃N₁₇O₅₀S₂, MW 2739,96, Masa exacta: 2738,17



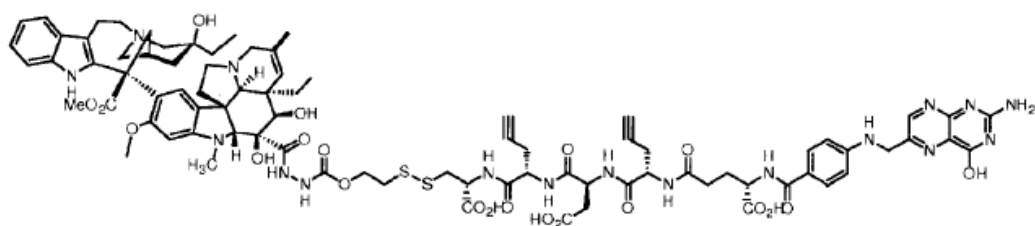
Conjugado de DAVLBH.

5

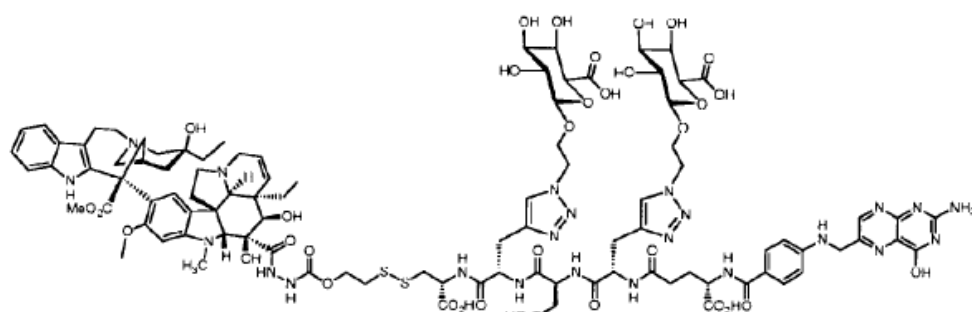


EC0400 Conjugado de DAVLBH. Preparado por ciclación de Huisgen del correspondiente alquino y azidoetilcarbohidrato; 2 eq. Ascorbato de Na, 1 eq. CuSO₄·5H₂O, THF/agua (1: 1); 5 eq. Ascorbato de Na, 2,5 eq. CuSO₄·5H₂O, THF/agua (9: 1); (10 mg). C₈₁H₁₀₀N₁₈O₂₄S₂, C, 54,84; H, 5,68; N, 14,21; O, 21,65; S, 3,62, MW 1773,90, masa exacta: 1772,66

10

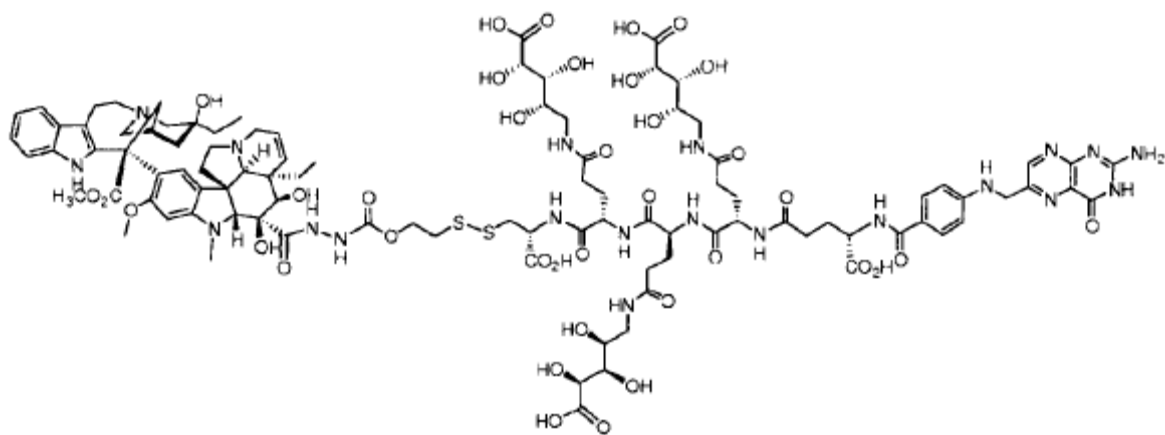


Conjugado de DAVLBH. Preparado a partir de EC0419. C82H97N17O21S2, MW 1720,88, Masa exacta: 1719,65 (90 mg).

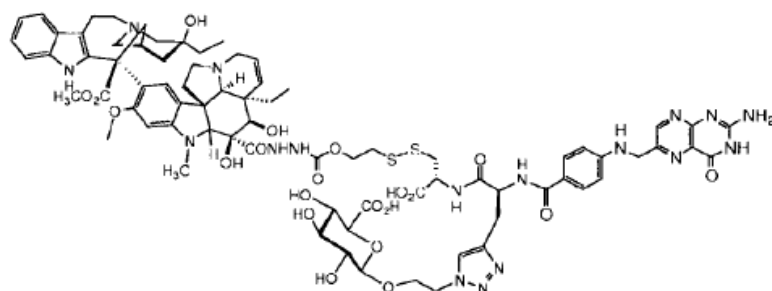


5

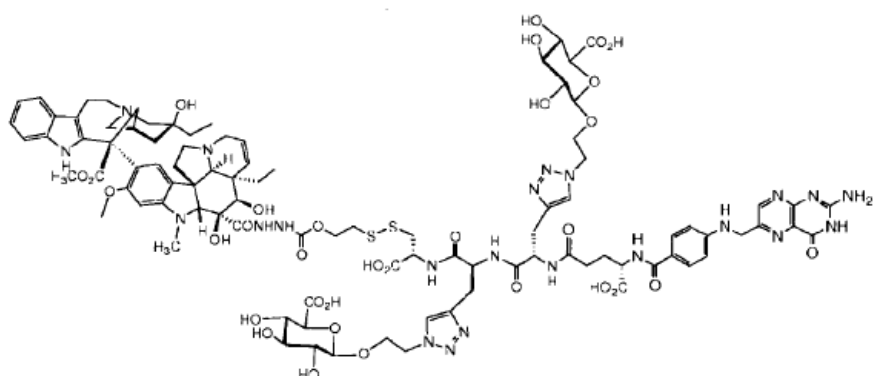
Conjugado EC0423 de DAVLBH. Preparado por ciclación Huisgen; C98H123N23O35S2, C, 52,38; H, 5,52; N, 14,34; O, 24,92; S, 2,85, MW 2247,29, Masa exacta: 2245,80



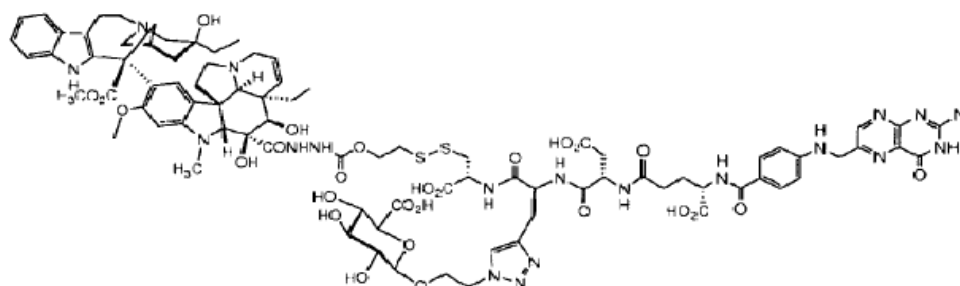
10 Conjugado EC0637 de DAVLBH. C98H130N20O37S2, MW 2244,32, Masa exacta: 2242,83



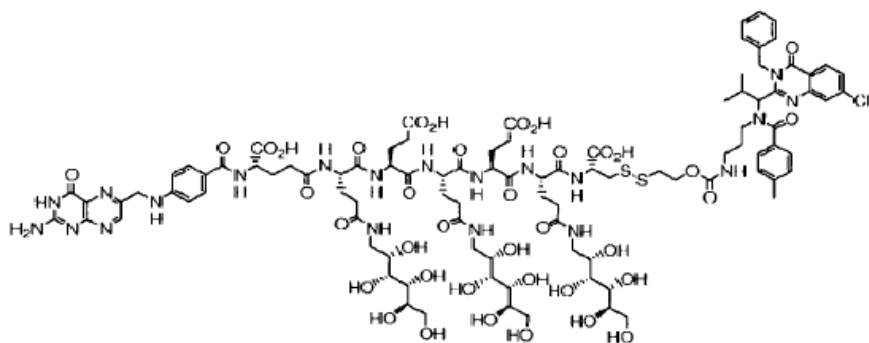
Conjugado de DAVLBII.



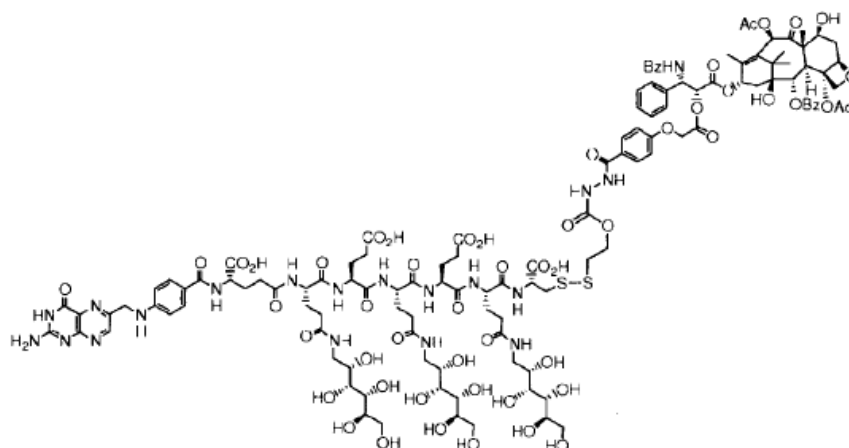
Conjugado de DAVLBH.



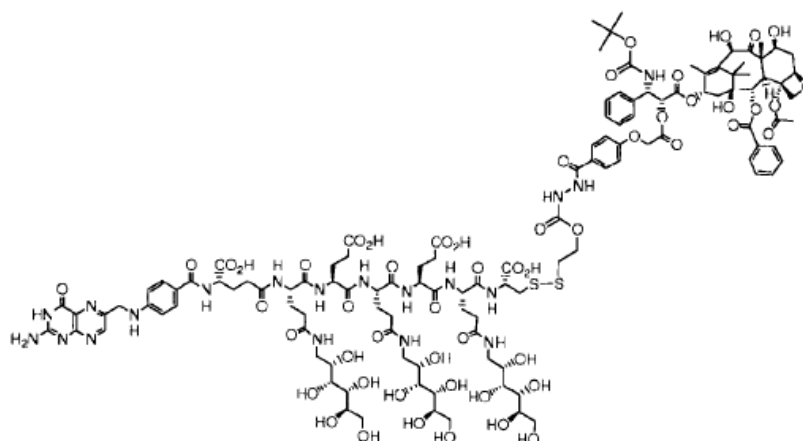
Conjugado de DAVLBH.



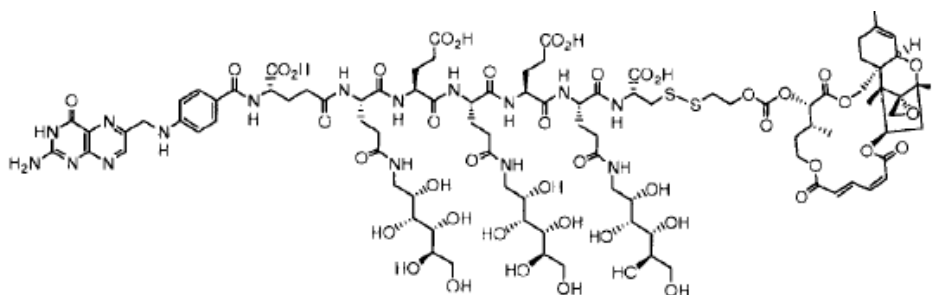
EC0581 Conjugado de ispinesib. C₉₈H₁₃₃CIN₂₀O₃₈S₂, MW 2298,80, Masa exacta: 2296,82



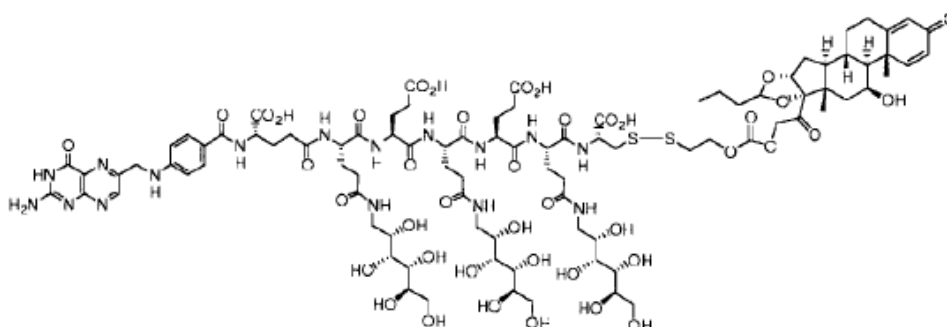
EC0561 Conjugado de paclitaxel. C₁₂₄H₁₅₉N₁₉O₅₃S₂, MW 2827,82, Masa exacta: 2825,98



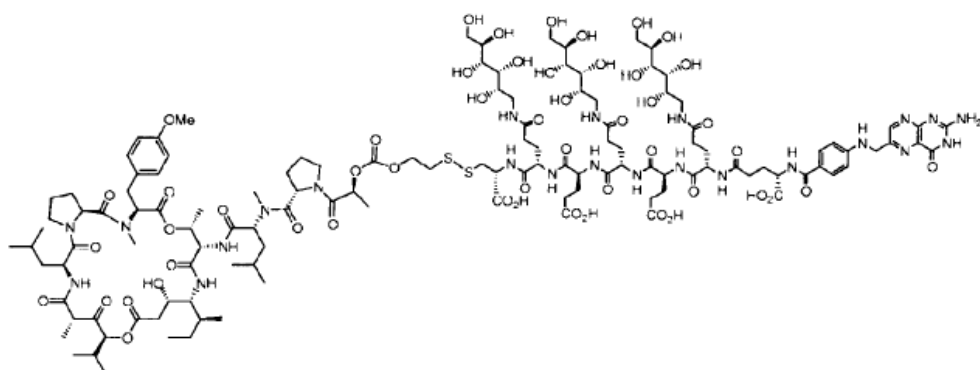
EC0594 Conjugado de docetaxel. C₁₂₀H₁₆₁N₁₉O₅₃S₂, MW 2781,79, Masa exacta: 2779,99



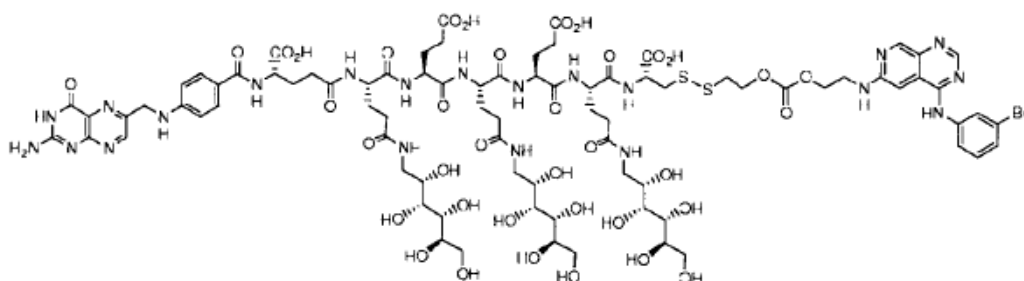
EC0598 Conjugado de Verucarin. C₉₅H₁₃₄N₁₆O₄₅S₂, MW 2284,29, Masa exacta: 2282,81



EC0600 Conjugado de Budesonida. C₉₃H₁₃₄N₁₆O₄₂S₂, C, 50,49; H, 6,11; N, 10,13; O, 30,37; S, 2,90, MW 2212,27, Masa exacta: 2210,83

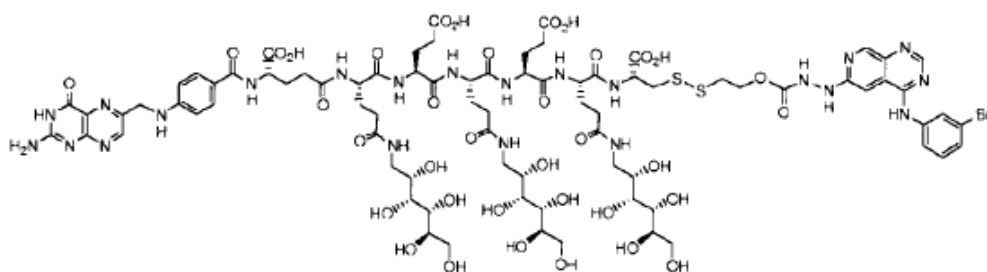


EC0610 Conjugado de Didemmina B. C₁₂₅H₁₈₉N₂₃O₅₁S₂, MW 2894,09, Masa exacta: 2892,23

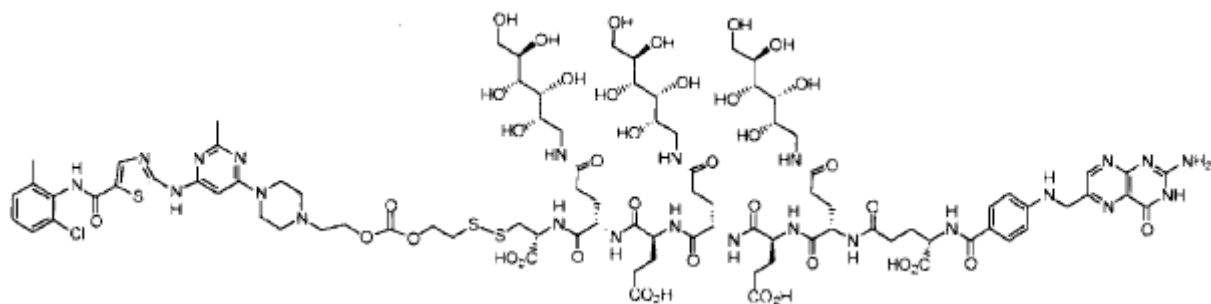


5

EC0631 Conjugado del inhibidor de la tirosina quinasa 4-[(3-bromofenil) amino] -6 - [(2-hidroxietil-amino) -pirido [3,4-d] pirimidina, C₈₃H₁₁₄BrN₂₁O₃₇S₂, MW 2141,95, Masa exacta: 2139,63

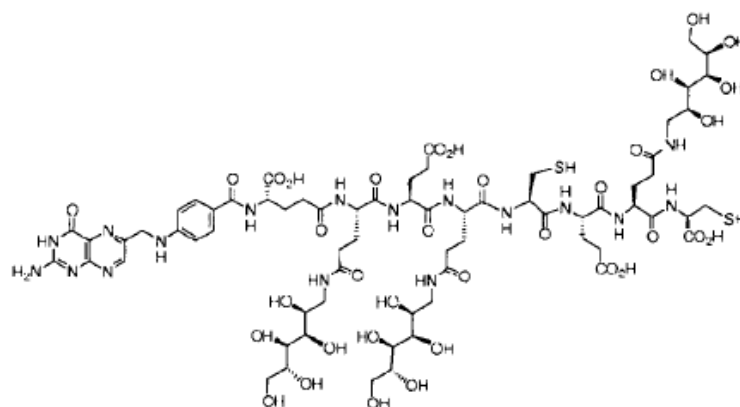


EC0640: Conjugado de 4-[(3-Bromofenil) amino] -6-hidrazino-pirido [3,4-d] pirimidina

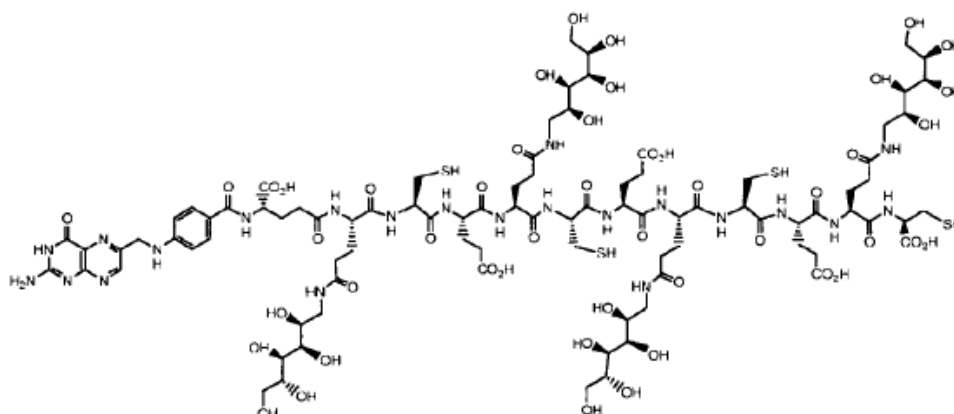


10

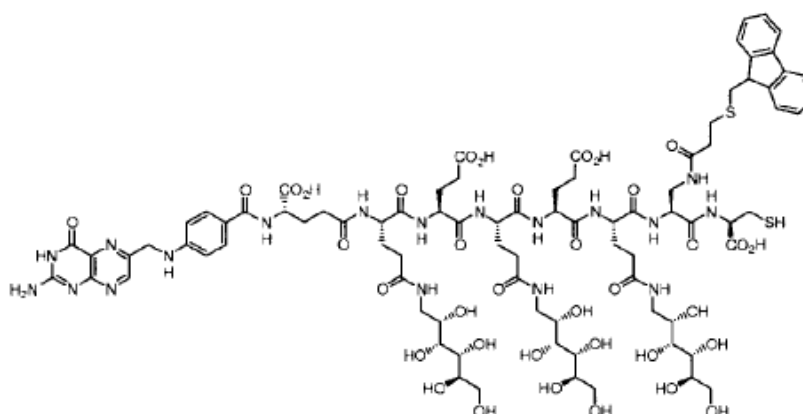
EC0663 Conjugado de Dasatinib. C₉₀H₁₂₆ClN₂₃O₃₈S₃, MW 2269,74, Masa exacta: 2267,75



EC0593 Multifarmaco intermedio para dos fármacos. C₆₈H₁₀₃N₁₇O₃₅S₂, MW 1782,77, Masa exacta: 1781,62

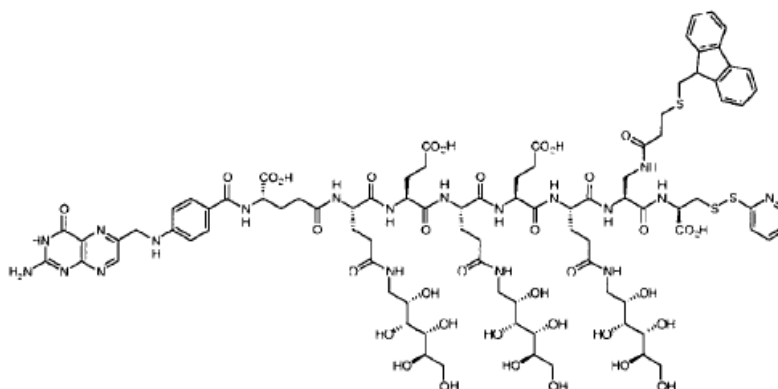


EC0613 Multifarmaco intermedio para tres fármacos. C₉₀H₁₄₀N₂₂O₄₇S₄, MW 2410,45, Masa exacta: 2408,81

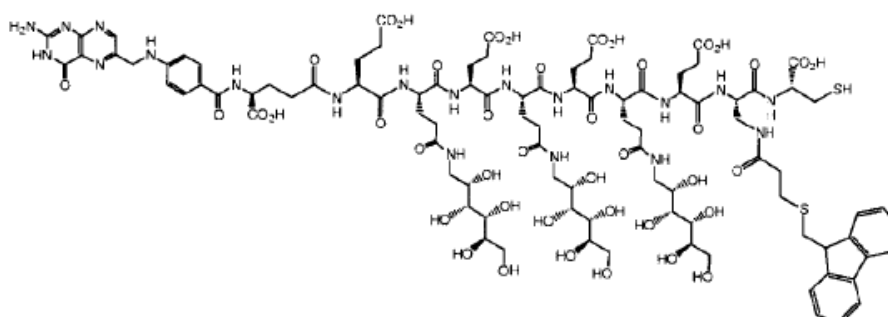


5

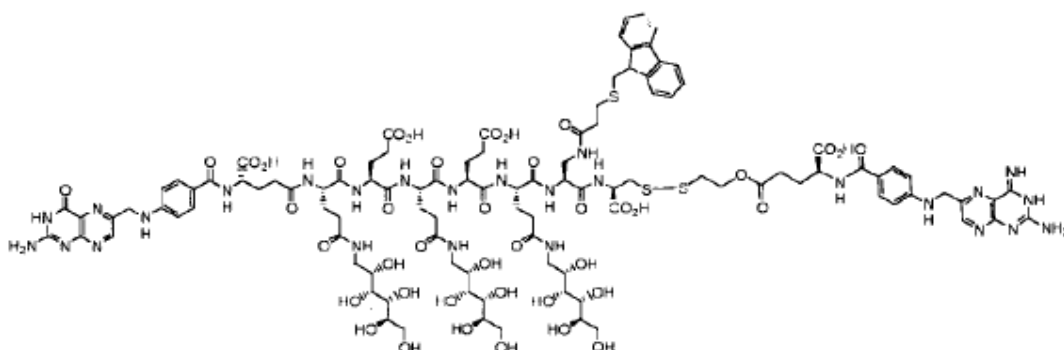
EC0542 Intermedio multifarmacos opcionalmente selectivo para dos fármacos. C₈₅H₁₁₈N₁₈O₃₆S₂, C, 50,24; H, 5,85; N, 12,41; O, 28,34; S, 3,16, MW 2032,08, Masa exacta: 2030,74



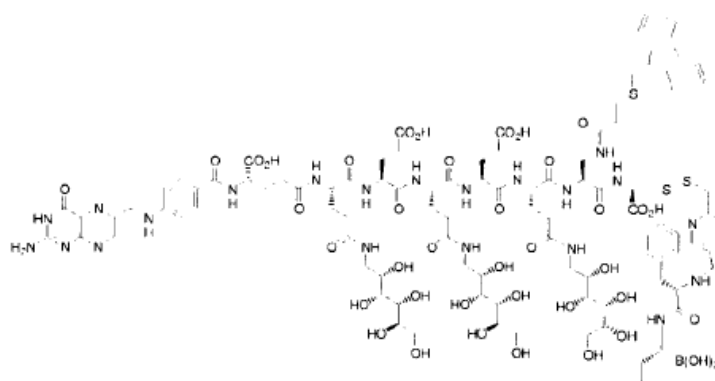
EC0559 Intermedio multifármacos opcionalmente selectivo para dos fármacos. C90H121N19O36S3, MW 2141,22, Masa exacta: 2139,74



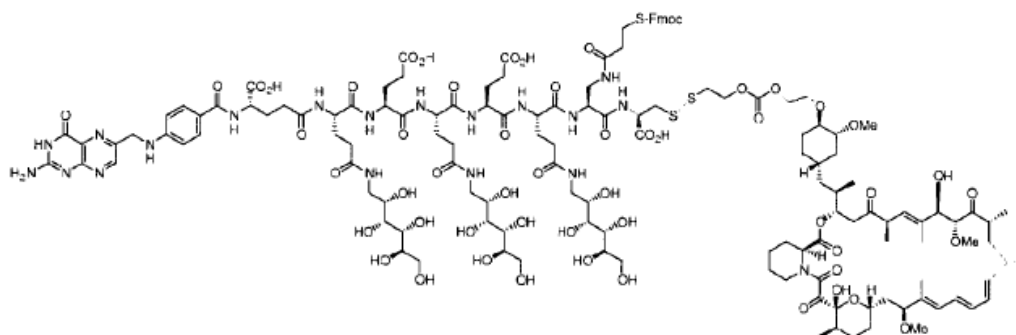
- 5 EC0682 Intermedio multifármacos opcionalmente selectivo para dos fármacos. C₉₅H₁₃₂N₂₀O₄₂S₂, MW 2290,30, Masa exacta: 2288,82



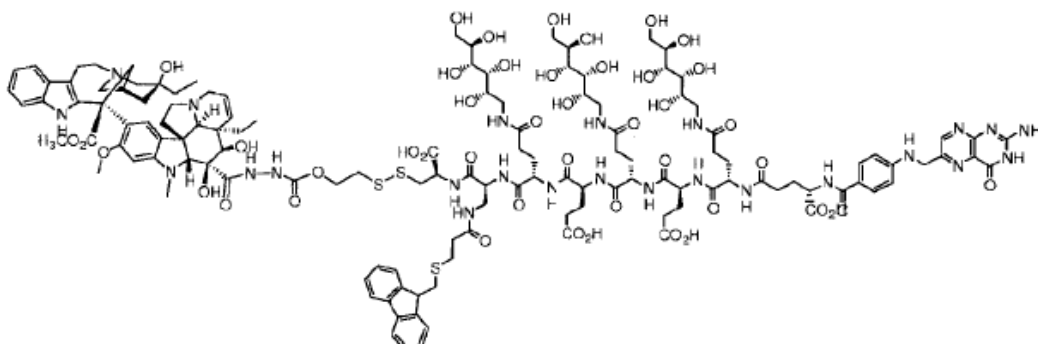
EC0646 Conjugado de aminopterina e intermedio para conjugado multifármaco. C106H140N26O41S3, MW 2530,59, Masa exacta: 2528,88



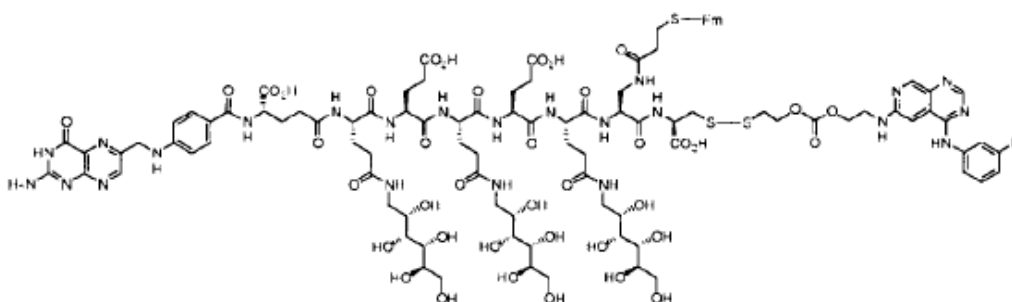
EC0555 Conjugado de Bortezomib (Velcade) e intermedio para conjugado multifármaco. C105H139BN22O38S3, C, 52,02; H, 5,78; B, 0,45; N, 12,71; O, 25,08; S, 3,97, MW 2424,36, Masa exacta: 2422,89



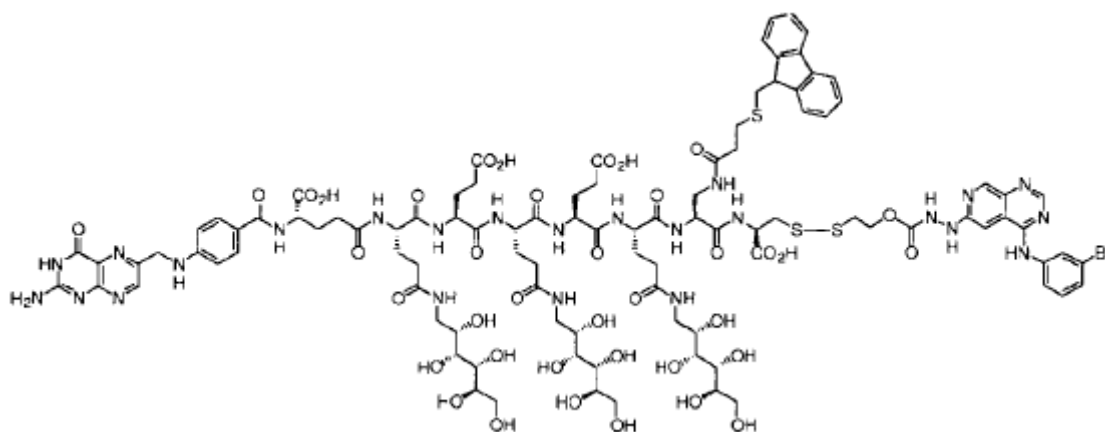
5 EC0606 Conjugado de Everolimus e intermedio para conjugado multifármaco. C141H203N19O52S3, C, 54,76; H, 6,62; N, 8,61; O, 26,90; S, 3,11, MW 3092,42, Masa exacta: 3090,30



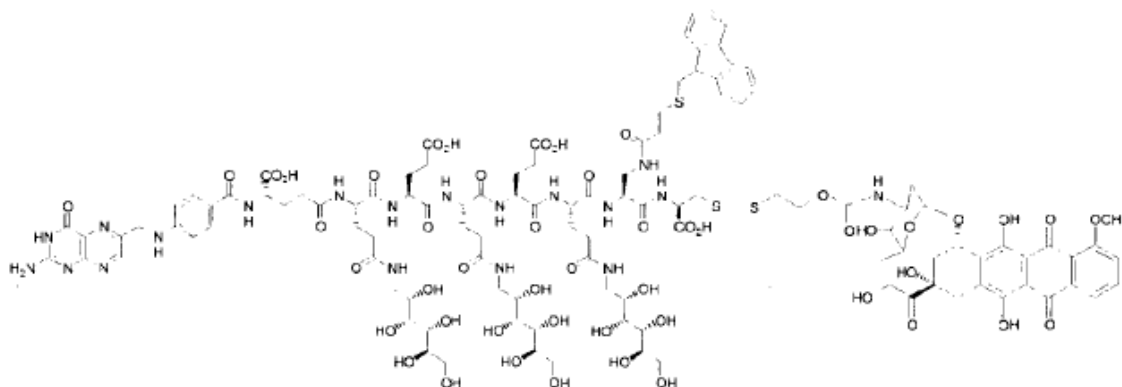
EC0633 Conjugado de DAVLBH e intermedio para conjugado multifármaco. C131H176N24O45S3, MW 2903,13, Masa exacta: 2901,14



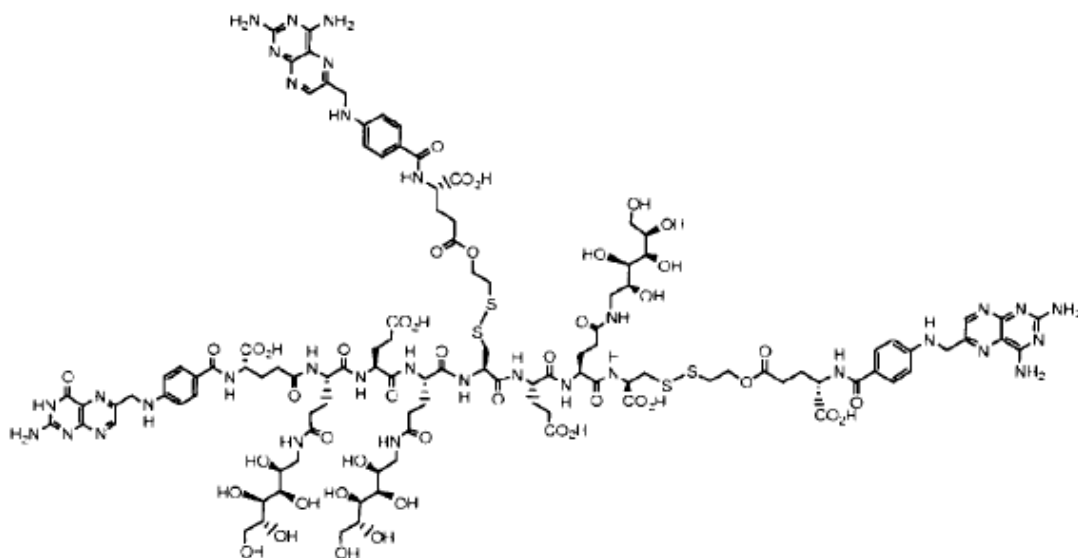
10 EC0661 Conjugado de 4-[(3-Bromofenil)amino]-6-amino-pirido [3,4-d] pirimidina e intermedio para el conjugado multifármaco. C145H209BrN24O55S4, MW 3376,51, Masa exacta: 3373,24



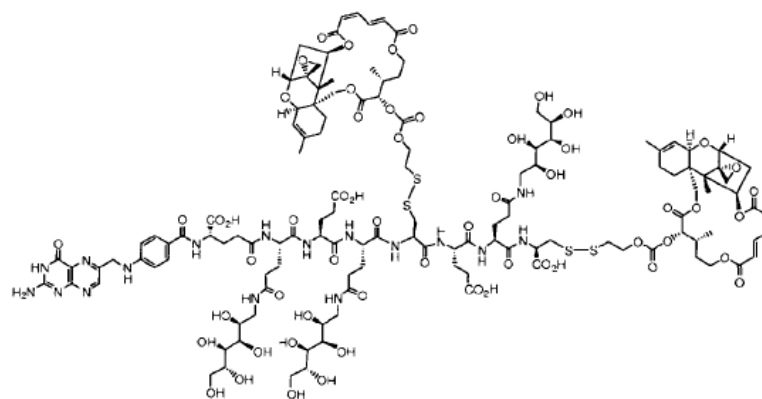
EC0679 Conjugado de 4-[(3-Bromofenil) amino] -6-hidrazino-pirido [3.4-d] pirimidina e intermedio para el conjugado multifármaco. C101H131BrN24O38S3, MW 2465,36, Masa exacta: 2462,74



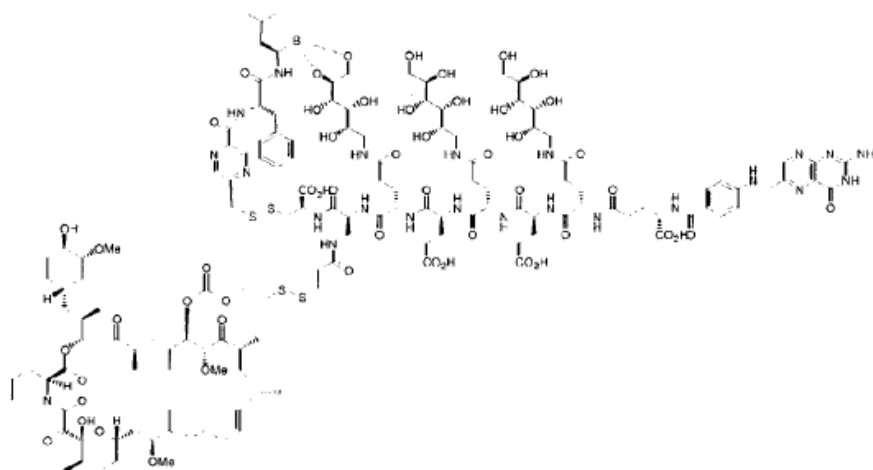
5 EC0693 Conjugado de doxorubicina e intermedio para conjugado multifármaco. C115H149N19O49S3, MW 2677,71, Masa exacta: 2675,89



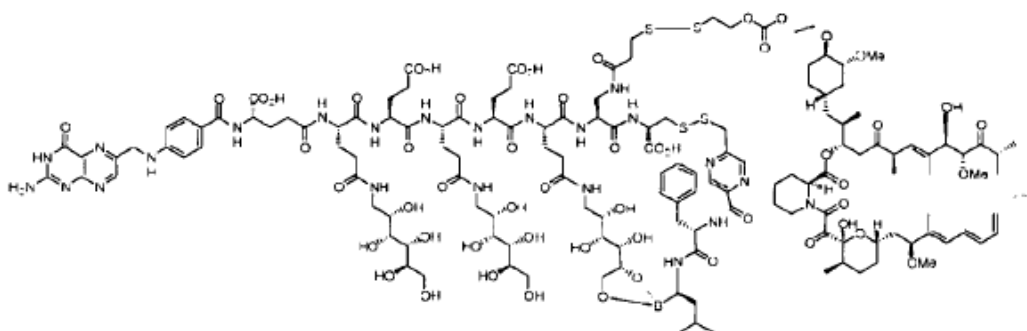
EC0647 Conjugado de bis aminopterina. C110H147N33O45S4, MW, 2779,80, Masa exacta: 2777,9112, m/z: 2778,91 (100,0 %), 2777,91 (74,4 %), 2779,92 (62,2 %)



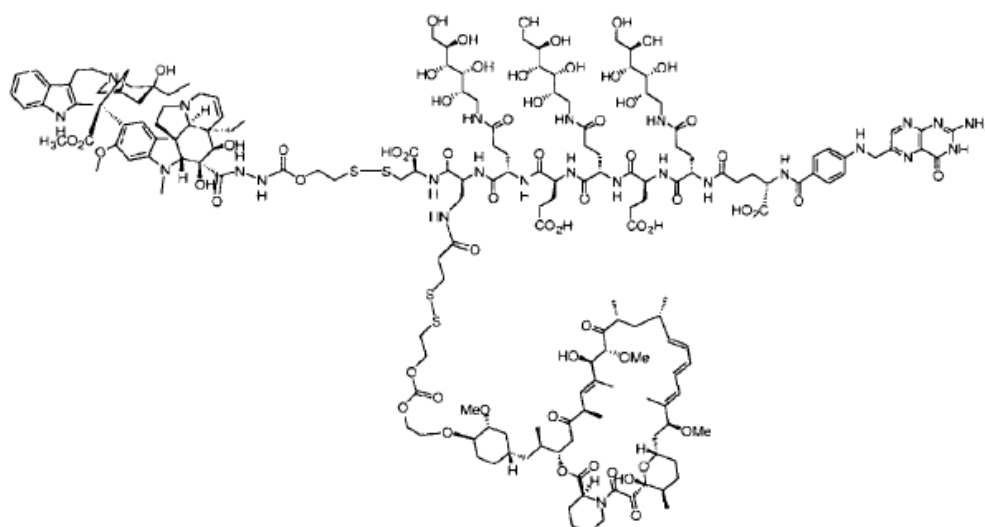
EC0605 Conjugado de Bis-verucarin



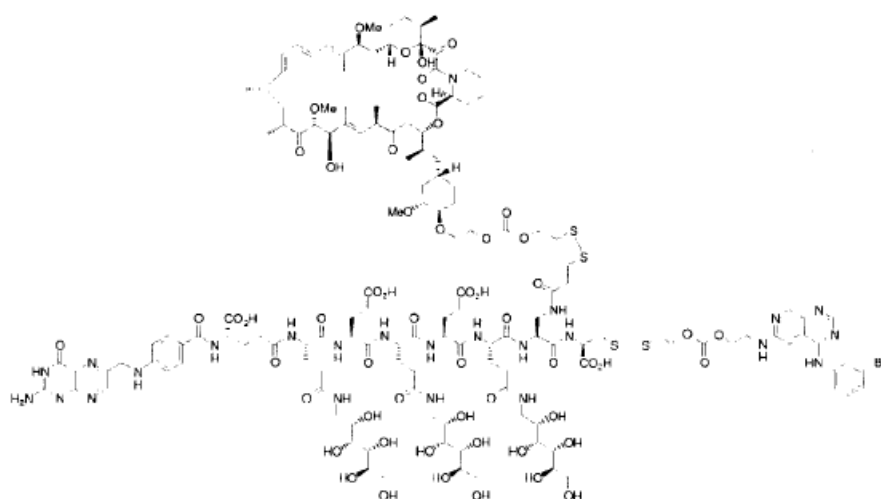
EC0563 Conjugado de Bortezomib y Rapamicina.



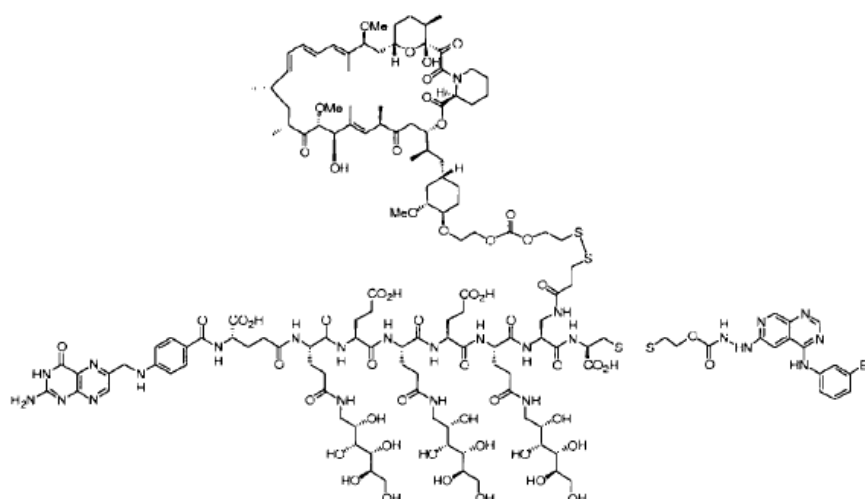
Conjugado EC0582 de Bortezomib y Everolimus. C₁₄₇H₂₁₄BN₂₃O₅₄S₄, C, 53,40; H, 6,52; B, 0,33; N, 9,74; O, 26,13; S, 3,88, MW 3306,47, Masa exacta: 3304,37



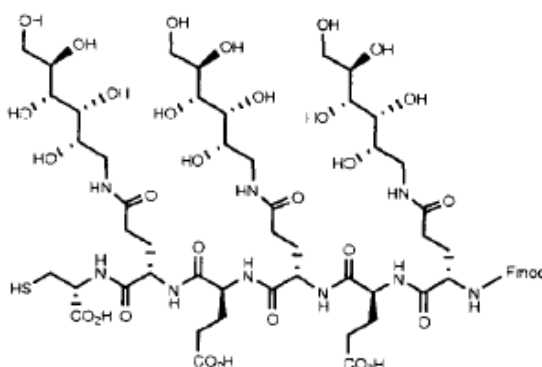
EC0636 Conjugado de DAVLBH y Everolimus. C173H251N25O61S4. MW 3785,23, Masa exacta: 3782,62



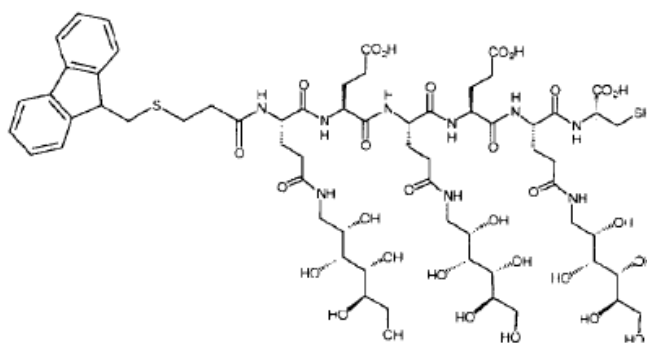
5 EC0664 Conjugado de Everolimus y 4-[(3-Bromofenil) amino]-6-amino-pirido [3,4-d] pirimidina. C145H209BrN24O55S4, MW 3376,51, Masa exacta: 3373,24



EC0680 Conjugado de Everolimus y 4-[(3-Bromofenil) amino] -6-hidrazino-pirido [3,4-d] pirimidina.
C143H206BrN25O54S4, MW 3347,47, Masa exacta: 3344,22

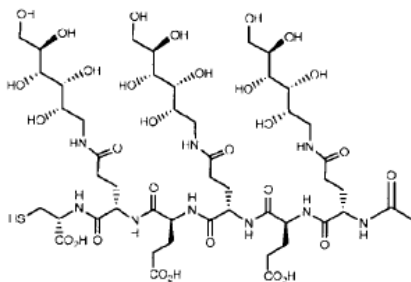


EC0584 Intermedio para la entrega opcional no dirigida. C61H91N9O31S, MW 1478,48, Masa exacta: 1477,55

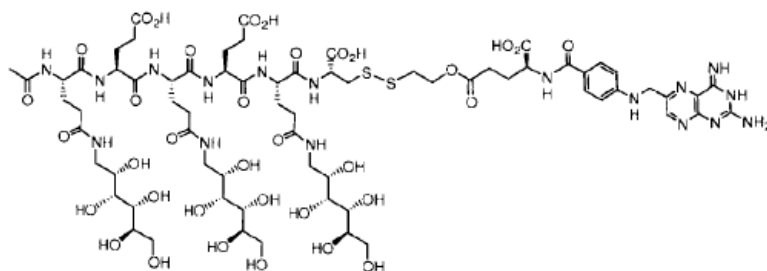


5

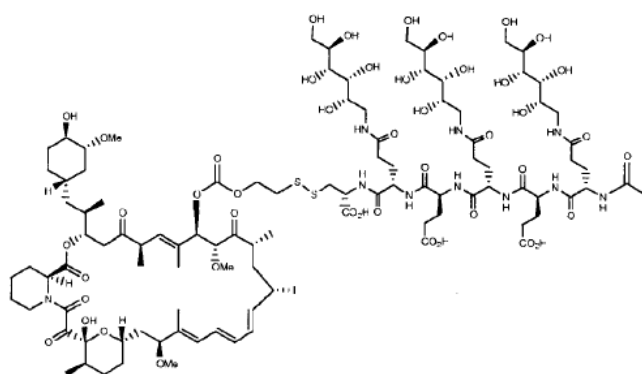
EC0634 Intermedio para la entrega opcional no dirigida. C63H95N9O30S2, MW 1522,60, Masa exacta: 1521,56



EC0586 Intermedio para la entrega opcional sin destino. C48H83N9O30S, MW 1298,28, Masa exacta: 1297,50



10 EC0588 Intermedio conjugado de aminopterina para administración opcional no dirigida. C69H105N17O35S2, MW 1796,79, Masa exacta: 1795,64



EC0591 Intermedio conjugado de rapamicina para un suministro opcional no dirigido. C₁₀₂H₁₆₄N₁₀O₄₅S₂, C, 52,93; H, 7,14; N, 6,05; O, 31,11; S, 2,77, MW 2314,57, Masa exacta: 2313,03

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula.

B-L-A

5 en la que B es un ligando de unión al receptor que se une a un receptor de células diana, L es un enlazante polivalente que comprende uno o más enlazantes espaciadores hidrófilos, y A representa uno o más agentes de diagnóstico, terapéuticos o de formación de imágenes, en la que al menos uno de los enlazantes espaciadores hidrófilos comprende al menos tres grupos polihidroxilo.

10 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los enlazantes espaciadores hidrófilos se forma principalmente a partir de carbono, hidrógeno y oxígeno, y tiene una proporción carbono/oxígeno de aproximadamente 3: 1 o menor; o en el que al menos uno de los enlazantes espaciadores hidrófilos se forma principalmente a partir de carbono, hidrógeno y nitrógeno, y tiene una proporción carbono/nitrógeno de aproximadamente 3: 1 o menor.

15 3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los enlazantes espaciadores hidrófilos comprende uno o más ácidos aspárticos, uno o más ácidos glutámicos, una o más argininas, uno o más beta amino alaninas, uno o más divalentes 1,4-piperazinas, en el que al menos una parte de las 1,4-piperazinas están incluidas en la cadena de átomos que conectan el ligando de unión (B) con al menos uno de los agentes (A), uno o más grupos polihidroxilo unidos a triazol que contienen enlazantes, uno o más enlazantes que contienen los grupos polihidroxilo unidos a amida, uno o más derivados EDTA, o una combinación de los anteriores.

20 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el enlazante L comprende además un enlazante liberable de disulfuro.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ligando de unión B es un ligando de unión al receptor de folato.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que el ligando de unión B es un folato.

25 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los agentes A es un agente terapéutico para tratar un cáncer.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y opcionalmente un portador, diluyente o excipiente para los mismos, o una combinación de los mismos.

30 9. Un procedimiento de uso del compuesto o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la formación de imágenes o el diagnóstico de una enfermedad o afección, o una combinación de las mismas, en el que la formación de imágenes o el diagnóstico, o una combinación de los mismos incluye dirigir a una célula que expresa o sobreexpresa un receptor capaz de unirse al ligando de unión B al receptor.

35 10. El compuesto o la composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o afección, o una combinación de las mismas, en el que el tratamiento incluye dirigir una célula que expresa o sobreexpresa un receptor capaz de unirse al ligando de unión B al receptor.

40 11. Uso de un compuesto o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección, o una combinación de estas, en el que el tratamiento incluye dirigir una célula que expresa o sobreexpresa un receptor capaz de unirse al ligando de unión B al receptor.

FIGURA 1

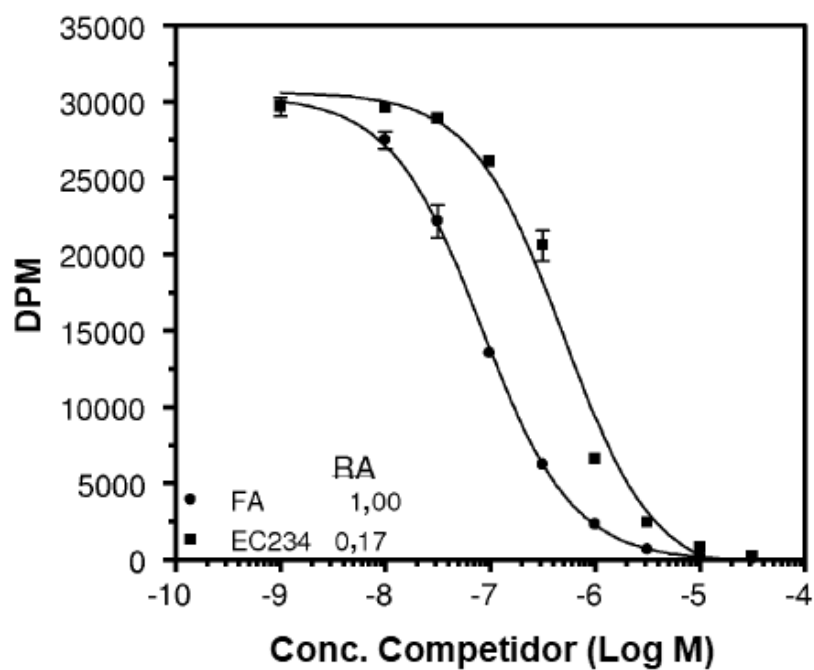


FIGURA 2

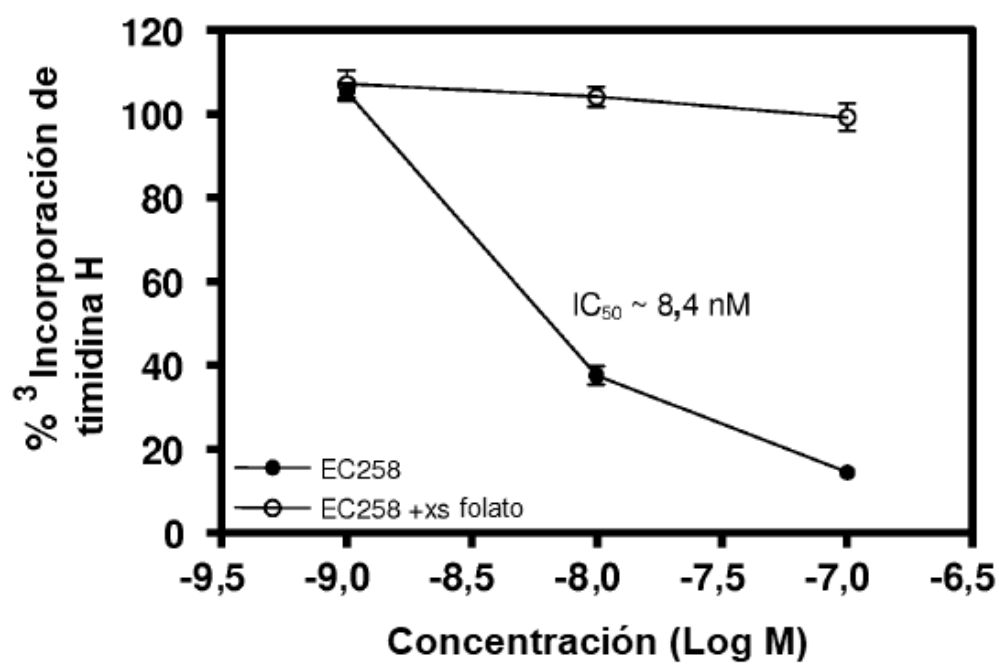


FIGURA 3A

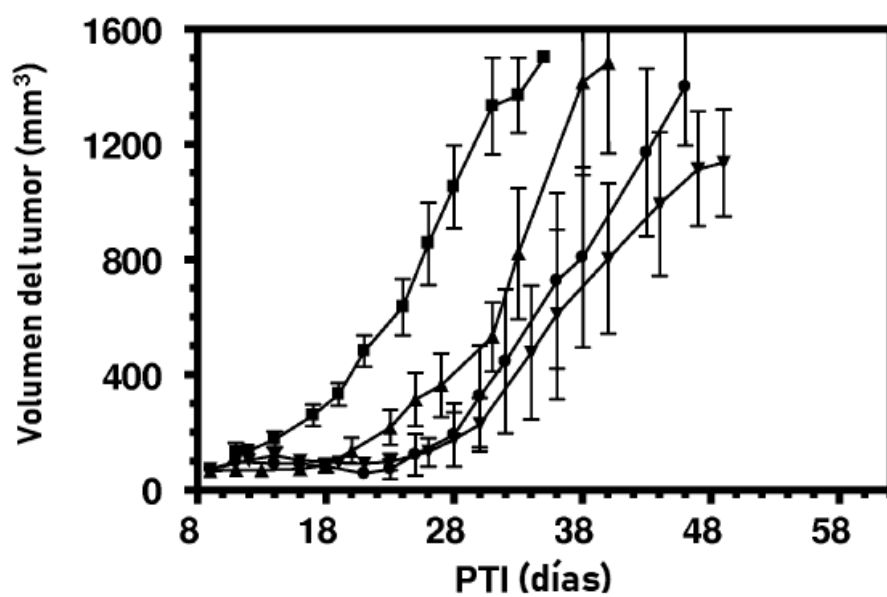


FIGURA 3B

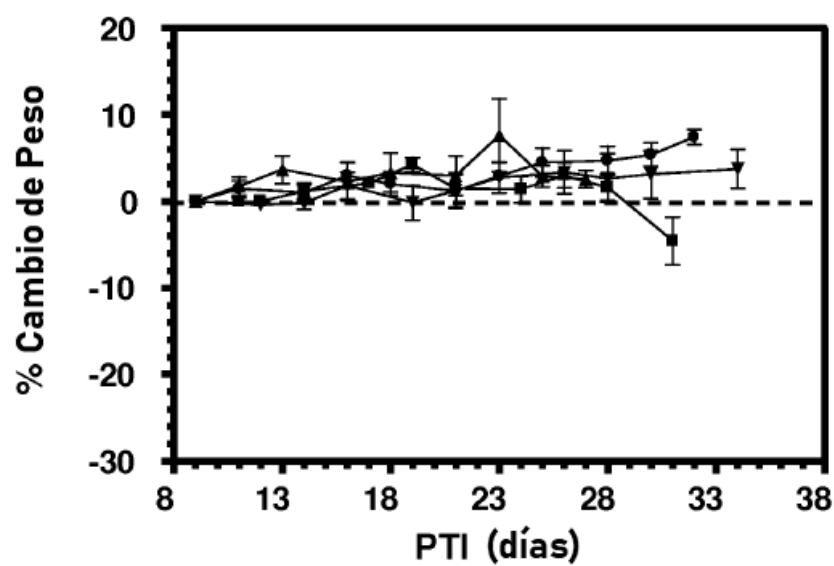


FIGURA 4A

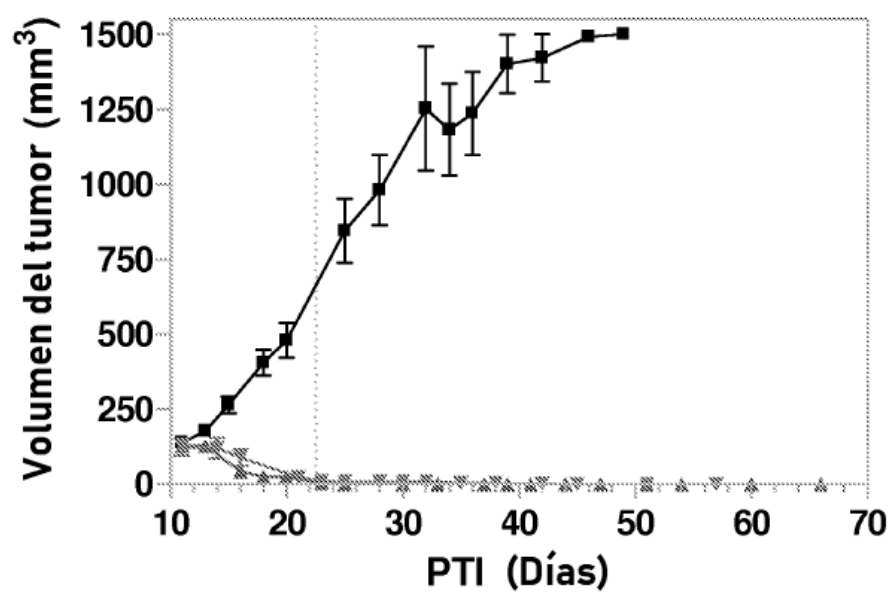


FIGURA 4B

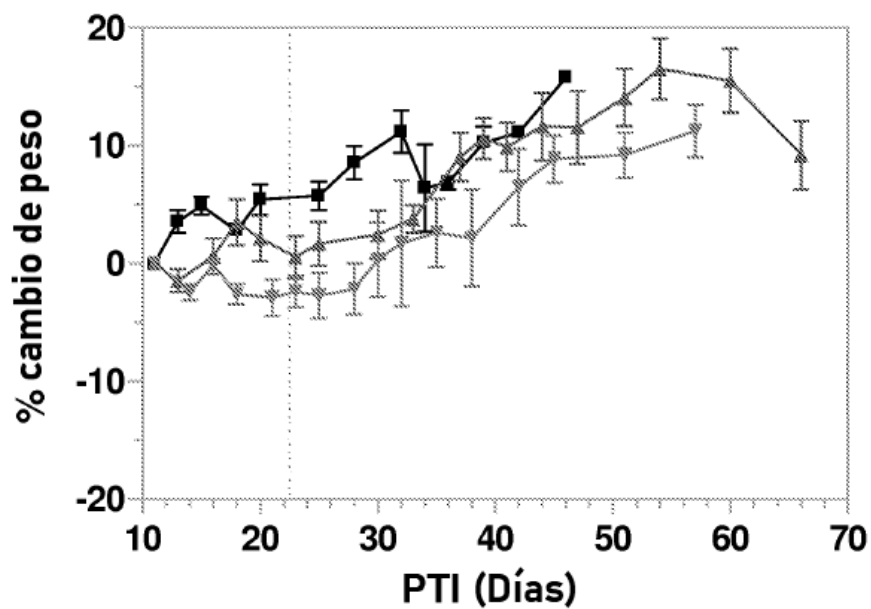


FIGURA 5A

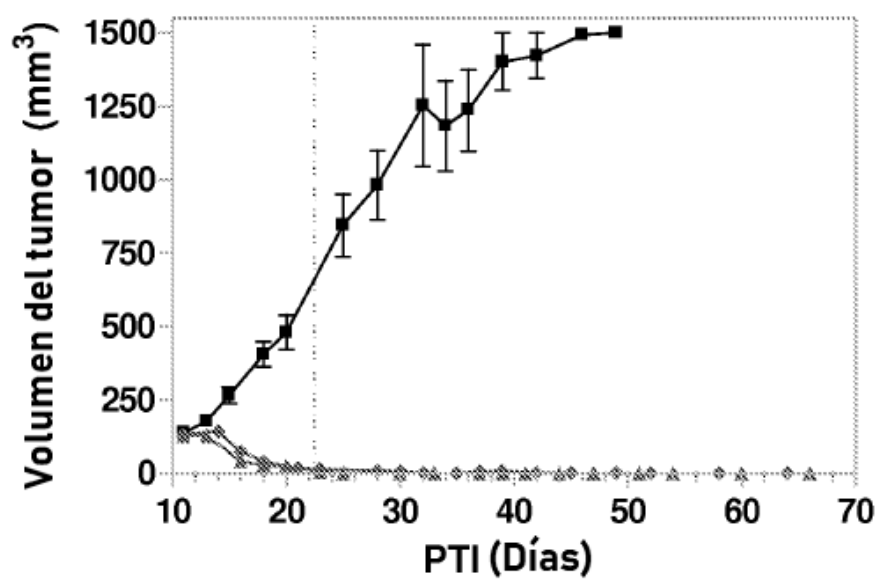


FIGURA 5B

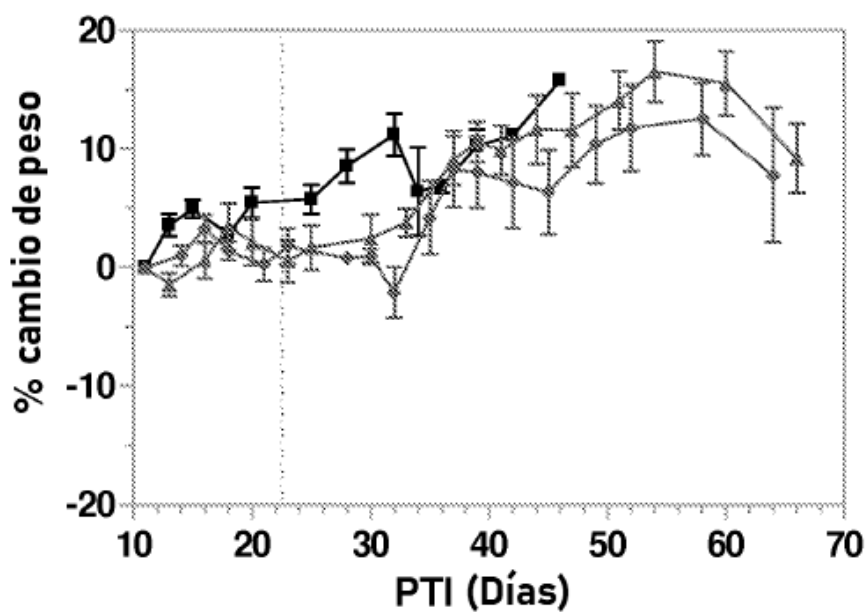


FIGURA 6A

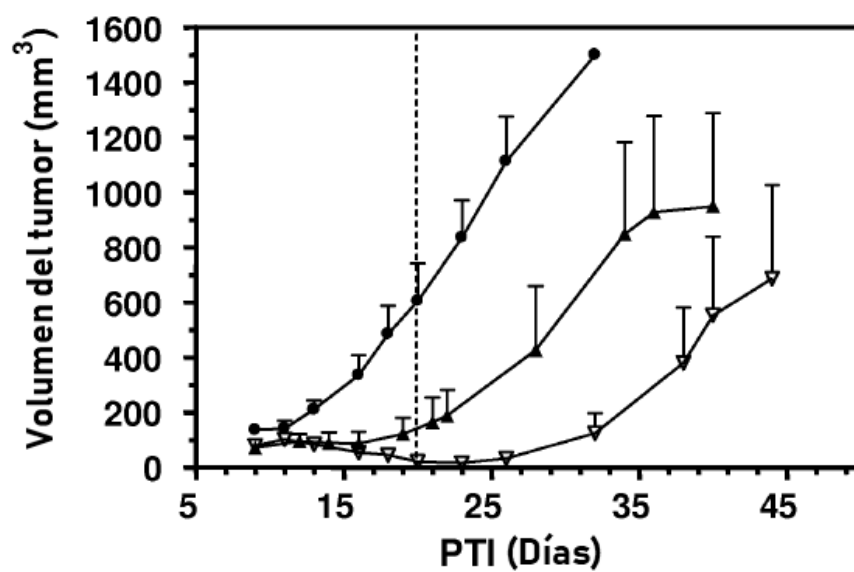


FIGURA 6B

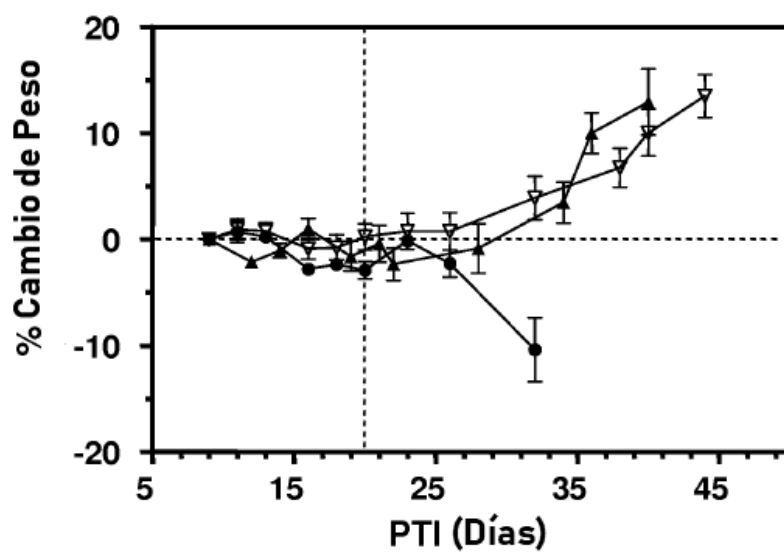


FIGURA 7A

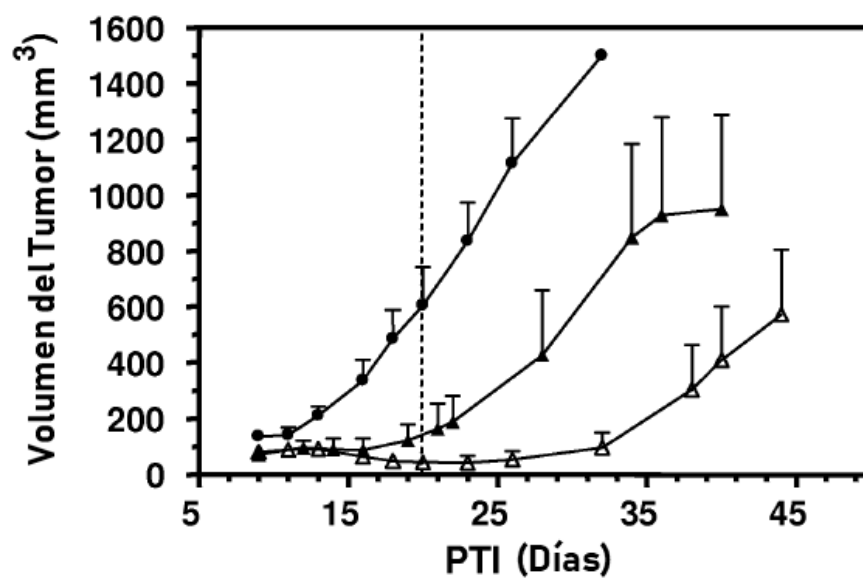


FIGURA 7B

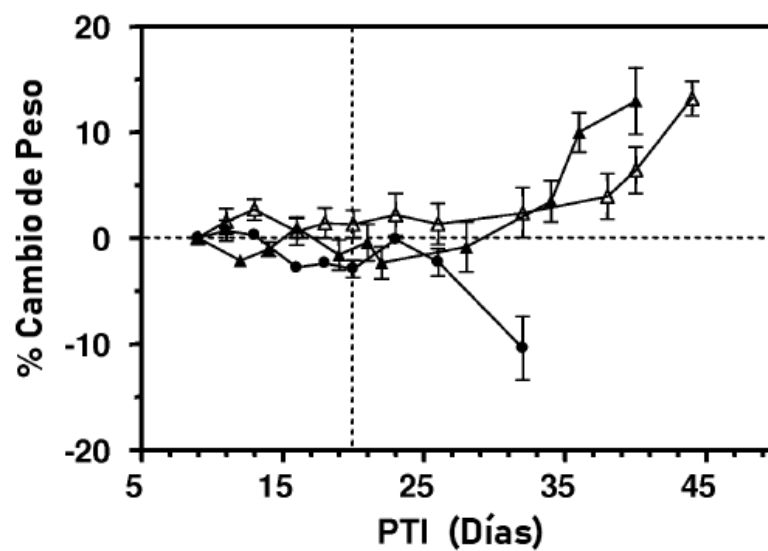


FIGURA 8A

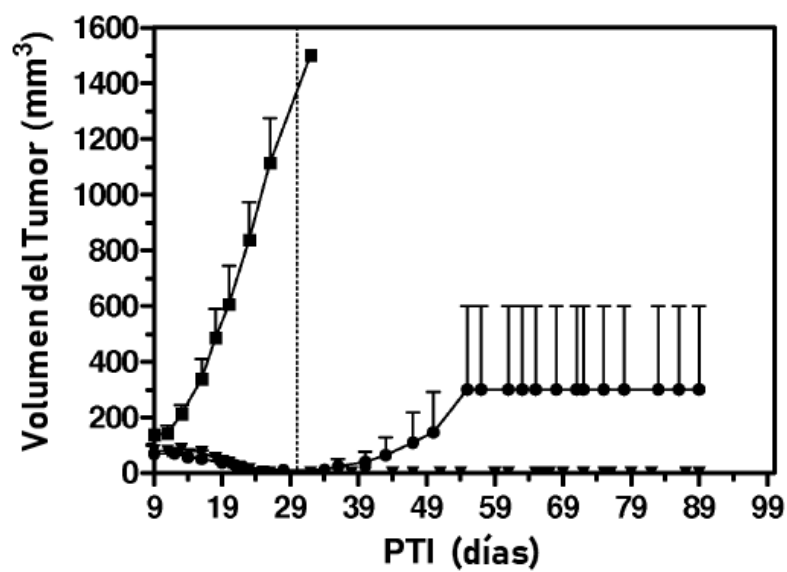
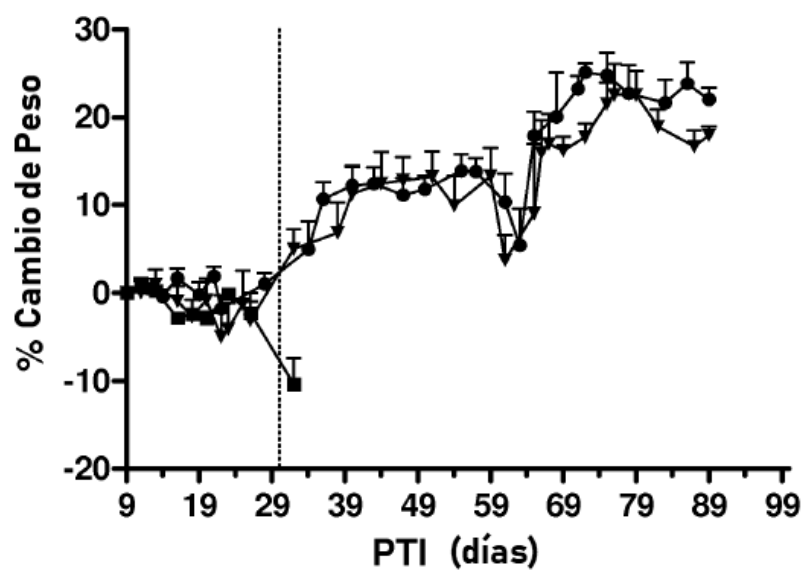


FIGURA 8B



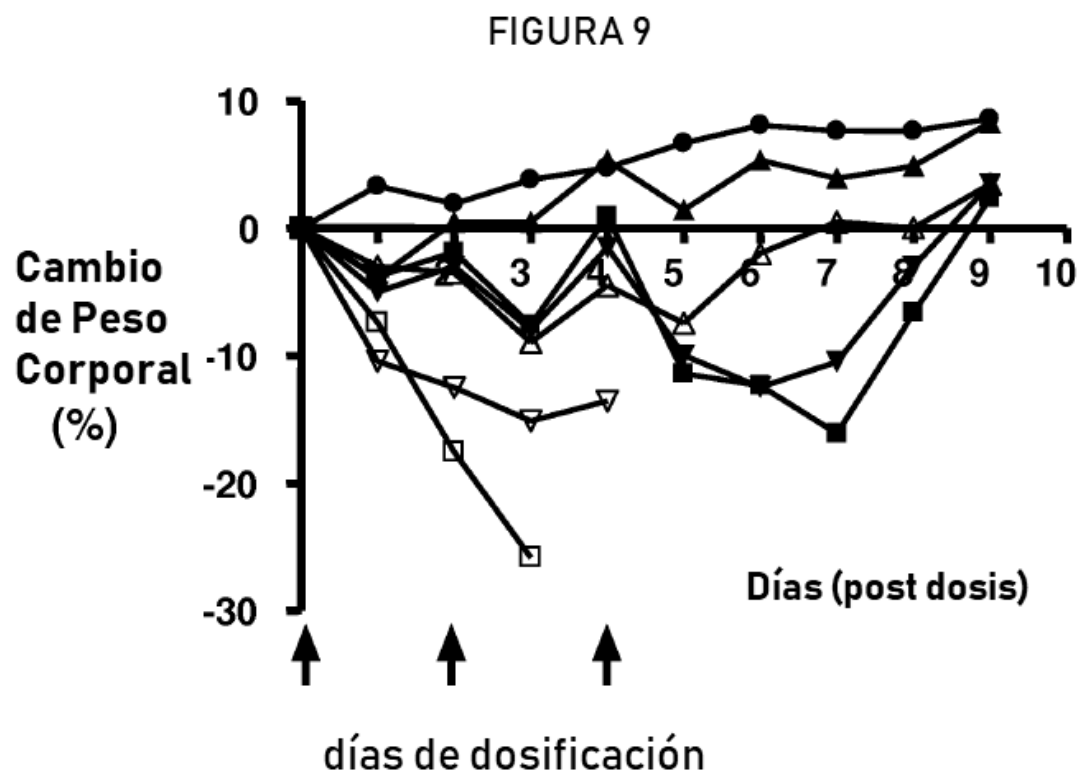


FIGURA 10A

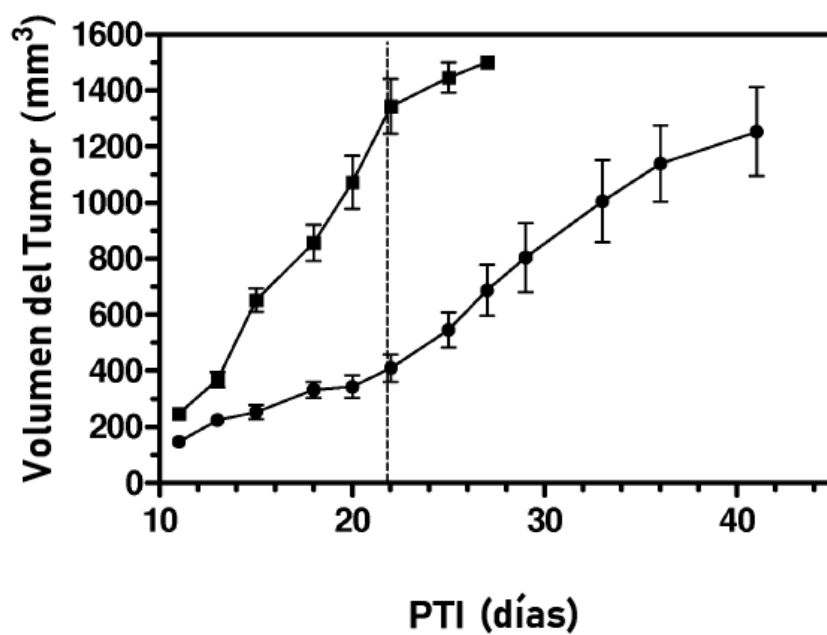


FIGURA 10B

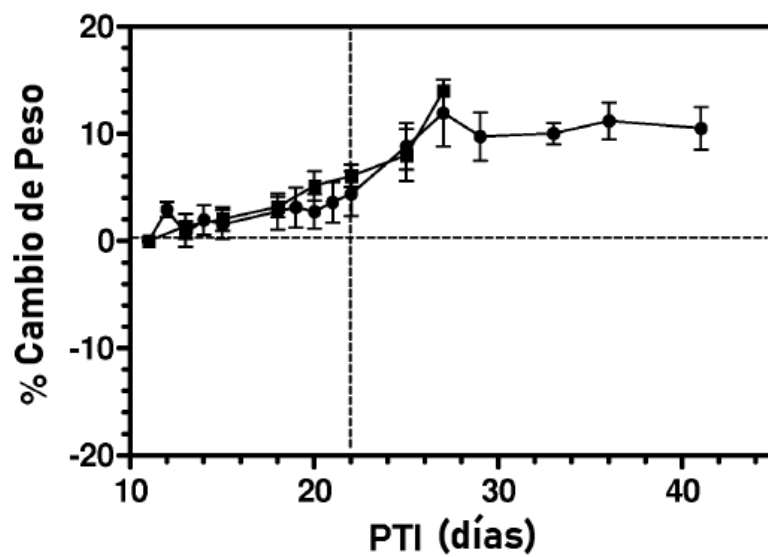


FIGURA 11

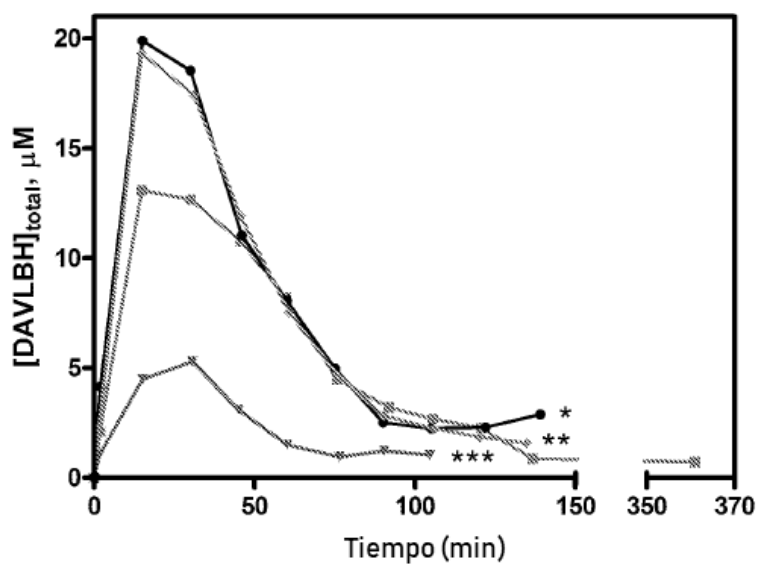


FIGURA 12

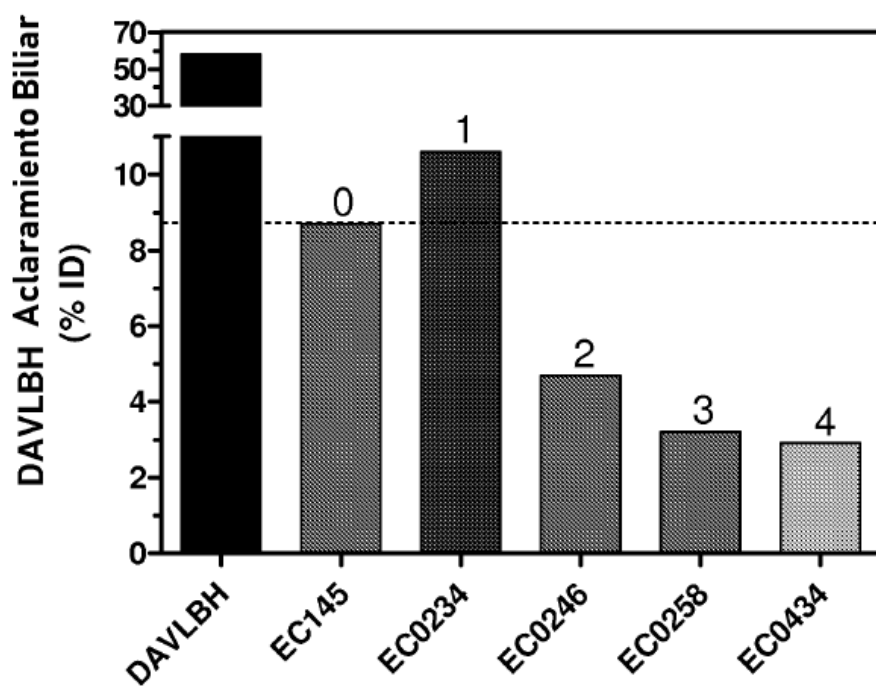


FIGURA 13

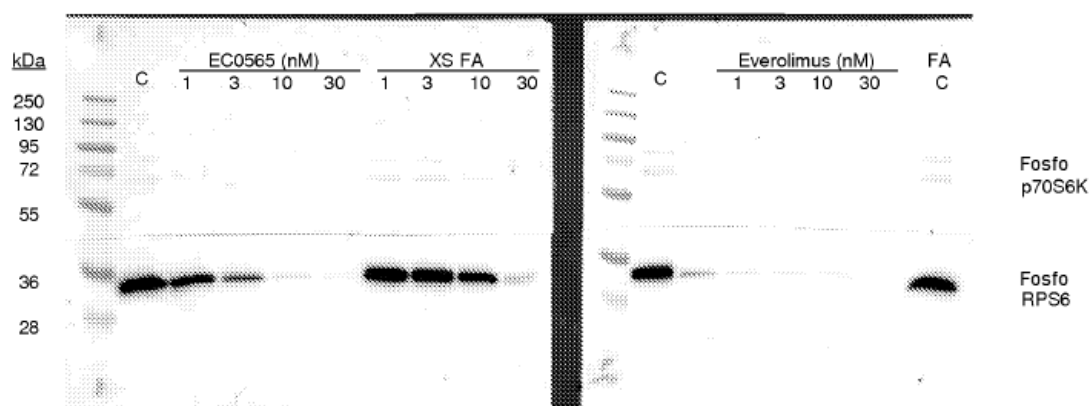


FIGURA 14

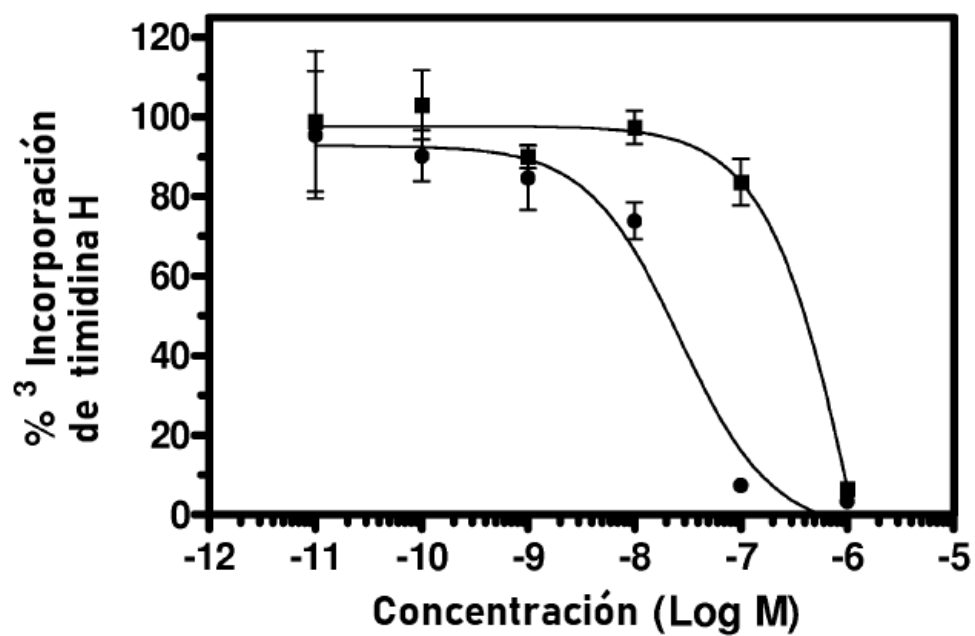


FIGURA 15

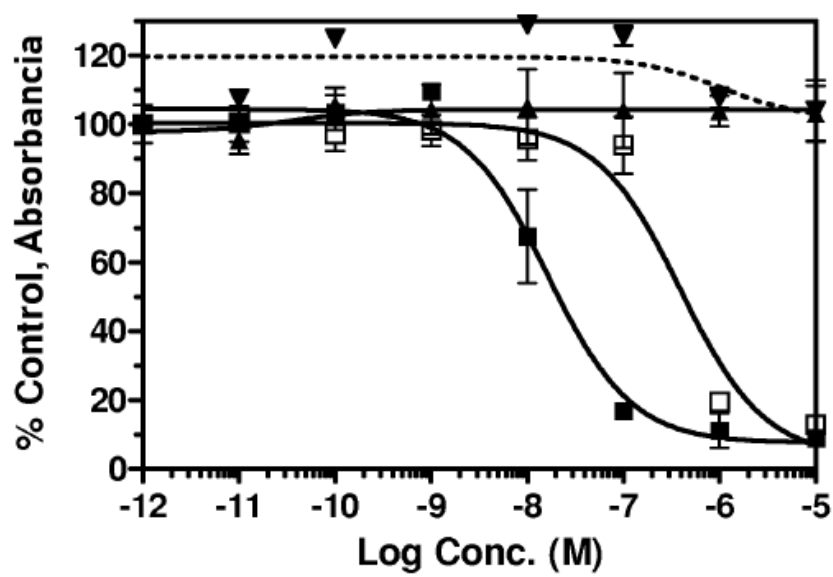


FIGURA 16

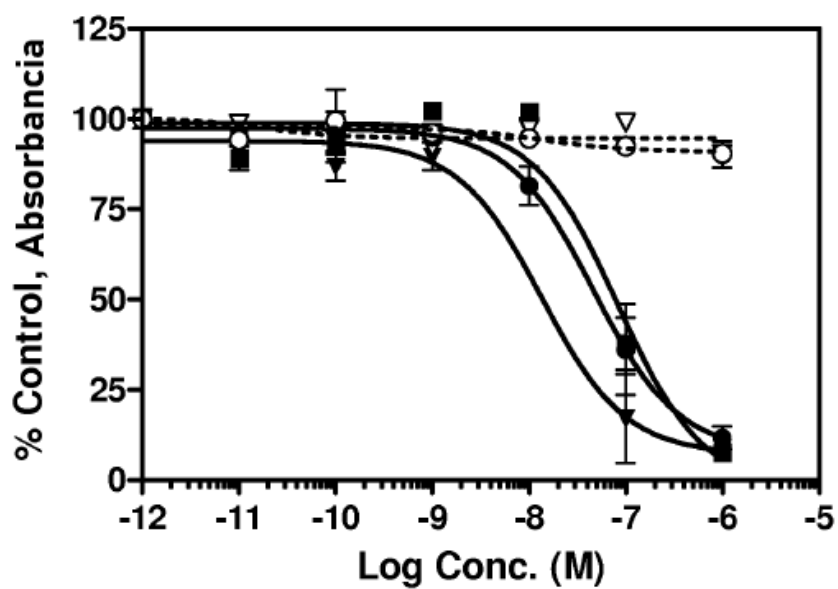


FIGURA 17

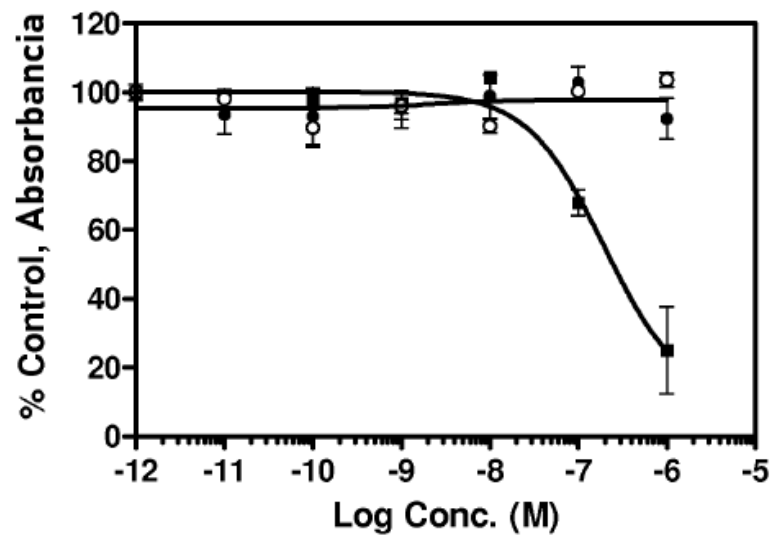


FIGURA 18

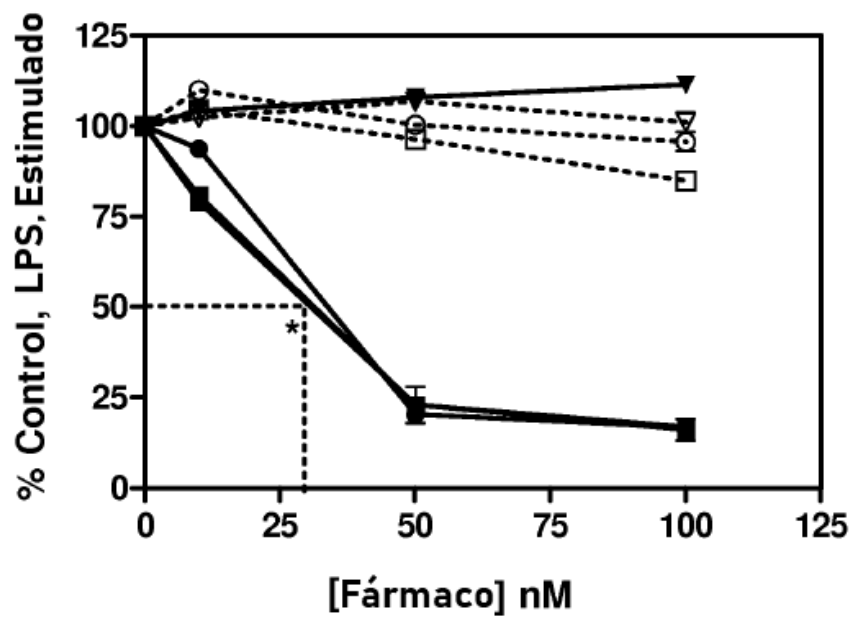


FIGURA 19

