

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(1) Número de publicación: 2 735 348

51 Int. Cl.:	
A61K 47/65	(2007.01)
A61K 47/55	(2007.01)
A61K 47/54	(2007.01)
A61K 51/08	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07B 59/00	(2006.01)
C07K 5/083	(2006.01)
A61K 31/433	(2006.01)
A61K 31/535	(2006.01)
A61K 38/05	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacior	nal: 03.	02.2015	PCT/EP2015/05221	4
87 Fecha y número de publicación internacional:	06.08.20 ⁻	15 WO1	5114171	
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	03.02.20	15 E 157	'02001 (7)	
Fecha y número de publicación de la concesión europea:	17.04.201	19 EP 37	102241	

54 Título: Conjugados de fármaco de molécula pequeña



ES 2 735 348 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de fármaco de molécula pequeña

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un ligando de bajo peso molecular para la unión a anhidrasa carbónica IX (CAIX) tal como se define en las reivindicaciones.

10 Antecedentes

El uso de agentes citotóxicos es la base del tratamiento de cáncer y otros estados patológicos. De manera ideal, los agentes citotóxicos deben acumularse en el sitio de enfermedad, evitando tejidos normales. En realidad, esto no ocurre. Muchos fármacos anticancerosos no se acumulan preferiblemente en tumores sólidos. De hecho, se ha demostrado en ratones que tienen tumores que solamente una mínima parte del fármaco inyectado alcanza la masa

15 neoplásica en comparación con la cantidad de agente citotóxico que alcanza órganos saludables.

La administración dirigida de agentes citotóxicos muy potentes a tejidos enfermos es, por tanto, deseable para el tratamiento de cáncer y otros estados graves. Al unir un efector terapéutico a través de un ligador escindible a un 20 ligando específico de un marcador de enfermedad, el efector se acumula y actúa preferiblemente en el sitio previsto de acción, aumentando por tanto la dosis aplicada de manera eficaz mientras se reducen los efectos secundarios. Hasta la fecha, se han considerado anticuerpos monoclonales como ligandos de elección y, de hecho, la investigación en el campo de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) ha conducido a la aprobación reciente de dos ADC para aplicaciones en oncología: brentuximab vedotina y trastuzumab emtansina.

25

Sin embargo, los anticuerpos son macromoléculas grandes y, por tanto, tienen a menudo dificultadas para penetrar en profundidad en los tumores sólidos. Además, pueden ser inmunogénicos y normalmente tiempos de circulación largos pueden conducir a liberación de fármaco prematura y efectos secundarios no deseados. Además, la producción de ADC es costosa, lo que refleja la necesidad de una fabricación de anticuerpos, fármacos y los conjugados resultantes de calidad clínica.

30

El uso de ligandos más pequeños como vehículos de administración tales como péptidos o moléculas similares a fármacos pequeños podría superar posiblemente algunos de los problemas mencionados anteriormente. Su tamaño reducido debería ayudar a la penetración de tejido, no deberían ser inmunogénicos y ser susceptibles a la síntesis orgánica clásica, reduciendo así los costes de fabricación. Se han demostrado las propiedades favorables de los

- 35 conjugados de fármacos que utilizan ácido fólico o ligandos contra el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) como vehículos de administración y un conjugado de folato ha ingresado recientemente en estudios clínicos de fase III. Sin embargo, solo unos pocos conjugados de este tipo han sido identificados con éxito.
- 40 El documento WO2006137092 describe el uso de inhibidores de la anhidrasa carbónica IX marcados con fluoróforos para el tratamiento de cánceres al inhibir la actividad de CAIX y, por de ese modo, revertir la acidificación del entorno extracelular del tumor. No hay ninguna sugerencia de usar los inhibidores de CAIX para seleccionar como diana los agentes citotóxicos. Otros inhibidores de CAIX para el tratamiento del cáncer se describen en los documentos WO2011098610 y WO2004048544. 45
 - Nikolaus Krall et al. en Angewandte Chemie International Edition, vol. 52, n.º 5, páginas 1384-1402 (2013) revisan desarrollos recientes en el campo de agentes citotóxicos dirigidos basados en ligandos pequeños, en particular el uso de bibliotecas químicas codificadas por ADN para el examen de grandes colecciones de compuestos.
- 50 Los presentes inventores han encontrado un ligando que selecciona como diana tumores que expresan anhidrasa carbónica IX (CAIX).

Sumario de la invención

55 Según el primer aspecto de la invención, por tanto, se proporciona un ligando específico para CAIX que tiene la fórmula:



En una realización, el ligando de la invención está radiomarcado con tecnecio 99m.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra estructuras químicas de conjugados de ligando-ligador-colorante sintetizados para estudios de unión *in vitro* y de selección de diana *in vivo*;

10 la figura 2 muestra estructuras y síntesis de conjugados de fármaco de molécula pequeña de referencia;

la figura 3 muestra mediciones de fluorescencia de la captación de órgano de conjugado de ligando-ligador-colorante usando un ligando de referencia, en comparación con la captación en los mismos órganos de un conjugado no seleccionado como diana;

15

20

25

la figura 4 muestra mediciones de fluorescencia de la captación de órgano de conjugado de ligando-ligador-colorante usando un ligando de referencia a 1 hora, 2 horas y 4 horas tras la administración del conjugado;

la figura 5 muestra gráficos de pérdida de peso frente a tiempo para animales de prueba tratados con tres regímenes de dosificación diferentes de un conjugado de ligando-ligador-fármaco de referencia;

la figura 6 muestra gráficos de (a) volumen de tumor frente a tiempo para el crecimiento de xenoinjertos SKRC52 en ratones balb/c nu/nu tratados 5x en 5 días consecutivos con dos conjugados de referencia diferentes 7a y 8a y con dos conjugados de fármaco no seleccionados como diana correspondientes, y (b) cambio de peso corporal medido asociado con el tratamiento;

la figura 7 muestra gráficos de (a) volumen de tumor frente a tiempo para el crecimiento de xenoinjertos SKRC52 en ratones balb/c nu/nu tratados 5x en 5 días consecutivos con un conjugado de referencia adicional 9a y con conjugados de fármaco no seleccionados como diana correspondientes y con dos fármacos antitumorales convencionales, y (b) cambio de peso corporal medido asociado con los tratamientos;

la figura 8 muestra estabilidad hidrolítica de conjugados de fármaco 7a, 8a y 9a en PBS a pH 7,4 y 37°C tal como se determina mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas/espectrometría de masas (7a y 8a) y

cromatografía de líquidos de alta resolución (9a);

35

50

30

la figura 9 muestra estructuras de un ligando monovalente para CAIX y un conjugado de colorante del mismo;

la figura 10 muestra estructuras de un ligando bivalente para CAIX y un conjugado de colorante del mismo;

40 la figura 11 muestra las estructuras de un conjugado de fármaco bivalente seleccionado como diana de referencia B7 y un control no seleccionado como diana B8;

la figura 12 muestra curvas de crecimiento tumoral de animales inyectados con 8 x 35 nmol de ligando no conjugado
 B2, conjugado de fármaco bivalente B7, conjugado de control B8 o vehículo como control. Los datos representan
 promedios ± errores estándar;

la figura 13 muestra una representación esquemática de un miembro de la biblioteca química de autoensamblaje codificada por ADN (ESAC) que se une a su proteína diana CAIX. La biblioteca presenta dos farmacofóros A y B y se forma por hibridación de dos sub-bibliotecas de cadenas sencillas sintetizadas individualmente A y B, lo que da como resultado una biblioteca combinatoria de A x B = 111.100 miembros;

la figura 14 muestra un diagrama de los resultados de resultados de secuenciación de ADN masivo (HTDS) de reacciones contra CAIX para la biblioteca ESAC. El plano x/y representa los códigos de barras de los miembros de la biblioteca de la sub-biblioteca A y sub-biblioteca B, y el eje z muestra los recuentos de secuencia normalizados a 100, nivel de corte 1000. Las condiciones de selección fueron recubrimiento de proteína de alta densidad (1,0 µm de CAIX)

55 nivel de corte 1000. Las condiciones de selección fueron recubrimiento de proteína de alta densidad (1,0 μm de CAIX) y cinco etapas de lavado;

ES 2 735 348 T3

la figura 15 muestra la estructura química de conjugado IRDye 750 no seleccionado como diana C6 usado para análisis de citometría de flujo y experimentos de obtención de imágenes *in vivo*;

la figura 16 muestra estructuras químicas y constantes de disociación medidas "fuera de ADN" por FP y SPR de conjugados monovalentes y bivalentes sintetizados con diferentes longitudes de ligador;

la figura 17 muestra la estructura química de conjugados IRDye 750 monovalentes y bivalentes seleccionados como diana C1c y C5c usados para análisis de citometría de flujo y experimentos de obtención de imágenes *in vivo*;

- 10 la figura 18 muestra análisis de citometría de flujo de conjugados de IR-colorantes que se unen a células SKRC52 que expresan CAIX: (a) células no tratadas, (b) conjugado no seleccionado como diana C6, (c) conjugado monovalente seleccionado como diana C1c, (d) conjugado bivalente seleccionado como diana C5c;
- la figura 19 muestra datos de captación comparativos para diferentes órganos en un ratón que tiene carcinoma renal
 de un ligando seleccionado como diana anti-CAIX radiomarcado según la presente invención frente a un ligando no seleccionado como diana radiomarcado;

la figura 20 muestra un esquema de reacción para la síntesis de un conjugado de fármaco citotóxico seleccionado como diana de referencia que tiene el fármaco auristatina unido a un resto de unión de molécula pequeña a través de un ligador peptídico que contiene valina-citrulina que puede escindirse mediante catepsina B; y

la figura 21 muestra datos observados para tamaño tumoral de ratón frente a tiempo para tres regímenes de dosificación del conjugado de fármaco de la figura 20.

25 Descripción detallada de la invención

A menos que se define lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica, tal como en las técnicas de química de péptidos, cultivo celular, química de ácido nucleico y bioquímica. Se usan técnicas convencionales para métodos de biología molecular, genética y bioquímicos (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, Short Protocols in Biología molecular (1999) 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc.).

A menos que se declare lo contrario, las siguientes definiciones se aplican a términos químicos usados en conexión de compuestos de la invención y composiciones que contienen tales compuestos.

Alquilo se refiere a un radical hidrocarbilo saturado ramificado o no ramificado. De manera adecuada, el grupo alquilo comprende desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono, por ejemplo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 átomos de carbono.

40

20

30

Alquenilo se refiere a un radical hidrocarbilo ramificado o no ramificado que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. De manera adecuada, el grupo alquenilo comprende desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono, por ejemplo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 átomos de carbono.

45

55

60

Alquinilo se refiere a un radical hidrocarbilo ramificado o no ramificado que contiene uno o más triples enlaces carbonocarbono. De manera adecuada, el grupo alquinilo comprende desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 átomos de carbono, por ejemplo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 átomos de carbono.

50 Halógeno se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor o cloro.

Cicloalquilo se refiere a un resto alicíclico, que tiene de manera adecuada 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono. El grupo puede ser un sistema de anillo en puente o policíclico. Más a menudo, los grupos cicloalquilo son monocíclicos. Este término incluye referencia a grupos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo, biciclo[2.2.2]octilo y similares.

Arilo se refiere a un sistema de anillo aromático que comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de anillo de carbono. Arilo puede ser un sistema de anillo policíclico, que tiene dos o más anillos, al menos uno de los cuales es aromático. Este término incluye referencia a grupos tales como fenilo, naftilo, fluorenilo, azulenilo, indenilo, antrilo y similares.

El prefijo (hetero) en el presente documento significa que uno o más de los átomos de carbono del grupo pueden sustituirse por nitrógeno, oxígeno, fósforo, silicio o azufre. Los grupos heteroalquilo incluyen por ejemplo, grupos alquiloxilo y grupos alquito. Los grupos heterocicloalquilo o heteroarilo en el presente documento pueden tener desde 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de anillo, al menos uno de los cuales se selecciona de nitrógeno.

65 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 átomos de anillo, al menos uno de los cuales se selecciona de nitrógeno, oxígeno, fósforo, silicio y azufre. En particular, un sistema de anillo o anillo de 3 a 10 miembros y más particularmente

ES 2 735 348 T3

un anillo de 5 ó 6 miembros, que puede ser saturado o insaturado. Por ejemplo, seleccionado de oxiranilo, azirinilo, 1,2-oxatiolanilo, imidazolilo, tienilo, furilo, tetrahidrofurilo, piranilo, tiopiranilo, tiantrenilo, isobenzofuranilo, benzofuranilo, cromenilo, 2H-pirrolilo, pirrolinilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, bencimidazolilo, pirazolilo, pirazinilo, pirazolidinilo, tiazolilo, isotiazolilo, ditiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piperidilo, piperazinilo, piridazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, especialmente tiomorfolino, indolizinilo, 1,3-dioxo-1,3-

- 5 dihidro-isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, bencimidazolilo, cumarilo, indazolilo, triazolilo, tetrazolilo, purinilo, 4Hquinolizinilo, isoquinolilo, quinolilo, tetrahidroquinolilo, tetrahidroisoquinolilo, decahidroquinolilo, octahidroisoquinolilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, benzotiofenilo, dibenzotiofenilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalilo, quinazolinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, carbazolilo, [beta]-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, perimidinilo, fenantrolinilo, 10 furazanilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, cromenilo, isocromanilo, cromanilo, 3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-ona,
- 3,4-dihidro-2H-isoquinolinilo, y similares.

Cuando un sustituyente en el presente documento es un péptido, el péptido comprende de manera adecuada desde 1 hasta 100 residuos de aminoácido, por ejemplo, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 30 residuos de aminoácido.

15

Cuando un sustituyente en el presente documento es un oligosacárido, el oligosacárido comprende de manera adecuada desde 1 hasta 100 residuos de sacárido, por ejemplo desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 30 residuos de sacárido.

20

"Sustituido" significa que uno o más, especialmente hasta 5, más especialmente 1, 2 ó 3, de los átomos de hidrógeno en dicho resto se reemplazan independientemente entre sí por el número correspondiente de sustituyentes. El término "opcionalmente sustituido" tal como se usa en el presente documento incluye sustituido o no sustituido. Por supuesto, se entenderá que los sustituyentes están sólo en posiciones en las que son químicamente posibles, siendo el experto

25 en la técnica capaz de decidir (o bien experimentalmente o bien teóricamente) sin esfuerzo inapropiado si es posible una sustitución particular. Por ejemplo, grupos amino o hidroxilo con hidrógeno libre pueden ser inestables si se unen a átomos de carbono con enlaces insaturados (por ejemplo, olefínicos). Además, se entenderá por supuesto que los sustituyentes descritos en el presente documento pueden sustituirse por sí mismos por cualquier sustituyente, sujeto a la restricción mencionada anteriormente a sustituciones apropiadas tal como reconoce el experto.

30

35

40

45

Los sustituyentes pueden incluir de manera adecuada átomos de halógeno y grupos halometilo tales como CF₃ y CCl₃; grupos que contienen oxígeno tales como oxo, hidroxilo, carboxilo, carboxialquilo, alcoxilo, alcoílo, alcoiloxilo, ariloxilo, arilo/lo v arilo/loxilo: grupos que contienen nitrógeno tales como amino, alguilamino, dialguilamino, ciano, azida v nitro; grupos que contienen azufre tales como tiol, alguiltiol, sulfonilo y sulfóxido; grupos heterocíclicos que pueden sustituirse por sí mismos; grupos alquilo, que pueden sustituirse por sí mismos; y grupos arilo, que pueden sustituirse por sí mismos, tales como fenilo y fenilo sustituido. Alquilo incluye bencilo sustituido y no sustituido.

Cuando se describen dos o más restos como que se seleccionan "cada uno independientemente" de una lista de átomos o grupos, esto significa que los restos pueden ser iguales o diferentes. La identidad de cada resto es por tanto independiente de las identidades del uno o más de otros restos.

Derivado. Un derivado incluye la modificación química de un compuesto. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen sin limitación el reemplazo de un hidrógeno por un grupo halo, un grupo alguilo, un grupo acilo o un grupo amino y similares. Los derivados incluyen además ésteres y similares que pueden experimentar hidrólisis para liberar el compuesto. Los derivados incluyen además sales del compuesto. La modificación puede aumentar o disminuir una o más interacciones de unión a hidrógeno, interacciones de carga, interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals y/o interacciones de dipolo.

Análogo. Este término abarca cualquier enantiómero, racemato y estereoisómero, así como todas las sales 50 farmacéuticamente aceptables e hidratos de tales compuestos.

Diana

La presente invención selecciona como diana anhidrasa carbónica, en particular proteínas de anhidrasa carbónica IX 55 (CAIX) que se expresan en tumores. CAIX se sobreexpresa en muchas formas diferentes de cáncer tales como glioblastoma, cáncer colorrectal y de mama como un marcador de hipoxia, mientras que es casi indetectable en tejidos adultos normales, representando por tanto una diana antitumoral muy atractiva. En carcinoma de células renales se expresa a menudo de manera constitutiva y está entre los marcadores de superficie celular mejor caracterizados de esta enfermedad. 60

Ligando

Según el primer aspecto de la invención, por tanto, se proporciona un ligando específico para CAIX que tiene la fórmula:



Pueden encontrarse nuevos ligandos para unirse selectivamente a proteínas diana de interés, mediante métodos de examen usando tecnologías de química médica moderna, por ejemplo tecnologías de biblioteca química codificada
por ADN tal como se describe en el documento WO2009077173 y por R.E. Kleiner *et al.* en Chemical Society Reviews 40 5707-5717 (2011), L. Mannocci *et al.* en Chemical Communications 47, 12747-12753 (2011) y S. Brenner *et al.* en Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89 5381-5383 (1992). Un ejemplo de un método de examen usado para identificar el mejor resto de unión para CAIX de una biblioteca de 111.100 moléculas orgánicas pequeñas se describe en más detalle a continuación.

10

15

20

25

30

40

Se piensa que las anhidrasas carbónicas tienen un mecanismo catalítico que se basa en un sitio activo que contiene un ión de zinc coordinado. Se piensa que los inhibidores de la anhidrasa carbónica tales como acetazolamida y metazolamida que tienen grupos sulfonamido terminales actúan formando un aducto entre el ión de zinc y el nitrógeno terminal de la sulfonamida.

Sustituyentes

Los compuestos químicos descritos en el presente documento pueden comprender sustituyentes. En particular, los compuestos pueden contener uno o más sustituyentes hidroxilo, alquilo especialmente alquilo inferior (C₁-C₆), por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros de pentilo, y n-hexilo y otros isómeros de hexilo, alcoxilo especialmente alcoxilo inferior (C₁-C₆), por ejemplo metoxilo, etoxilo, etoxilo, etoxilo, etoxilo, propoxilo etc., alquinilo, por ejemplo etinilo, o halógeno (por ejemplo fluoro).

Síntesis química

Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse mediante técnicas de síntesis química.

Será evidente para los expertos en la técnica que puede ser necesario proteger y desproteger grupos funcionales sensibles durante la síntesis de un compuesto. Esto puede lograrse mediante técnicas convencionales, por ejemplo tal como se describe en "Protective Groups in Organic Synthesis" de T W Greene y P G M Wuts, John Wiley & Sons Inc. (1991), y de P.J.Kocienski, en "Protecting Groups", Georg Thieme Verlag (1994).

Es posible durante algunas de las reacciones que cualquier estereocentro presente, en determinadas condiciones, pudiera epimerizarse, por ejemplo si se usa una base en una reacción con un sustrato que tiene un centro óptico que comprende un grupo sensible a bases. Debe ser posible para eludir posibles problemas tales como este mediante elección de secuencia de reacción, condiciones, reactivos, regímenes de protección/desprotección, etc. tal como se conoce bien en la técnica.

Los compuestos y sales de la invención pueden separarse y purificarse mediante métodos convencionales.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, biología molecular, biología celular, genética, inmunología y farmacología, conocidos para los expertos en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gennaro, A. R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J. G., Limbird, L. E., y Gilman, A. G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. *et al.*, eds., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D. M., y Blackwell, C. C., eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, vol. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. *et al.*, eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory

- 50 Manual, 2^a edición, vol. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.*, eds. (1999) Short Protocols en Molecular Biology, 4^a edición, John Wiley & Sons; Ream *et al.*, eds. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C. R., y Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2^a ed., Springer Verlag.
- 55 La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los ejemplos y ejemplos de referencia, que se pretende que sirvan para ayudar a un experto habitual en la técnica a llevar a cabo la invención.

Ejemplos

(A) Restos de unión monovalente

- 5 Se prepararon compuestos de referencia que tienen las fórmulas 1a-6c mostradas en la figura 1 para estudios de unión mediante conjugados de ligando-ligador-colorante a CAIX *in vitro* e *in vivo*. Se prepararon conjugados de referencia que tienen las fórmulas 7a, 8a y 9a tal como se muestra en la figura 2 según el esquema en la figura 2 y se estudiaron *in vitro* e *in vivo* tal como se describe a continuación. También se prepararon conjugados de referencia 7b, 8b y 9b tal como se muestra en la figura 2 que tienen el fármaco y restos de ligador pero sin resto de unión según el esquema mostrado en la figura 2 para estudios comparativos.

Procedimientos químicos generales

- Se registraron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de protones (¹H) en un espectrómetro Bruker AV400 (400 MHz) o Bruker AVIII500 (500 MHz). Se registraron espectros de RMN de carbono (¹³C) en un espectrómetro Bruker AV400 (100 MHz) o en un espectrómetro Bruker AVIII500 (125 MHz). Se proporcionan desplazamientos químicos en ppm usando disolvente residual como patrón interno. Se notifican constantes de acoplamiento (*J*) en Hz con las siguientes abreviaturas usadas para indicar división: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete. Se registraron espectros de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) en un espectrómetro de
- 20 masas Bruker Daltronics maXis ESI-QTOF. Se notifican valores de m/z calculados y exactos en Daltons. Se realizaron cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa preparativa y analítica (RP-HPLC) en un instrumento Waters Alliance HT RP-HPLC con detector PDA UV, usando una columna Synergi 4 μm, Polar-RP 150 x 10 mm a una velocidad de flujo de 4 ml min⁻¹ con gradientes lineales de disolventes A y B (A = agua Millipore con ácido trifluoroacético al 0,1% [TFA], B = MeCN).
- 25

Se adquirieron disolventes anhidros para reacciones de Acros o Fluka. Se adquirió dimetilformamida de calidad peptídica (DMF) para la síntesis en fase sólida de ABCR. Todos los demás disolventes se usaron tal como se proporcionan por Fisher Chemicals, Merck o Aldrich en calidad analítica o HPLC. Se adquirió éster de *N*-hidroxisuccinimidilo IRDye750 (NHS) de Licor, éster de NHS Alexa546 de Invitrogen, (*S*)-1-clorometil-6-hidroxi-1,2-

30 dihidrobeno[e]indol protegido con N-Boc (seco CBI) de Anthem Bioscience. Se adquirió DM1 de Concortis Biosystems. Todos los demás reactivos se adquirieron de Aldrich, Acros, ABCR o TCI y se usaron tal como se proporcionan. Todas las reacciones que usan condiciones anhidras se realizaron usando cristalería secada en horno bajo una atmósfera de argón. Salmuera se refiere a una disolución saturada de cloruro de sodio. Se adquirió sílice para cromatografía en columna ultrarrápida de Sigma.

35

Preparación de compuestos previamente descritos

Se prepararon los compuestos 6c y 11 - 17 según métodos descritos previamente tal como se resumen en la siguiente tabla.





DM1-SMe



Síntesis química de nuevos compuestos

Conjugado de *N*1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-*N*4-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)succinamida y fluoresceína - 1a (compuesto de referencia)



- Se disolvieron 25 (7,0 mg, 17 μmol) e isotiocianato de fluoresceína (FITC, 6,7 mg, 17 μmol) en dimetilformamida (DMF,
 1 ml) y se le añadió diisopropiletilamina (DIPEA, 8 μl, 48 mmol). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (1 ml) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante espectrometría de masas (EM) y se liofilizaron para dar el producto como un polvo amarillo (12 mg, 16 μmol, 95%).
- 15 ¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 8,31 (s, 1H), 7,91 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,92 (s, 2H), 6,79 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 3,85 (a, 2H), 3,75 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,72-3,65 (m, 4H), 3,58 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 3,38 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 2,85 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,66 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 180,8, 172,3 172,2, 171,3, 171,2, 169,0, 164,6, 161,4, 159,9, 152,4, 147,6, 141,8, 129,5, 127,0, 124,5, 116,7, 113,0, 110,3, 102,7, 70,1, 69,6, 68,9, 44,1, 39,0, 30,7, 29,8, se prevé que las señales del ligador PEG se solapen; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₃H₃₄N₇O₁₁S₃, 800,1473; encontrado 800,1470.
 - Conjugado de *N*1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-*N*4-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)succinamida y Alexa546 1b (compuesto de referencia)



A 25 (212 μg, 517 nmol) en DMF (2,1 μl) se le añadió éster de NHS Alexa546 (100 μg, 86 nmol). Se añadieron DIPEA
(2 μl, 12 μmol) y DMF (50 μl) y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluyó la reacción con MeOH (50 μl) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto tal como se identifica a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{máx} = 550 nm), se liofilizaron y de disolvieron en 100 μl de PBS pH 7,4 para dar una disolución morado oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 556 nm (ε₅₅₆ = 112,000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:100 en PBS pH 7,4 (443 μM, 44 nmol, 51%).

HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₅₂H₆₅Cl₃N₉O₁₇S₅, 1352,2162; encontrado 1352,2157.

Conjugado de *N*1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-*N*4-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)succinamida e IRDye750 - 1c (compuesto de referencia)



20

A 25 (131 µg, 320 nmol) en DMSO (13 µl) se le añadió éster de NHS IRDye750 (194 µg, 163 nnmol) en DMSO (25 µl) seguido por DMF (100 µl) y DIPEA (10 µl, 60 µmol). Se agitó la disolución durante 6 h a temperatura ambiente y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{max} = 750 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, 100 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Su concentración y el rendimiento de reacción se determinaron midiendo la absorbancia a 750 nm (ϵ_{750} = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS pH 7,4 (1,02 mM, 102 nmol, 63%).

HRMS: (m/z) [M + Na]²⁻ calculado para C₆₁H₇₇N₈NaO₁₉S₆, 720,1769; encontrado 720,1760.

Conjugado de (S)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-3-metil-2-(4-(4-sulfamoilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanamida y fluoresceína - 2a (compuesto de referencia)



- Se disolvió 26 (20 mg, 36 μmol) en una mezcla de diclorometano (DCM, 0,5 ml) y TFA (0,5 ml) y se agitó durante 1 h
 a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y se disolvió el residuo en DMF (0,5 ml).
 DIPEA (31 μl, 187 μmol) se añadió seguido por FITC (14 mg, 36 μmol). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (0,5 ml) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto mediante EM y se liofilizaron para dar el producto como un polvo amarillo brillante (18 mg, 23 μmol, 64%).
- 15

- 20 167,9, 160,2, 159,1, 158,8, 152,5, 147,3, 145,7, 143,6, 141,8, 134,3, 129,5, 126,8, 125,8, 124,6, 121,9, 117,0, 114,5, 113,2, 110,3, 102,7, 70,1, 70, 69,6, 69,2, 68,9, 44,2, 31,6, 19,2, 19,1; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para $C_{40}H_{42}N_7O_{10}S_2$, 844,2429; encontrado 844,2430.
- Conjugado de (*S*)-*N*-(2-(2-(2-aminoetoxi)etixi)-3-metil-2-(4-(4-sulfamoilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanamida e IRDye750 - 2c (compuesto de referencia)



Se añadió 26 (178 μg, 321 nmol) en DMSO (34 μl) a una mezcla de TFA (100 μl) y DCM (100 μl). Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se eliminó el disolvente a presión reducida. A la disolución residual se le añadió éster de NHS IRDye750 (194 μg, 163 nnmol) en DMSO (25 μl) seguido por DMF (100 μl) y DIPEA (10 μl, 60 μmol). Se agitó la disolución durante 6 h a temperatura ambiente y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones

que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{max} = 750 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (100 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinó su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 750 nm (ϵ_{750} = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS pH 7,4 (662 µM, 66 nmol, 40%).

5

HRMS: (m/z) [M + Na]²⁻ calculado para C₆₈H₈₅N₈NaO₁₈S₅, 742,2247; encontrado 742,2233.

Conjugado de 4-((4-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)amino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)bencenosulfonamida y fluoresceína - 3a (compuesto de referencia)

10



- Se disolvió 28 (7,5 mg, 14 μmol) en una mezcla de DCM (1 ml) y TFA (1 ml) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en DMF (1 ml). Se añadió FITC (5,4 mg, 14 μmol) seguido por DIPEA (23 μl, 139 μmol) y se agitó la reacción durante 3 h a temperatura ambiente. Se añadió MeOH (1 ml) y se purificó la mezcla de reacción en bruto sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo amarillo brillante (8,1 mg, 11 μmol, 76%).
- 20 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, dos rotámeros) δ [ppm] = 10,31 (s a, 1H), 10,23 (s a, 1H), 9,96 (s a, 2H), 8,21 (s a, 2H), 8,02 (s a, 1H), 7,86-7,77 (m, 2H), 7,69-7,64 (m, 3H), 7,16 (m, 2H), 7,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,61-6,48 (m, 6H), 3,61-3,38 (m, 12H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆, dos rotámeros, se prevé que las señales del ligador PEG se solapen) δ [ppm] = 181,1, 169,0, 168,5, 166,0, 160,2, 159,3, 159,0, 157,3, 152,4, 142,5, 141,9, 141,0, 139,6, 138,3, 129,5, 127,2, 127,0, 126,9, 124,5, 122,61, 120,0, 113,1, 110,5, 102,7, 70,1, 70,0, 69,1, 68,5, 68,9, 49,1, 44,1; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₆H₃₄ClN₈O₉S₂, 821,1573; encontrado 821,8567.

Conjugado de 4-((4-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)amino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino)bencenosulfonamida e IRDye750 - 3c (compuesto de referencia)



Se añadió 28 (174 μg, 328 nmol) en DMSO (19 μl) a una mezcla de TFA (100 μl) y DCM (100 μl). Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se eliminaron los disolventes volátiles a presión reducida. A la disolución residual, se le añadió éster de NHS IRDye750 (194 μg, 163 nnmol) en DMSO (25 μl) seguido por DMF (100 μl) y DIPEA (10 μl, 60 μmol). Se agitó la disolución durante 6 h a temperatura ambiente y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min).

Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico $(\lambda_{max} = 750 \text{ nm})$, se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (100 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinó su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 750 nm (2750 = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:100 en PBS pH 7,4 (510 μM, 51 nmol, 31%).

5

10

HRMS: (m/z) [M]³⁻ calculado para C₆₄H₇₇ClN₉O₁₇S₅, 479,4582; encontrado 479,4569.

Conjugado de (E)-N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoi)-3-((4-((4-sulfamoilfenil)diazenil)fenil)amino)propanamida е IRDye750 - 4c (compuesto de referencia)



Se añadió 29 (188 µg, 320 nmol) en DMSO (20 µl) a una mezcla de TFA (100 µl) y DCM (100 µl). Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se eliminaron los disolventes volátiles a presión reducida. Al residuo, se le 15 añadió éster de NHS IRDye750 (194 μg, 163 nnmol) en DMSO (25 μl) seguido por DMF (100 μl) y DIPEA (10 μl, 60 μmol). Se agitó la disolución durante 6 h a temperatura ambiente y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron

fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{max} = 750 nm). se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (100 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 750 nm (ε₇₅₀ = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹ 20 ¹) de muestras de reserva diluidas 1:100 en PBS pH 7,4 (390 μM, 39 nmol, 24%).

HRMS: (m/z) [M + Na]²⁻ calculado para C₇₀H₈₅N₈NaO₁₈S₅, 754,2247; encontrado 754,2248.

25 Conjugado de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-sulfamoilbenzamida y fluoresceína - 5a (compuesto de referencia)



Se disolvió 31 (5,0 mg, 12 µmol) en una mezcla de DCM (0,5 ml) y TFA (0,5 ml) y se agitó durante 1 h a temperatura 30 ambiente. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y se disolvió el residuo en DMF (0,5 ml). Se añadió DIPEA (31 µl, 187 µmol) seguido por FITC (4.5 mg, 12 µmol). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (0,5 ml) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto mediante EM y se liofilizaron para dar el producto como un polvo amarillo brillante (6,3 mg, 10 µmol, 83%).

35

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, sólo SO₂NH₂ pero no NH y OH visible) δ [ppm] = 8,74 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,00 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,90 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,65-6,54 (m, 6H), 3,68 (s a, 2H), 3,61-3,56 (m, 8H), 3,47-3,42 (m, 2H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆, se prevé que las señales del ligador PEG se solapen) & [ppm] = 181,05, 169,0, 165,8, 160,0, 159,1, 158,8, 152,3, 152,4, 147,5, 146,7, 141,8, 137,8, 129,5, 128,3, 127,0, 126,1, 124,6, 116,9, 113,1, 110,2, 102,7, 70,1, 70,0, 69,3, 68,9, 44,2; HRMS: (m/z)

 $[M + H]^+$ calculado para $C_{34}H_{33}N_4O_{10}S_2$, 721,1633; encontrado 720,1620.

Conjugado de N-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4-sulfamoilbenzamida e IRDye750 - 5c (compuesto de referencia)



5

10

15

Se añadió 31 (138 µg, 320 nmol) en DMSO (29 µl) a una mezcla de TFA (100 µl) y DCM (100 µl). Se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se eliminaron los disolventes volátiles a presión reducida. A la disolución residual, se le añadió éster de NHS IRDye750 (194 µg, 163 nnmol) en DMSO (25 µl) seguido por DMF (100 µl) y DIPEA (10 µl, 60 µmol). Se agitó la disolución durante 6 h a temperatura ambiente y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico ($\lambda_{máx}$ = 750 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (100 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 750 nm (ε_{750} = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS pH 7,4 (1,23 mM, 123 nmol, 75%).

HRMS: (m/z) [M + 2H]²⁺ calculado para C₆₂H₇₈N₅O₁₈S₅, 1340,3951; encontrado 1340,3932.

Conjugado de (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo y fluoresceína - 6a (compuesto de referencia)

20



Se disolvieron 19 (10 mg, 40 μmol) y FITC (16 mg, 41 μmol) en DMF (1 ml) y se añadió DIPEA (10 μl, 48 μmol). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (1 ml) y se purificó sobre HPLC de fase
inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el producto como un polvo amarillo (18 mg, 29 μmol, 72%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,45 (a, 1H), 7,76 (a, 1H), 7,18 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,71-6-69 (m, 2H), 6,37-6,56 (m, 4H), 3,63-3,53 (m, 8H), 3,39 (t, *J* = 6,0, 2H), 3,07 (a, 2H), 1,35 (s, 9H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSOd6) δ [ppm] = 180,9, 169,0, 159,9, 156,0, 152,4, 147,4, 141,8, 129,5, 129,7, 127,0, 124,5, 116,7, 113,0, 110,3, 110,2, 102,7, 78,1, 70,1, 70,0, 69,7, 68,9, 67,02, 44,0, 28,6; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₂H₃₆N₃O₉S, 638,2167; encontrado 638,2160.

35 Conjugado de (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo y Alexa546 - 6b (compuesto de referencia)



A 19 (233 µg, 943 nmol) en DMSO (6 µl) se le añadió éster de NHS Alexa546 (100 µg, 86 nmol). Se añadieron DIPEA (2 µl, 12 µmol) y DMF (50 µl) y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluyó la reacción con MeOH (50 µl) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto tal como se identifica a través de su espectro de UV/VIS característico ($\lambda_{máx}$ = 550 nm), se liofilizaron y se disolvieron en 100 µl de PBS pH 7,4 para dar una disolución morado oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 556 nm (ϵ_{556} = 112,000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:100 en PBS pH 7,4 (555 µM, 56 nmol, 65%).



5

HRMS: $(m/z) [M + 2H]^+$ calculado para $C_{51}H_{67}CI_3N_5O_{15}S_3$, 1190,2856; encontrado 1190,2859.

Carbonato de CBI seleccionado como diana AAZ - 7a (compuesto de referencia)



15

20

Se disolvieron ligador cargado seleccionado como diana AAZ 11a (7,8 mg, 8,6 µmol) y 12 (5,1 mg, 7,2 µmol) en MeOH desgasificado (0,5 ml) y se agitaron durante 6 h a temperatura ambiente. Se purificó la mezcla de reacción directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min), se agruparon fracciones que contenían el producto mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanco (5,5 mg, 3,7 µmol, 47%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 11,57 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,31 (s a, 3H), 8,20 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 8,03 (s a, 2H), 7,89 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,63 (t, J = 8,0, 1H), 7,53 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,21 (s a, 4H), 7,13 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 4,87 (t, J = 10,0 Hz, 1H), 4,63-4,52 (m, 5H), 4,45-4,40 (m, 1H), 4,29-4,26 (m, 6H), 4,10 (dd, J = 11,2, 3,1 Hz, 1H), 4,00 (dd, J = 11,2, 6,9 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,51-3,49 (m, 2H), 3,25-3,21 (m, 1H), 3,14-3,11 (m, 2H), 3,07-3,02 (m, 3H), 2,90 (s, 6H), 2,73-2,57 (m, 6H), 2,55-2,45 (m, 2H), 2,13 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,96-1,90 (m, 2H), 1,81-1,73 (m, 3H), 1,55-1,40 (m, 5H); HRMS: (m/z) [M + 2H]²⁺ calculado para C₆₀H₇₈CIN₁₇O₁₉S₄, 751,7110; encontrado 751,7109.

³⁰

Carbonato de CBI no seleccionado como diana - 7b (compuesto de referencia)



Se disolvieron carbonato activado 12 (5,0 mg, 7,1 µmol) y ligador cargado no seleccionado como diana 11b (10 mg, 14 µmol) en MeOH desgasificado (0,5 ml) y se agitaron durante 6 h a temperatura ambiente. Se purificó la mezcla de reacción directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min), fracciones que contenían el producto mediante EM se agruparon y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanco (4,1 mg, 3,1 µmol, 43%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 11,57 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,17 (s a, 2H), 8,06 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,96 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,53 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,53 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,53 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,89 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,89 (t, J = 8,5 Hz, 1 10 Hz, 1H), 7,40-6,77 (a, 4H), 7,31 (s, 1H), 7,13 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,03 (s, 1H), 4,86 (t, J = 10,1 Hz, 1H), 4,63-4,41 (m, 7H), 4,30-4,21 (m, 5H), 4,10 (dd, J = 11,1, 2,8 Hz, 1H), 4,00 (dd, J = 11,2, 7,0 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,54-3,52 (m, 2H), 3,22-2,98 (m, 6H), 2,92 (s, 6H), 2,75-2,66 (m, 2H), 2,59 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,54-2,47 (m, 2H), 2,24 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,13 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,82-1,70 (m, 5H), 1,53-1,41 (m, 5H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₅₈H₇₅ClN₁₃O₁₈S₂, 1340,4477; encontrado 1340,4466.

15

Carbamato de CBI seleccionado como diana AAZ - 8a (compuesto de referencia)



20

5

Se disolvieron ligador cargado seleccionado como diana AAZ 11a (7,6 mg, 8,3 µmol) y carbamato activado 13 (2,7 mg, 3.8 µmol) en MeOH desgasificado (0,5 ml) y se agitaron durante 6 h a temperatura ambiente. Se purificó la mezcla de reacción directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min), se agruparon fracciones que contenían el producto mediante EM y se liofilizaron para dar el 25 compuesto del título como un polvo blanco (2,0 mg, 1,3 µmol, 35%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆, mezcla de 2 rotámeros) δ [ppm] = 13,00 (s a, 1H), 12,39 (s a, 1H), 11,54 (s, 1H), 9,72 (s a, 1H), 8,32 (s, 2H), 8,24-8,18 (m, 3H), 8,14-8,10 (m, 1H), 8,03-7,97 (m, 2H), 7,92-7,86 (m, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,62-7,58 (m, 1H), 7,51-7,44 (m, 2H), 7,32-7,01 (m, 7H), 4,85 (t, J = 10,6 Hz, 1H), 4,61-4,47 (m, 4H), 4,43-4,38 (m, 1H), 4,30-4,19 (m, 5H), 4,11-4,08 (m, 1H), 3,99-3,89 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,63-3,53 (m, 4H), 3,25-2,96 (m, 8H), 2,93 (s, 6H), 2,75-2,57 (m, 6H), 2,53-2,47 (m, 2H), 2,13 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 1,96-1,90 (m, 2H), 1,78-1,68 (m, 3H), 1,54-1,40 (m, 5H); HRMS: (m/z) [M + 2H]²⁺ calculado para C₆₁H₈₁ClN₁₈O₁₈S₄, 758,2268; encontrado 758,2267.

Carbamato de CBI no seleccionado como diana - 8b (compuesto de referencia)

35



Se disolvieron carbamato activado 13 (5,0 mg, 6,9 µmol) y ligador cargado no seleccionado como diana 11b (10 mg, 14 µmol) en MeOH desgasificado (0,5 ml) y se agitaron durante 6 h a temperatura ambiente. Se purificó la mezcla de reacción directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min), fracciones que contenían el producto mediante EM se agruparon y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanco (5,1 mg, 3,7 µmol, 54%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆, mezcla de 2 rotámeros) δ [ppm] = 12,4 (s a, 3H) 11,54 (s, 1H), 8,24-8,14 (m, 4H), 8,03-7,87 (m, 3H), 7,82 (s, 1H), 7,63-7,47 (m, 3H), 7,32-6,82 (m, 7H), 4,85 (t, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,62-4,53 (m, 3H), 4,50-4,44 (a m, 1H), 4,43-4,37 (a m, 1H), 4,30-4,20 (m, 5H), 4,11-4,07 (m, 1H), 3,99-3,87 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,64-3,50 (m, 4H), 3,25-2,95 (m, 8H), 2,93 (s, 6H), 2,75-2,58 (m, 4H), 2,53-2,46 (m, 2H), 2,25 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,12 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,84-1,68 (m, 5H), 1,56-1,38 (m, 5H); HRMS: (m/z) [M + 2H]²⁺ calculado para C₅₉H₇₉ClN₁₄O₁₇S₂, 677,2433; encontrado 677,2430.



5

Conjugado de DM1 seleccionado como diana - 9a (compuesto de referencia)



- Se disolvió CysAspArgAsp-ligador-AAZ 11a (40 mg, 40 μmol) en MeOH desgasificado (5 ml) y se añadió 2,2'dipiridildisulfuro (13,2 mg, 60 μmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h y se añadió gota a gota a dietil éter helado (40 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se volvió a disolver en MeOH y se precipitó de nuevo con dietil éter helado (40 ml) y se secó a vacío para dar el disulfuro activado como un residuo blanco (20 mg, 20 μmol, 49%). Se disolvió una alícuota del disulfuro activado (8 mg, 7,8 μmol) en DMF (500 μl) y se añadió tiol libre de DM1 (5,5 mg, 7,4 μmol). Se dejó la reacción en reposo a temperatura ambiente durante 48 h tras
- 25 anadio tiol libre de DIVI1 (5,5 mg, 7,4 µmol). Se dejo la reaccion en reposo a temperatura ambiente durante 48 n tras lo cual se recuperó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (9,0 mg, 5,5 µmol, 74%).
- 30 HRMS: $(m/z) [M + 2H]^{2+}$ calculado para C₆₅H₉₄ClN₁₇O₂₃S₄ 821,7634; encontrado 821,7633.

Conjugado de DM1 no seleccionado como diana - 9b (compuesto de referencia)



- Se disolvió CysAspArgAsp-ligador-COOH 11b (21 mg, 28 μmol) en MeOH desgasificado (5 ml) y se redujo con TCEP·HCI (16 mg, 56 μmol) durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió 2,2'-dipiridildisulfuro (25 mg, 114 μmol) y
 se agitó la mezcla durante 12 h a temperatura ambiente. Se precipitó la reacción en dietil éter helado (40 ml), se recogió el producto mediante centrifugación, se volvió a disolver en MeOH (5 ml) y se precipitó de nuevo con dietil éter helado (40 ml). Se secó el precipitado a vacío para dar el disulfuro activado como un residuo blanco (20 mg, 23 μmol, 83%). Se disolvió una alícuota del disulfuro activado (10 mg, 12 μmol) en DMF (500 μl) y se añadió tiol libre de DM1 (8,6 mg, 12 μmol). Se dejó la reacción en reposo a temperatura ambiente durante 48 h tras lo cual se recuperó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo
- 10 producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (7,0 mg, 4,7 μmol, 40%).

HRMS: $(m/z) [M + 2H]^{2+}$ calculado para $C_{63}H_{92}CIN_{13}O_{22}S_2$, 740,7799; encontrado 740,7792.

N-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)hex-5-inamida - 10 (compuesto de referencia)



Se enfrió una disolución de ácido 5-hexinoico (1,4 ml, 12,9 mmol) y DMF (50 μl) en DCM (50 ml) en hielo y se añadió cloruro de oxalilo (1 ml, 11,7 mmol) gota a gota a lo largo de 15 min. Se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente, se agitó hasta que cesó la evanescencia y luego se concentró a presión reducida. Se añadió el líquido amarillo gota a gota a una disolución de 23 (2,3 g, 12,9 mmol) y piridina (943 μl, 25,8 mmol) en DMF (15 ml) y se agitó la reacción durante 3 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna (EtOAc) para dar el producto como un sólido blanquecino (2,8 g, 79%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 2,81 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 2,65 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,24 (td, *J* = 7,1, 2,6 Hz, 2H), 1,84-1,77 (m, 2H); ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 171,5, 164,2, 160,9, 83,6, 71,8, 33,6, 23,1, 17,2; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₈H₁₁N₄O₃S₆, 275,0267; encontrado 275,0268.

CysAspArgAsp-ligador-acetazolamida - 11a (compuesto de referencia)



35

40

30

15

Se hinchó Fmoc-Cys(Trt) precargado comercialmente disponible en resina Tentagel (500 mg, 0,415 mmol, RAPP Polymere) en DMF (3 x 5 min x 5 ml), se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml). Se extendió el péptido con Fmoc- Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH y Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH en el orden indicado y luego se tapó con 5-azido-valerato. Con este fin, se disolvieron el ácido azido o aminoácido protegido con Fmoc (3,0 eq), HBTU (3,0 eq), HOBt (3,0 eq) y DIPEA (6,0 eq) en DMF (5 ml), se dejó reposar la mezcla durante 1 min a temperatura ambiente y luego se hizo reaccionar con la resina durante 1 h con agitación suave. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina

al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 min y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la siguiente etapa de acoplamiento. Tras el acoplamiento de 5-azido-valerato, se preparó una disolución de Cul (0,3 eq), TBTA (0,3 eq) y alquino 10 (6 eq) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50

5 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (4,5 ml), TIS (250 μl) y H₂O (250 μl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (135 mg, 0,14 mmol, 33%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13,00 (s, 1H), 8,31 (s, 2H), 8,23-8,20 (m, 2H), 7,98 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,93 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,82 (a m, 1H), 7,53 (a m, 1H), 7,27-7,06 (a m, 4H), 4,59-4,51 (m, 2H), 4,40-4,36 (m, 1H), 4,27 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 4,21-4,20 (m, 1H), 3,06-3,04 (a m, 2H), 2,87-2,47 (m, 9H), 2,38 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H), 2,14 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,95-1,90 (m, 2H), 1,77-1,69 (m, 3H), 1,54-1,39 (m, 5H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 172,7, 172,5, 172,3, 172,1, 171,7, 171,6, 171,5, 170,9, 164,7, 161,5, 157,2, 146,5, 122,3, 54,9, 52,7, 50,1, 49,9, 49,3, 40,9, 36,3, 36,2, 34,7, 29,6, 29,4, 35,9, 25,2, 24,8, 24,6, 22,5; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₀H₄₇N₁₄O₁₃S₃, 995,1966; encontrado 995,1964.

20 CysAspArgAsp-ligador-COOH - 11b (compuesto de referencia)



- Se hinchó Fmoc-Cys(Trt) precargado comercialmente disponible en resina Tentagel (500 mg, 0,415 mmol, RAPP polymere) en DMF (3 x 5 min x 5 ml), se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml). Se extendió el péptido con Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH y Fmpc-Asp(OtBu)-OH en el orden indicado y luego se tapó con 5-azido-valerato. Con este fin, se disolvieron el ácido azido o aminoácido protegido con Fmoc (3,0 eq), HBTU (3,0 eq), HOBt (3,0 eq) y DIPEA (6,0 eq) en DMF (5 ml), se dejó reposar la mezcla durante 1 min a temperatura ambiente y luego se hizo reaccionar con la
- 30 resina durante 1 h con agitación suave. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 min y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la siguiente etapa de acoplamiento. Tras el acoplamiento de 5-azido-valerato, se preparó una disolución de Cul (0,3 eq), TBTA (0,3 eq) y ácido 5-hexinoico (6 eq) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de
- 35 EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (4,4 ml), fenol (250 μl), agua (250 μl) y TIPS (100 μl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo
- 40 de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (116 mg, 0,16 mmol, 43%).

¹H-RMN (500 MHz, MeOH-d₄) δ [ppm] = 7,81 (s, 1H), 4,58-4,51 (m, 2H), 4,30-4,23 (m, 4H), 3,09 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,91-2,60 (m, 8H), 2,25 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,18 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,90-1,77 (m, 5H), 1,65-1,48 (m, 5H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 174,6, 173,6, 172,7, 172,2, 172,0, 171,6, 171,4, 170,7, 157,1, 146,7, 122,3, 54,8, 52,7, 49,9, 49,8, 49,3, 40,8, 36,2, 34,7, 33,4, 33,1, 29,6, 25,8, 25,1, 24,8, 24,7, 22,5; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₂₈H₄₆N₁₀O₁₂S, 745,2934; encontrado 745,2931.

Carbonato-disulfuro de piridilo de fármaco de CBI sec - 12 (compuesto de referencia)



Se disolvieron fármaco de CBI sec 14 (10 mg, 20 μmol, 1 eq), carbonato activado 16 (7,2 mg, 20 μmol, 1 eq) y *N*,*N*-dimetilaminopiridina (DMAP, 2,4 mg, 50 μmol, 2,5 eq) en DMF (2 ml) y se agitaron durante 5 h a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (2 ml) y se purificó sobre HPLC (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (10,1 mg, 14,3 μmol, 72%).

¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 8,45 (s a, 1H) 8,34 (s, 1H), 7,94-7,81 (m, 4H), 7,66 (dt, *J* = 6,9, 1,1 Hz, 1H), 7,59 (dt, *J* = 6,9, 1,0 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,26 (m, 1H), 7,06 (s, 1H), 6,99 (s, 1H), 4,70-4,61 (m, 2H), 4,58 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 4,33 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 4,24-4,20 (m, 1H), 4,00 (dd, *J* = 11,4, 3,3 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,71 (dd, *J* = 11,3, 8,2 Hz, 1H), 3,60 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 3,25 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,06 (s, 6H); ¹³C-RMN (125 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 160,3, 159,3, 153,8, 150,0, 149,2, 146,9, 143,4, 141,2, 137,9, 132,9, 129,7, 128,7, 127,5, 125,1, 123,8, 122,9, 122,7, 121,6, 121,4, 120,6, 120,0, 110,6, 107,8, 106,7, 93,8, 66,3, 64,5, 56,6, 54,8, 46,3, 42,5, 42,0, 37,0; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₅H₃₆ClN₄O₆S₂, 707,1759; encontrado 707,1761.

Carbamato- disulfuro de piridilo de fármaco de CBI sec - 13 (compuesto de referencia)



20

25

30

5

Se disolvieron fármaco de CBI sec 14 (10 mg, 20 µmol, 1,0 eq), carbamato activado 17 (12 mg, 92 µmol, 4,6 eq) y DMAP (10 mg, 100 µmol, 5,0 eq) en DMF (2 ml) y se agitaron durante 12 h a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (2 ml) y se purificó sobre HPLC (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (9,5 mg, 13 µmol, 65%).

¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄, mezcla de dos rotámeros) δ [ppm] = 8,42-8,23 (a m, 2H), 7,96-7,73 (m, 4H), 7,60-7,37 (m, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,35-7,24 (m, 1H), 7,16-7,14 (m, 1H), 7,04-7,03 (2s, 1H), 4,74-4,65 (m, 2H), 4,31 (t, *J* = 4,7 Hz, 2H), 4,30-4,21 (m, 1H), 4,07-4,00 (m, 2H), 3,84-3,82 (2s, 3H), 3,87-3,62 (m, 2H), 3,60 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 3,36-3,11 (m, 5H), 3,05 (s, 6H); ¹³C-RMN (125 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 161,8, 161,7, 161,1, 160,8, 157,0 156,6, 151,5, 150,6, 149,1, 144,9, 142,9, 142,8, 139,1, 134,6, 131,3, 128,8, 126,3, 124,1, 123,8, 123,7, 123,6, 122,6, 122,2, 121,5, 121,5, 112,9, 112,6, 109,5, 108,0, 107,9, 95,5, 98,4, 66,2, 58,1, 56,4, 56,3, 47,8, 44,0, 43,6, 37,5, 37,4, 35,8, 35,7; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₃₆H₃₉ClN₅O₅S₂, 720,2076; encontrado 720,2074.





Se disolvió CBI sec protegido en *N*-Boc (50 mg, 150 µmol, 1,0 eq) en HCI 4 M en EtOAc seco (5 ml) y se agitaron durante 6 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en 3 ml de DMF y se enfrió en hielo. Se añadió EDC·HCI (86 mg, 450 µmol, 3,0 eq) seguido por indol 18 (61 mg, 220 µmol, 1,3 eq), se calentó la mezcla hasta temperatura ambiente y se dejó agitar durante 12 h. Se añadió MeOH (3 ml) y se purificó la mezcla de reacción en bruto sobre HPLC (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo amarillento (44.1 mg, 89.5 µmol, 60%).

10

15

5

¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 8,10 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,61 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,37 (td, *J* = 6,8, 1,2 Hz, 1H), 7,23 (td, *J* = 6,8, 1,0 Hz, 1H), 7,15 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 4,49-4,38 (m, 2H), 4,13 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,96-3,92 (m, 1H), 3,80 (dd, *J* = 11,2, 3,2 Hz, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,44-3,39 (m, 3H), 2,91 (s, 6H); ¹³C-RMN (100 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 173,0, 162,4, 155,8, 151,6, 144,9, 143,4, 134,6, 131,6, 130,9, 128,6, 124,6, 124,5, 123,5, 122,2, 117,0, 109,5, 107,9, 101,5, 95,5, 66,0, 58,1, 56,8, 56,3, 47,5, 43,9, 43,6; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₂₇H₂₉ClN₃O₄, 494,1841; encontrado 494,1843.

N1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-N4-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)succinamida - 25 (compuesto de referencia)



20

25

Se hinchó O-Bis-(aminoetil)etilenglicol precargado comercialmente disponible en resina de tritilo (500 mg, 0,3 mmol, Merck Millipore) en DMF (3 x 5 min x 5 ml). Se disolvieron ácido 4-oxo-4-((5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2il)amino)butanoico (AAZSucc, 166 mg, 0,59 mmol) y HATU (228 mg, 0,60 mmol) en DMF (5 ml) y se añadió DIPEA (200 μl, 1,2 mmol). Se hizo reaccionar la disolución inmediatamente con la resina durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml), DCM (3 x 1 min x 5 ml) y se escindió con el 95% de TFA / el 2,5% de H₂O / el 2,5% de triisopropilsilano (TIS, 5 ml de volumen total) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó con TFA (1 x 1 min x 5 ml). Se vertieron disoluciones de lavado y escisión combinadas en Et₂O frío (40 ml), se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante

30 al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado EM y se liofilizaron para dar el producto como un polvo blanco (48 mg, 0,12 mmol, 39%).

¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 3,60 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,55 (m, 4H), 3,45 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,27 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,02 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 2,75 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,54 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); ¹³C-RMN (100 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 174,3, 173,0, 166,4, 163,1, 71,4, 71,3, 70,7, 67,9, 40,7, 40,3, 31,5, 30,9; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₂H₂₃N₆O₆S₂, 411,1115; encontrado 411,1116.

(2-(2-(2-(3-Metil-2-(4-(4-sulfamoilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanamido) etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de (S)-terc-butilo - 26 (compuesto de referencia)

40



A una disolución de 27 (64 mg, 0,20 mmol) en DMF (2 ml) se le añadió NHS (25 mg, 0,22 mmol) y EDC·HCI (42 mg, 0,22 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió una disolución de 19 (54 mg, 0,22 mmol) y DIPEA (110 μl, 0,67 mmol) en DMF (1 ml) y se agitó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo en DCM (5 ml) y se lavó la disolución con H₂O (1 x 5 ml), salmuera (1 x 5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se eliminó el disolvente a presión reducida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice (EtOAc) dio el producto como un sólido blanco (63 mg, 0,11 mmol, 57%).

10

15

5

¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 8,75 (a m, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,05 (d, *J* =6,6 Hz, 2H), 7,98 (d, *J* =6,6 Hz, 2H), 3,61-3,56 (m, 6H), 3,53-3,37 (m, 4H), 3,22 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,65-2,56 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,12 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,84 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); ¹³C-RMN (100 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 170,0, 158,5, 147,5, 144,5, 135,5, 128,0, 127,0, 122,3, 80,1, 71,7, 71,6, 71,3, 71,1, 70,3, 41,2, 40,7, 33,0, 28,8, 19,6, 19,2; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₂₄H₃₈N₆NaO₇S, 577,2415; med. 577,2415.

Ácido (S)-3-metil-2-(4-(4-sulfamoilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)butanoico - 27 (compuesto de referencia)



20

Se disolvieron etinilo-bencenosulfonamida (54 mg, 0,3 mmol), azido valina 20 (42 mg, 0,3 mmol) y tris-(benciltriazolilmetil)amina (TBTA, 0,3 mg, cat.) en una mezcla de *t*BuOH (3,7 ml), una disolución de CuSO₄ 0,04 M en PBS pH 7,4 (2,0 ml) y una disolución de ascorbato de sodio 0,1 M en PBS pH 7,4 (1,7 ml) y se agitaron durante 12 h a temperatura ambiente. Todos los disolventes se habían desgasificado previamente y purgado con Ar. Se vertió la reacción sobre 25 ml de H₂O acidificada hasta pH 2,0 y se extrajo la mezcla con EtOAc (4 x 20 ml), se lavaron las

- 25 reacción sobre 25 ml de H₂O acidificada hasta pH 2,0 y se extrajo la mezcla con EtOAc (4 x 20 ml), se lavaron las fases orgánicas agrupadas con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el residuo sobre sílice (el 20% de MeOH en DCM con el 0,1% de Et₃N) para dar el producto como un sólido blanco (70 mg, 72%).
- 30 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,86 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,90 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 5,24 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 2,64-2,55 (m, 1H), 1,00 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,88 (d, *J* = 6,7 Hz); ¹³C-RMN (100 MHz, DMSOd6) δ [ppm] = 169,6, 145,0, 143,2, 133,7, 126,3, 125,4, 122,6, 68,3, 30,4, 19,0, 18,3; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₃H₁₅N₄Na₂O₄S, 369,0604; encontrado 369,0609.
- 35 (2-(2-((4-Cloro-6-((4-sulfamoilfenil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de *terc*-butilo 28 (compuesto de referencia)



40 Se disolvieron 21 (160 mg, 0,64 mmol), 14 (204 mg, 0,64 mmol) y DIPEA (105 μl, 0,64 mmol) en DMF (5 ml) y se agitaron durante 3 h a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O (15 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con disolución de LiCl ac. al 10% p/v (1 x 10 ml), salmuera (1 x 10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo sobre sílice (EtOAc) para dar el producto como un sólido blanco (239 mg, 66%).

45

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, mezcla de dos rotámeros) δ [ppm] = 10,39-10,30 (m, 1H), 8,27 (s a, 1H), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 7,93 (d, J = 10,39-10,30 (m, 2H)), 8,27 (s a, 2H)), 8,27 (s

8,1 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,74 (m, 2H), 7,25 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 6,74-6,73 (m, 1H), 3,57-3,32 (m, 10H), 3,05 (m, 2H), 1,37 (s, 9H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆, mezcla de dos rotámeros, se solapan varias señales) δ [ppm] = 169,0, 168,5, 166,0, 165,9, 164,2, 163,7, 156,0, 142,6, 142,5, 138,3, 138,2, 127,1, 126,8, 120,0, 119,8, 78,1, 70,1, 70,0, 69,9, 69,6, 69,1, 68,8, 67,1, 39,0, 28,7; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₂₀H₃₀ClN₇NaO₆S, 554,1559; encontrado 554,1555.

(*E*)-(2-(2-(2-(3-((4-(4-Sulfamoilfenil)diazenil)fenil)amino)propanamido)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo - 29 (compuesto de referencia)



10

5

A 30 (20 mg, 57 μ mol) disuelto en DMF (1 ml) se le añadió HOBt (8,7 mg, 57 μ mol) seguido por EDC·HCl (12,2 mg, 64 μ mol). Tras agitar la reacción durante 1 h a temperatura ambiente se añadió una disolución de 19 (15,8 mg, 64 mmol) y DIPEA (20 μ l, 122 μ mol) en DMF (0,5 ml). Se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente, se diluyó con MeOH (1,5 ml) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20%

- 15 diluyó con MeOH (1,5 ml) y se purificó sobre HPLC de fase inversa (el 80% de A / el 20% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el producto como un polvo naranja (26 mg, 45 mmol, 79%).
- ¹H-RMN (400 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 8,02 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,91 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,83 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 3,60 (s, 4H), 3,58-3,49 (m, 6H), 3,40 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,23-3,20 (m, 2H), 2,56 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,45 (s, 9H); ¹³C-RMN (125 MHz, MeOD-d₄) δ [ppm] = 170,8, 156,1, 154,7, 153,2, 144,3, 143,3, 127,4, 126,3, 122,4, 112,2, 78,1, 70,0, 69,9, 69,6, 69,5, 39,1, 35,4, 28,7; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₂₆H₃₈N₆NaO₇S, 601,2415; encontrado 601,2416.
- 25 Ácido (*E*)-3-((4-((4-sulfamoilfenil)diazenil)fenil)amino)propanoico 30 (compuesto de referencia)



- Se disolvió sulfanilamida (85 mg, 0,49 mmol) en HCl ac. al 40% (1,3 ml) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió una disolución de NaNO₂ en agua (300 μl) gota a gota a lo largo de 5 min y se agitó la reacción en hielo durante 15 min. Se añadió lentamente la disolución amarillenta a una suspensión de 22 (129 mg, 0,37 mmol) en NaOH ac. 10 M (1 ml) y DMF (1 ml) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se acidificó la disolución rojo oscuro con HCl 6 N, se extrajo con EtOAc (6 x 10 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se eliminó el disolvente a presión reducida. La recristalización del residuo rojo oscuro dio el producto como un sólido rojo (32 mg, 25%).
- 35

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7,95 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,88 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,44 (s, 2H), 9,94 (s a, 1H), 6,74 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 3,40 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,56 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 172,9, 154,1, 152,6, 143,8, 142,9, 126,8, 125,8, 121,9, 111,7, 38,4, 33,4; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₅H₁₇N₄O₄S, 349,0965; encontrado 349,0967.

40





45 A una disolución de 4-carboxibencenosulfonamida (46 mg, 0,23 mmol) en MeCN (2 ml) se le añadió NHS (29 mg, 0,25 mmol) seguido por EDC·HCI (48 mg, 0,25 mmol). Tras agitar durante 4 h a temperatura ambiente se añadió más

EDC·HCI (24 mg, 0,13 mmol) y se agitó la reacción durante 1 h adicional a temperatura ambiente. Se añadió una disolución de 19 (52 mg, 0,21 mmol) y DIPEA (140 µl, 0,85 mmol) en DMF (1 ml). Tras agitar durante 10 h a temperatura ambiente, se filtró la reacción a través de un lecho de sílice que eluye con EtOAc, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo sobre sílice (EtOAc hasta el 10% de MeOH en EtOAc) para dar el producto como un sólido blanco (61 mg, 0,14 mmol, 67%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,71 (a m, 1H), 8,00 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,90 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,46 (s a, 2H), 6,76 (a m, 1H), 3,55-3,33 (m, 10H), 3,06-3,05 (m, 2H), 1,37 (s, 9H); 13 C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 165,8, 156,1, 146,7, 137,7, 128,3, 126,1, 78,1, 70,0, 69,9, 69,6, 69,2, 67,1, 39,1, 28,7; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₈H₂₉N₃NaO₇S, 454, 1618; encontrado 454, 1623.

Propagación de errores

5

10

20

40

45

Durante el análisis de datos se propagaron desviaciones estándar según la fórmula (1) tal como recomienda el National 15 Institute of Standards and Technology.^[2]

$$\sigma_f = \sqrt{\sum_{i=1..n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \sigma_i\right)^2} \quad (1)$$

Donde $f = f(x_1, x_2, ..., x_n)$, σ_f es la desviación estándar de la función $f \vee \sigma_f$ es la desviación estándar de x_i .

Determinación de K_D de ligando mediante medición de polarización de fluorescencia

Se disolvieron ligandos marcados fluorescentemente (2 mg) en DMSO (100 µl) y se diluyeron 1:2000 en PBS pH 7,4 para determinar la concentración de reserva mediante medición de absorbancia a 495 nm ($\varepsilon_{495} = 72.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se expresó CAIX recombinante tal como se describió previamente^[3], se dializó contra tampón de ensayo 25 (tris(hidroximetil)aminometano 50 mM [TIRS] pH 7,4 que contiene ZnSO4 1 mM) a 4°C durante la noche y se determinó la concentración de proteínas determinada mediante medición de absorbancia a 280 nm (ϵ_{280} = 35.075 M⁻¹ cm⁻¹).

- En un placa negra de 384 pocillos en tampón de ensayo (30 µl) se incubaron ligandos marcados fluorescentemente 30 (5 nM de reservas de DMSO diluidas de manera apropiada, contenido de DMSO final ajustado al 0,001%) con concentraciones crecientes de anhidrasa carbónica recombinante IX (de 4,6 μM a 140 pM en etapas de 1:2) durante 1 h a temperatura ambiente. Se midió la polarización de fluorescencia (FP) en un lector de placas de modo múltiple Spectra Max Paradigm (Molecular Devices). Se realizaron experimentos por triplicado, se dividieron valores de FP medios entre la señal de superior-meseta y el valor de FP fraccional ajustado a la ecuación (2) usando KaleidaGraph 35 4.0 (Synergy Software).

$$FP = ([P]_0 + [L]_0 + K_D) - \sqrt{([P]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4[P]_0[L]_0}$$
(2)

Donde FP es la polarización de fluorescencia fraccional, [P]o la concentración de proteínas total, [L]o la concentración total del ligando marcado fluorescentemente y K_{D} la constante de disociación en nM.

Los valores medidos de K_D para complejos de fluoróforo-ligador-ligando fueron: 1a 12,± 61,0 nM; 2a 18,1 ± 1,3 nM; 3a 46,8 ± 1,2 nM; 5a 218 ± 9 nM. 4a no pudo determinarse debido a sus propiedades de extinción oscuras. El eiemplo de referencia 6a no se unió a CAIX. Por tanto, el ligando de acetazolamida (AAZ) de 1a parece ser el más prometedor.

Medición de polarización de fluorescencia competitiva de KD

En un placa negra de 384 pocillos en tampón de ensayo (véase lo anterior, 40 µl) se incubaron sonda marcada fluorescentemente 1a (5 nM de reservas de DMSO diluidas de manera apropiada) y anhidrasa carbónica recombinante 50 IX (25 nM) con concentraciones crecientes de ligando no marcado (de 2,5 μM a 76 pM en etapas de 1:2) durante 1 h a temperatura ambiente. Se midió el FP en un lector de placas de modo múltiple Spectra Max Paradigm (Molecular Devices). Se realizaron experimentos por triplicado y se analizaron los datos tal como se describe por Wang y colaboradores.^[4]

55 Se usó este método para determinar K_D para los conjugados de fármaco-ligador-ligando sin marcar preparados tal como se muestra en la figura 2. Los valores de K_D se proporcionan en un ajuste de grupos ± errores estándar. Se determinaron los siguientes valores de K_D: 7a 7,3 ± 0,5 nM; 8a 40,3 ± 2,6 nM; 9a 26,5 ± 2,5 nM. El K_D para 7b fue > 1 µM. Por tanto, los conjugados seleccionados como diana 7a, 8a y 9a conservan la afinidad de unión para CAIX recombinante in vitro mientras que los controles no seleccionados como diana 7b, 8b y 9b no presentan una unión 60 fuerte.

Cultivo celular

Se mantuvieron células SKRC52 y HEK en medio RPMI (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS, Invitrogen) y antibiótico-antimicótico (AA, Invitrogen) a 37°C y el 5% de CO₂. Se mantuvieron células A549 en medio F-12K (Invitrogen) complementado con FCS al 10% (Invitrogen) y AA (Invitrogen) a 37°C y el 5% de CO₂. Para el pase, se separaron células usando tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,05% (Invitrogen) cuando se alcanza el 90% de confluencia y vuelven a sembrarse a una dilución de 1:10.

Se analizó la expresión en la superficie celular de CAIX en diferentes líneas celulares usadas en este estudio mediante citometría de flujo usando aCAIX (un anticuerpo de conejo anti-CAIX humana policional de Santa Cruz Biotechnology). Se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado de manera adecuada para detección. Se encontró que las células

- Se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado de manera adecuada para detección. Se encontró que las células SKRC52 expresan de manera constitutiva altos niveles de CAIX. En cambio, las células A549 expresan sólo niveles muy bajos de CAIX en condiciones normóxicas. Puesto que mantienen fuertes uniones a placas de cultivo, se usaron estas células como controles negativos en experimentos que requieren múltiples etapas de lavado de células unidas. Se encontró que las células HEK no expresan niveles detectables de CAIX en condiciones de cultivo normóxicas.
- 15 Pueden separarse fácilmente de placas de cultivo con EDTA y se usaron, por tanto, como controles negativos en la mayoría experimentos de citometría de flujo.

Ensayo de citotoxicidad in vitro

- 20 Se sembraron células SKRC52 o A549 en placas de 96 pocillos en su medio de cultivo apropiado (100 μl) a una densidad de 5000 células por pocillo y se dejó que crecieran durante 24 h. Se reemplazó el medio con medio que contenía diferentes concentraciones de sustancia de prueba (100 μl, 300 nM 15 pM en 1:3 etapas de dilución) y las placas o bien:
- 25 (a) se incubaron durante 72 horas en presencia de la sustancia tóxica, o bien

(b) se incubaron durante 1 h en condiciones de cultivo convencionales, seguido por eliminación del medio que contiene la sustancia tóxica, lavando suavemente el medio recién preparado de células una vez y añadiendo medio nuevo (100 μ l) e incubando durante 72 h en condiciones de cultivo.

30

35

5

Se añadió colorante de viabilidad celular MTS (20 μ l, Promega), se incubaron las placas durante 1 h en condiciones de cultivo y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de modo múltiple Spectra Max Paradigm (Molecular Devices). Se realizaron experimentos por triplicado y se calculó la viabilidad celular promedio como absorbancia corregida con fondo medido dividida entre la absorbancia de pocillos de control sin tratar. Se determinaron valores de *CE*₅₀ ajustando datos a la ecuación logística de cuatro parámetros.

Los valores de *CE*₅₀ encontrados para diversos conjugados y compuestos citotóxicos contra células SKRC52 que expresan CAIX fueron tal como sigue:

40 Condición (a): 14 55 ±5 pM; 7a 21 ± 7 pM; 7b 96 ± 33 pM; DM1 4,3 ± 0,5 pM; DM1SMe 0,5 ± 0,0 pM; 9a 41 ± 9 pM; 9b 31 ± 6 pM.

Condición (b): 14 1,0 \pm 0,1 nM; 7a 0,7 \pm 0,1 nM; 7b 1,4 \pm 0,3 nM; DM1 45 \pm 10 nM; DM1SMe 5,8 \pm 1,1 nM; 9a *; 9b *.

- 45 Estos resultados muestran que los conjugados 7a y 9a liberan el resto de fármaco citotóxico en cantidades eficaces a lo largo de 72 horas en la condición (a). Sin embargo, los conjugados de DM1 9a y 9b no presentaron suficiente citotoxicidad para medición de valores de *CE*₅₀ en el plazo de 1 hora de la condición (b) a concentraciones de hasta 300 nM,, lo que refleja la relativamente larga semivida de estos conjugados tal como se comenta adicionalmente a continuación.
- 50
- Análisis de unión a ligando mediante citometría de flujo

Se separaron células de placas de cultivo usando una disolución de EDTA 50 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4, se contaron y se suspendieron hasta una concentración final de 1,5 x 10⁶ células ml⁻¹ en una disolución al 1% v/v de FCS en PBS pH 7,4. Se centrifugaron alícuotas de 3 x 10⁵ células (200 μl) y se resuspendieron en disoluciones de ligandos marcados con IRDye750 (Licor) (30 nM) en una disolución al 1% v/v de FCS en PBS pH 7,4 (200 μl) y se incubaron en hielo durante 1 h. Se lavaron las células una vez con 200 μl de disolución al 1% v/v de FCS en PBS pH 7,4 (200 μl), se centrifugaron, se resuspendieron en disolución al 1% v/v de FCS en PBS pH 7,4 (300 μl) y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD Bioscience). Se usó FlowJo versión 8.7 (Treestar) para el análisis de datos y visualización. Los resultados fueron los siguientes:

(1) análisis de citometría de flujo de la unión de conjugados de ligando-IRDye750 1c-6c (figura 1) a células SKRC52 que expresan CAIX.

65 Se separaron células con EDTA, se trataron con conjugado de colorante 30 nM durante 1 h a 0°C, se lavaron y se

ES 2 735 348 T3

analizaron. Sólo 1c se une con la fuerza suficiente para dar como resultado un desplazamiento de fluorescencia fuerte tras el lavado de las células. Dada su mayor K_D, los conjugados 2c-5c se disocian probablemente demasiado rápido como para detectarse. El conjugado 6c, que carece de un ligando para CAIX, sólo muestra algo de unión residual.

5 (2) Análisis de citometría de flujo de la unión de conjugados de ligando-IRDye750 1c-6c (figura 1) a células HEK negativas para CAIX.

Se separaron células con EDTA, se trataron con conjugado de colorante 30 nM durante 1 h a 0°C, se lavaron y se analizaron. En ausencia de una interacción de unión específica, existe poca diferencia entre células tratadas con conjugados de CAIX ligando-colorante y células no tratadas.

(3) Análisis de citometría de flujo de la unión de conjugados de ligando-Alexa546 1b y 6b a (a) células SKRC52 que expresan CAIX y (b) células HEK que carecen de CAIX en su superficie celular.

Se separaron células con EDTA, se trataron con conjugado de colorante 30 nM durante 1 h a 0°C, se lavaron y se 15 analizaron. (a) Sólo el conjugado que porta un ligando para CAIX puede lograr un aumento en la intensidad de fluorescencia. El conjugado que carece del ligando no da lugar a un desplazamiento relativo a células no tratadas. (b) Tal como se espera en ausencia de un receptor de la superficie celular ninguno de los conjugados puede lograr un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia hacia la derecha.

Análisis de internalización de ligando mediante citometría de flujo

Se sembraron células SKRC52 o A549 en placas de 6 pocillos en su medio de cultivo apropiado (2 ml) a una densidad de 1,5 x 10⁵ células por pocillo y se dejó que crecieran durante 24 h en condiciones de cultivo. Se reemplazó el medio con medio que contenía sondas marcadas con IRDye750 (Licor) 1c o 6c (2 ml, 30 nM) y se incubaron las placas 25 durante 1, 2 ó 4 h en condiciones de cultivo convencionales. Tras lavar con PBS pH 7,4 (2 x 2 ml), se añadió tripsina-EDTA al 0,05% (500 µl, Invitrogen) y se incubaron las placas en condiciones de cultivo convencionales durante 15 min. Se añadió medio (500 µl), se sedimentaron células y se resuspendieron en PBS pH 7,4 que contenía FCS al 1% v/v (150 µl). Tras incubar durante 15 min en hielo, se marcaron las células durante 30 min en hielo con IgG de conejo

- 30 anti-CAIX humana (1:100, Santa Cruz) en PBS pH 7.4 que contenía FCS al 1% (150 ul), se lavaron con PBS pH 7.4 que contenía FCS al 1% (2 x 150 µl) y se marcaron durante 30 min en hielo con conjugado de cabra anti-IgG de conejo con Alexa488 (1:100, Invitrogen) en PBS pH 7,4 que contenía FCS al 1% (150 μl). Tras lavar con PBS pH 7,4 que contenía FCS al 1% (2 x 150 µl), se sedimentaron las células y se resuspendieron en PBS pH 7,4 que contenía FCS al 1% v/v y yoduro de propidio (300 µl, 1 µg ml-1, Invitrogen) y analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD
- 35 Bioscience). Se usó FlowJo versión 8.7 (Treestar) para el análisis de datos y visualización. Para inhibir los mecanismos de captación, se preincubaron células con medio que contiene NaN₃ al 0,2% durante 1 h y se mantuvo la concentración de NaN₃ en la totalidad del experimento. Alternativamente, todas las etapas se realizaron a 0°C o se añadió un exceso de AAZ (100 µM) al medio de cultivo.
- Se incubaron células SKRC52 positivas para CAIX unidas a placas de cultivo con medio que contenía 1c 30 nM 40 durante 1 h a 37°C. La separación con tripsina dio como resultado células con mayor intensidad de fluorescencia que las células tratadas con conjugado no de unión 6c o células no tratadas. b) Se tiñeron alícuotas de las mismas células que se habían tratado con 1c y se separaron con tripsina con un anticuerpo anti CAIX (aCAIX AB) seguido por un anticuerpo secundario marcado con Alexa488 (2º AB) a 0ºC tras lo cual el análisis de citometría de flujo dio un
- 45 histograma superimponible a células tratadas con anticuerpo secundario únicamente. Se concluyó que el tratamiento con tripsina había eliminado toda la CAIX unida a la superficie y el desplazamiento de fluorescencia de células marcadas con 1c en a) debe proceder del conjugado internalizado. Las células separadas del soporte sólido usando EDTA y teñidas como antes dieron lugar a un desplazamiento 10x en la intensidad de fluorescencia hacia la derecha en comparación con el inicial, dando seguridad de que la detección de CAIX mediante FCAS funcionó en efecto.
- 50

55

60

10

20

Para respaldar adicionalmente la reivindicación de que se observaban procesos de captación activos, se decidió repetir el experimento en condiciones que inhibían la captación. Se trataron previamente células SKRC52 con medio que contenía NaN₃ al 0.2% p/v durante 1 h antes de la incubación con 1c 30 nM v NaN₃ al 0.2% p/v a 37°C durante 1 h. Se sabe que NaN₃ es un inhibidor de procesos de captación activos^[1] y efectivamente la señal fluorescente se desplazó al nivel inicial. Se logró el mismo efecto cuando se incubaba con 1c en presencia de AAZ en exceso como un ligando competitivo o cuando se incubaba a 0°C, lo cual también inhibe los procesos de captación activos.

Al ampliar el tiempo de incubación con 1c 30 nM a 37ºC desde 1 h hasta 2 h y 4 h no se observó una señal notablemente aumentada. Por tanto, se concluyó que aunque tiene lugar algo de internalización, es ineficiente a lo largo del tiempo.

Finalmente, se sometió a prueba la captación activa del conjugado 1c de unión a CAIX 1c en células A549 negativas para CAIX como antes. Puesto que no se observó desplazamiento en la intensidad de fluorescencia con respecto al nivel inicial, se concluyó que 1c no se llevó a células A549. Esto se espera en ausencia de un receptor de la superficie celular para 1c.

ES 2 735 348 T3

Análisis de internalización de ligando mediante microscopía confocal

- Se sembraron células SKRC52 en placas de cámara de cubreobjetos de 4 pocillos (Sarstedt) a una densidad de 10⁴
 células por pocillo en medio RPMI (1 ml, Invitrogen) complementado con FCS al 10%, AA y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES, 10 mM) se dejó que crecieran durante 24 h en condiciones de cultivo convencionales. Se reemplazó el medio con medio que contenía 1b o 6b (30 nM), tras 1 h se añadió colorante nuclear Hoechst 33342 (Invitrogen) y se obtuvieron imágenes de colonias seleccionadas al azar en un microscopio confocal Axiovert 200M (Zeiss).
- 10

Determinación de la estabilidad mediante espectrometría de masas

Se disolvió carbamato o carbonato seleccionado como diana 7a o 8a (30 μg) en PBS pH 7,4 (1,5 ml) y se incubaron a 37°C con agitación suave. Se retiraron alícuotas (100 μl) a diferentes puntos de tiempo y se diluyeron 1:1 con un patrón interno de etodolac (TCI Chemicals) en MeOH (20 μg ml⁻¹). Se separaron moléculas pequeñas de sales usando una columna de preparación de muestras en línea Oasis WAX (Waters) en un módulo de separación Alliance HT (inyecciones de 50 μl, 0,3 ml min⁻¹ HCOOH ac. al 0,1% durante 3 min seguido por 0,3 ml min⁻¹ de MeCN durante 7 min, Waters) y se analizaron mediante espectrometría de masas/espectrometría de masas (EM/EM) en un

- espectrómetro Quattro API (Waters) que monitoriza transiciones de monitorización de reacción múltiple (MRM) apropiadas para 8a, 8b y etodolac como patrón. Se realizaron mediciones por triplicado, se integraron los picos y se calculó la fracción de compuestos de prueba intactos como fracción de señal en el tiempo t dividida entre la señal en el tiempo cero. Puesto que las señales debidas a etodolac fueron constantes a lo largo del tiempo, se omitió una corrección adicional usando el patrón interno como referencia. Para mediciones de estabilidad en suero de ratón, se disolvieron compuestos en plasma de ratón recién descongelado (Invitrogen), se tomaron alícuotas a diferentes puntos
- 25 de tiempo y se diluyeron con un volumen igual de MeCN. Tras agitar con vórtex de manera vigorosa durante 1 min, se centrifugó el precipitado de proteína y se analizó el sobrenadante como antes.

Las semividas de 7a y 8a en plasma de ratón a 37°C tal como se determina mediante espectrometría de masas (EM/EM) fueron de 43 minutos y 61 minutos, respectivamente. Los errores fueron < 1 min.

30

Determinación de la estabilidad mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Se disolvió conjugado de DM1 seleccionado como diana 9a (230 µg, 140 nmol) en PBS pH 7,4 (1 ml) y se incubó a 37°C con agitación suave. Se retiraron alícuotas (100 µl) a diferentes puntos de tiempo y se diluyeron 1:1 con una disolución de patrón interno de etodolac (TCI Chemicals) en MeCN (20 µg ml⁻¹). Se añadió agua (600 µl) y se

- disolución de patrón interno de etodolac (TCI Chemicals) en MeCN (20 µg ml⁻¹). Se añadió agua (600 µl) y se analizaron alícuotas de esta mezcla (50 µl) sobre una columna Syngergi RP Polar (150 x 4,6 mm, 4 µm, Phenomenex) en un módulo de separación Alliance HT (1 ml min⁻¹ del 5% de MeCN en TFA acuoso al 0,1% al 100% MeCN a lo largo de 20 min, Waters). Se detectaron analitos usando un detector de UV/VIS de matriz fotográfica Waters 2996 (Waters). Se realizaron las mediciones por triplicado, se integraron los picos y se calculó la fracción de compuestos de prueba intactos como fracción de señal en el tiempo t dividida entre la señal en el tiempo cero. Puesto que las señales debidas a etodolac fueron constantes a lo largo del tiempo se omitió una corrección adicional usando el patrón
- de prueba infactos como fracción de señar en el tiempo i dividida entre la señar en el tiempo cero. Puesto que las señales debidas a etodolac fueron constantes a lo largo del tiempo se omitió una corrección adicional usando el patrón interno como referencia. Para mediciones de estabilidad en suero de ratón, se disolvieron compuestos en plasma de ratón recién descongelado (Invitrogen), se tomaron alícuotas a diferentes puntos de tiempo y se diluyeron con un volumen igual de MeCN. Tras agitar con vórtex de manera vigorosa durante 1 min, se centrifugó precipitado de proteína y se analizó el sobrenadante como antes.

Tal como se esperaba, el carbonato 7a ($t_{1/2}$ = 15 h) fue menos estable en PBS a 37°C que el carbamato 8a ($t_{1/2}$ > 24 h). No se observó descomposición para el conjugado de DM1 9a en las mismas condiciones (figura 8). Se redujo la estabilidad de 7a y 8a en suero de ratón *in vitro* ($t_{1/2}$ = 43 y 61 min respectivamente), pero se produjo en un intervalo de tiempo compatible con la acumulación preferencial de los conjugados de AAZ en el sitio de tumor. El conjugado de DM1 9a fue significativamente más estable en suero de ratón ($t_{1/2}$ = 20 h).

Estudios con animales

55 Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las leyes y regulaciones de bienestar animal suizas con el número de licencia 42/2012 concedido por Veterinaeramt des Kanton Zurich.

Implantación de tumores SKRC52 subcutáneos

60 Se hicieron crecer células SKRC52 hasta el 80% de confluencia y se separaron con tripsina-EDTA al 0,05% (Invitrogen). Se lavaron las células con PBS pH 7,4 una vez, se contaron y se resuspendieron en PBS hasta una concentración final de 6,7 x 10⁷ células ml⁻¹. Se anestesiaron ratones balb/c nu/nu atímicos, de 8-10 semanas de edad (Charles River) con isofluorano y se inyectaron alícuotas de 1 x 10⁷ células (150 µl de suspensión) por vía subcutánea en la región lumbar.

65

Obtención de imágenes de IVIS

Se inyectó a ratones que tenían tumores SKRC52 subcutáneos (de 200 - 300 mm³ de tamaño) por vía intravenosa ligando de CAIX marcados con IRDye750 (Licor) 1c-6c (hasta 10 nmol) disueltos en DMSO al 5% v/v en PBS pH 7,4 (150 µl). Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se adquirieron imágenes de fluorescencia in vivo en un sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum (Xenogen, exposición 1 s, factor de agrupamiento 8, excitación a 745 nm, filtro de emisión a 800 nm, f número 2, campo de visión 13,1). Se tomaron imágenes tras 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 12 h y 24 h. Se administró alimento y agua a voluntad durante ese periodo.

10 Se obtuvieron imágenes en el infrarrojo cercano de SKRC52 de ratones que tienen xenoinjerto 1-12 h tras la inyección intravenosa de 3 nmol de conjugados de ligando-IRDye750 1c-5c y conjugado no seleccionado como diana 6c como control negativo (véase la figura 1 para la estructuras). Sólo el conjugado de AAZ 1c dio un buen contraste entre el tumor y el fondo y por tanto, se seleccionó como base para desarrollo adicional de un conjugado seleccionado como diana.

15

5

Ya 1 h después de la inyección intravenosa de 1 nmol de 1c el tumor podía verse claramente contra el fondo. La invección de 3 nmol da una señal más fuerte y más duradera con buen contraste entre el tumor y el fondo en puntos de tiempo tempranos y, por tanto, se usó para estudios de obtención de imágenes adicionales. Una dosis de 10 nmol satura el detector de fluorescencia con los parámetros usados en puntos de tiempo tempranos pero conduce a una señal incluso más duradera.

Tras la administración de 2c el tumor era apenas visible; los demás conjugados no alcanzaron el tumor en niveles por encima de la fluorescencia de fondo. El conjugado no seleccionado como diana 6c tampoco alcance el tumor y también se elimina más rápido del animal que los conjugados de ligando-IRDye750.

25

20

Posteriormente los ratones se sacrificaron mediante luxación cervical. Se extrajeron el corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, una sección del intestino (100 - 150 mg), músculo esquelético (100 - 150 mg) y el tumor y se obtuvieron imágenes individualmente usando los parámetros anteriores. De manera cualitativa, pudo observarse una disminución en el rendimiento de selección como diana de 1c a 5c y muy poca acumulación de tumor u órgano del conjugado no

30 seleccionado como diana 6c. Esto confirma que la afinidad de unión del ligando de selección como diana para CAIX es un determinante importante para la acumulación dentro del tumor y obtención de perfil in vitro de conjugados de colorante mediante FP y citometría de flujo tiene un valor predictivo para el rendimiento de selección como diana in vivo

35 Análisis de biodistribución

Se invectó a ratones (grupos de 3 por punto de tiempo y compuesto) que tenían tumores SKRC52 subcutáneos (de 200 - 300 mm³ de tamaño) por vía intravenosa sondas marcadas con IRDye750 (Licor) 1c o 6c (3 nmol) disueltas en DMSO al 5% v/v en PBS pH 7,4 (150 µl). Tras 1 h, 2 h o 4 h se sacrificaron los animales, se extrajeron los órganos

- como antes, se cortaron en pequeños trozos, se pesaron y se suspendieron en tampón de homogeneización de órgano 40 1:1 p/v que contenía EDTA (40 mM), proteinasa K (6 mg/ml), Triton X-100 (1,6 µl/ml) y cantidades traza de ADNasa 1 en PBS pH 7,4 (100 µl por 100 mg de tejido). Se homogeneizó la suspensión en un homogeneizador de órganos TissueLyser (Quiagen, 25 Hz, 10 min), se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y se transfirieron 100 µl del homogeneizado a una placa de 96 pocillos. Se punteó una serie de dilución estándar de 1c en tampón de
- homogeneización (750 nM 47 nM, 25 1,5 % de ID g⁻¹ en etapas de 1:2) a lo largo de las muestras de órgano por 45 triplicado. Se registraron imágenes fluorescentes de las placas en un sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum (Xenogen, parámetros como antes) y se analizaron usando software Living Image versión 4.3.1 (Caliper Life Science) usando las herramientas integradas en la región de interés (ROI). Se dedujeron las concentraciones de colorante en muestras de órgano en % de dosis inyectada por gramo de tejido (% de ID g⁻¹) a partir de las intensidades de fluorescencia que se originan del pocillo correspondiente mediante comparación con las series de dilución estándar. 50

Los resultados se muestran gráficamente en las figuras 3 y 4. La figura 3 muestra acumulaciones en órganos que se notifican en unidades de porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de ID g-1). a) 1 h después de la administración intravenosa de 3 nmol de 1c (azul) y 6c (rojo) b) 2 h después de la administración intravenosa de 3 nmol

- de 1c (azul) y 6c (rojo) c) 4 h después de la administración intravenosa de 3 nmol de 1c (azul) y 6c (rojo) d) curva de 55 calibración (promedio de triplicados) para la conversión de intensidad de fluorescencia en % de ID g⁻¹. Las barras de error indican desviaciones estándar. Todos los puntos de datos son promedios de tres ratones.
- La acumulación de 1c en el tumor fue rápida y eficaz con el 13,4 ± 3,0% de dosis inyectada por gramo de tejido (% de 60 ID g⁻¹) después de sólo 1 h (figura 2b, figuras de apoyo 10 y 11). Este resultado se compara de manera favorable con trabajo previo en la selección como diana basada en anticuerpos de tumores que expresan CAIX, en donde sólo pudieron detectarse valores de captación de tumor notablemente inferiores (un máximo del 2,4 ± 0,2% de ID g⁻¹).[27] En este caso, el conjugado de colorante 1c, sin embargo, se disoció progresivamente del tumor ($t_{1/2}$ de residencia ≈ 1 h), lo que sugiere que una mejora de la afinidad de unión a CAIX puede contribuir además a un rendimiento de
- selección como diana de tumores eficaz. 65

Se observó una razón de tumor con respecto a sangre de 13,8:1 1 h después de la inyección intravenosa de 1c y mejoró adicionalmente hasta 79,2:1 después de 4 h. Las razones de tumor con respecto a órgano para órganos excretores osciló entre 0,2:1 para el hígado y 1,4:1 para los riñones después de 1 h pero se observó un alto nivel de

- 5 selectividad para otros órganos (por ejemplo, 27,6:1 para tumor con respecto a corazón después de 1 h). Puesto que AAZ es un ligando de CA con amplia selectividad de isoforma, los patrones de captación diferencial observados están influidos probablemente de manera fuerte por niveles de expresión de CA relativos en diferentes tejidos y la accesibilidad del antígeno (por ejemplo, puede esperarse que CAII intracelular sea inaccesible a las moléculas cargadas). De manera importante, la selección como diana de tumores fue claramente dependiente del resto de unión
- 10 a CAIX, tal como se reveló por la acumulación de tumor 22 veces mayor a 1 h del conjugado de colorante seleccionado como diana basado en AAZ 1c en comparación con el colorante no seleccionado como diana 6c. Suponiendo que 6c es un buen modelo para la distribución de tejido de agentes anticancerígenos "desnudos" (es decir, no seleccionados como diana), esta comparación resalta el posible impacto de la administración de fármacos basada en ligandos de dosis terapéuticamente relevantes de fármacos en masas neoplásicas.
- 15

20

La figura 4 muestra el análisis de biodistribución de 1c en ratones balb/c nu/nu que tienen tumores SKRC52 subcutáneos incluyendo valores de estómago y sangre 1, 2 y 4 h después de administrar 3 nmol del conjugado de colorante por vía intravenosa. Se notifican las acumulaciones en órganos en unidades de % de ID g⁻¹. Las barras de error indican desviaciones estándar. Los datos mostrados son promedios de tres ratones.

Análisis de la penetración de tumor

Se inyectó a ratones que tenían tumores SKRC52 subcutáneos (de 200 - 300 mm³ de tamaño) por vía intravenosa sondas marcadas con Alexa546 (Invitrogen) 1b o 6b (50 nmol) disueltas en PBS pH 7,4 (150 μl). Tras 1 h, 2 h o 4 h a 25 los animales se les invectó una disolución de Hoechst 33342 (Invitrogen, 5,4 mM) en solución salina (150 ul) y se sacrificaron después de 5 min. Se extrajeron los órganos como antes y se ultracongelaron en medio criogénico Neg-50 (Thermo Scientific) usando nitrógeno líquido. Tras calentar hasta -20°C, se cortaron muestras en secciones de 10 µm de ancho y se obtuvieron imágenes directamente en un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 (Zeiss).

- 30 Se encontró que, aunque el conjugado ya ha empezado a penetrar en el tumor después de 30 min, la tinción del tumor con 1b es inicialmente la más alta en zonas bien perfundidas. A continuación, la tinción se vuelve más homogénea. Después de 2 h, la tinción se vuelve más débil a medida que el conjugado empieza a eliminarse del tumor. No puede detectarse fluorescencia debido a 6b dentro del tumor, lo cual es según la carencia de acumulación macroscópica observada con 6c.
- 35

El análisis microscópico de órganos mostró una fuerte fluorescencia debido a 1b dentro del tumor y el intestino. Lo último se debe probablemente a excreción hepatobiliar del conjugado de colorante. Una capa observada de fluorescencia en el estómago se corresponde más probablemente a células epiteliales de la mucosa gástrica, que expresan CAIX en condiciones normales. El riñón y el hígado también mostraron algo de fluorescencia como resultado de la secreción del conjugado a través de estos órganos.

40

Dosificación

- La estimación de la dosis de terapia recomendada de a) 7a y b) 8a en ratones desnudos se realizó estudiando 45 diferentes dosificaciones usando un esquema de cinco inyecciones en cinco días consecutivos en comparación con vehículo (DMSO al 5% en PBS pH 7,4). Los regímenes de dosificación fueron de 0,4 nmol/día, 1,3 nmol/día, 4,0 nmol/día y 13,3 nmol/día. Se usó un ratón para cada régimen. Cuando el animal no perdió más del 5% de su peso corporal inicial a lo largo de 15 días después de la inyección inicial, se supuso que la dosis se toleraba bien.
- 50 El estudio mostró que 7a se toleraba hasta 4,0 nmol/día, pero se toleraba escasamente a 13,3 nmol/día. El estudio mostró además que 8a se toleraba bien hasta e incluyendo 13,3 nmol/día.

La estimación de la dosis de terapia recomendada y esquema de conjugado de DM1 9a se estudió en ratones desnudos que tenían tumores SKRC52. Se usó un ratón para someter a prueba cada pauta posológica. Se administraron invecciones cada día empezando el día 0 en DMSO al 5% en PBS pH 7,4 (150 µl). Los resultados se 55 muestran en la figura 5. Se toleraron seis dosis de 60 nmol de 9a con sólo mínima pérdida de peso. Puesto que los animales en este estudio pesaron en promedio un 18% menos que los usados en el estudio de terapia, se usó una dosis de 70 nmol por invección para el experimento de terapia. El número de invecciones también aumentó desde 6 hasta 7 en 7 días consecutivos. 60

Experimentos de terapia

Se implantaron tumores de xenoinjerto SKRC52 en ratones balb/c nu/nu (Charles River) tal como se describe anteriormente. Después de 14 días, los ratones se asignaron aleatoriamente en grupos de terapia de 5 ó 6 animales y empezó el tratamiento. Se administraron 5 dosis de 4 nmol de 7a,b, 8a,b o 7 dosis de 70 nmol de 9a,b cada una en

PBS pH 7,4 (150 µl) que contiene DMSO al 5% en 5 ó 7 días consecutivos y se trató un grupo con vehículo (DMSO al 5% en PBS pH 7,4). En el caso de 7-9b se añadió una cantidad equimolar de AAZ a la disolución de inyección para controlar una posible actividad antitumoral de inhibidores de CAIX. Se administraron sorafenib y sunitnib a una dosis convencional de 30 mg/kg tal como se describió previamente.^[5] Se pesaron los animales y se midieron los tamaños

- 5 de tumor cada día y se calculó el volumen de tumor según la fórmula (lado largo) x (lado corto)² x 0,5. Se sacrificaron los animales cuando el peso corporal disminuyó en más del 15% en relación con el primer día de terapia o cuando los tumores alcanzaron un volumen de >2000 mm³. Se usó Prism 6 (GraphPad Software) para el análisis de datos (ANOVA de dos factores regular con la prueba de Bonferroni).
- Se muestran los resultados en las figuras 6 y 7. Las barras de error dan errores estándar. Los resultados terapéuticos obtenidos con los conjugados de duocarmicina-AAZ sólo indicaron un modesto efecto de inhibición del crecimiento tumoral (figura 6a). No obstante, el carbonato seleccionado como diana 7a dio lugar a un retardo del crecimiento tumoral estadísticamente significativo en comparación con ratones que sólo recibieron vehículo (*p* < 0,0001) y ratones que recibieron conjugado no seleccionado como diana 7b más cantidades equimolares de AAZ (*p* < 0,05). Los</p>
- 15 constructos basados en carbamato 8a y 8b no condujeron a ningún retardo en el crecimiento tumoral. Parece razonable que la baja afinidad de 8a hacia el antígeno (K_D = 40,3 ± 2,6 nM frente a K_D = 7,3 ± 0,5 nM para 7a) y activación extracelular ineficaz pueden haber sido parcialmente responsables de este efecto. El tratamiento pudo realizarse con una pérdida de peso menor del 15% de peso corporal (figura 6b).
- 20 Para el conjugado de DM1 9a, se observó un potente efecto antitumoral a dosis, que dieron sólo toxicidad mínima (es decir, sin pérdida de peso corporal detectable dando 7 x 70 nmol de conjugado de DM1 9a en 7 días consecutivos). Durante el periodo de tratamiento, los tumores se encogieron y continuaron reduciéndose en volumen durante 7 días adicionales. Sólo 20 días después del inicio del tratamiento, los tumores empezaron a volver a crecer, como consecuencia de que los ratones no habían recibido ningún tratamiento farmacológico adicional. De manera el importante ni equipitivit per consecuencia de que los ratones no habían recibido ningún tratamiento farmacológico adicional. De manera el importante el periodo de tratamiento de consecuencia de que los ratones no habían recibido ningún tratamiento farmacológico adicional.
- 25 importante, ni sorafenib ni sunitinib, que representan los agentes quimioterápicos más comúnmente usados para el tratamiento de cáncer de riñón, presentaron ningún efecto antitumoral detectable, en línea con informes previos en diferentes modelos de cáncer de riñón. Estos hallazgos sugieren que la administración dirigida de potentes agentes citotóxicos puede proporcionar una ventaja terapéutica en comparación con las normas asistenciales habituales. DM1 puede ser una carga útil particularmente adecuada para el desarrollo de citotóxicos seleccionados como diana, puesto
- 30 que la presencia de por ejemplo, un resto éster en su estructura puede facilitar su detoxificación en órganos relacionados con el aclaramiento, evitando por tanto tejidos sanos.

(B) Restos de unión bivalentes

65

35 Se realizó un estudio comparativo del rendimiento de selección como diana de tumores de ligandos monovalentes y bivalentes a anhidrasa carbónica IX (CAIX) en carcinoma de células renales tal como sigue.

Síntesis de ligandos de selección como diana marcados mediante fluorescencia

40 Se sintetizaron derivado de acetazolamida monovalente (AAZ) B1 y derivado de AAZ bivalente B2 que tienen las estructuras mostradas en las figuras 9 y 10 usando química de péptidos en fase sólida de Fmoc convencional. Estos restos de unión se marcaron mediante fluorescencia con IRDye 750 para proporcionar ligandos monovalentes y bivalentes marcados mediante fluorescencia B3 y B4. Los métodos de síntesis fueron tal como sigue.

45 Síntesis de AAZTL - B1 (compuesto de referencia)

Se hinchó resina de carbonato de *p*-nitrofenilo Wang y poliestireno comercialmente disponible (250 mg, 0,15 mmol) en DMF (5 ml durante 5 min) y se hizo reaccionar con una disolución de 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dietanoamina (250 µl), DIPEA (500 µl) y DMAP (2,5 mg) en DMF (4,5 ml) durante 12 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó la resina con DMF (3 x 5 ml durante 1 min), MeOH (3 x 5 ml durante 1 min) y de nuevo DMF (3 x 5 ml durante 1 min). Se preparó una disolución de ácido 5-azido valérico (65 mg, 0,45 mmol), HATU (171 mg, 0,45 mmol) y DIPEA (148 µl, 0,9 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se preparó una disolución de Cul (2,9 mg, 0,015 mmol), TBTA (8 mg, 0,015 mmol) y alquino 10 (123 mg, 0,45 mmol) en una mezcla de DMF (1 ml) y THF (1 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 24 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (2,2 ml), TIS (50 µl), H₂O (50 µl), m-cresol (100 µl) y tioanisol (100 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 2,5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión

ambiente. Se favo la resina con TFA (1 x 5 min x 2,3 mi) y se anadieron las disoluciones de lavado y escision combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (78 mg, 0,14 mmol, 95%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13,01 (s, 1H), 8,32 (s, 2H), 7,89-7,82 (m, 5H), 4,28 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,58-3,50 (m, 6H), 3,38 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,00 (m, 2H), 2,65 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,59 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,09 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,42 (m, 2H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 172,5, 172,4,

164,8, 161,5, 146,4, 122,4, 70,1, 69,8, 69,6, 67,1, 49,4, 39,1, 38,8, 35,0, 35,7, 29,8, 24,8, 24,6, 22,6; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₉H₃₄N₉O₆S₂ 548,2068; encontrado 548,2071.

Síntesis de B2 (compuesto de referencia)

Se hinchó resina de carbonato de p-nitrofenilo Wang y poliestireno comercialmente disponible (500 mg, 0,3 mmol) en DMF (5 ml durante 5 min) y se hizo reaccionar con una disolución de 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dietanoamina (500 µl), DIPEA (500 µl) y DMAP (5 mg) en DMF (4 ml) durante 12 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó la resina con DMF (3 x 5 ml durante 1 min), MeOH (3 x 5 ml durante 1 min) y de nuevo DMF (3 x 5 ml durante 1 min). Se preparó

- una disolución de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (532 mg, 0,9 mmol), HBTU (341 mg, 0,9 mmol), HOBt (138 mg, 0,9 mmol) y 10 DIPEA (298 µl, 1,8 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 min y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la siguiente etapa de acoplamiento. En lo siguiente, se extendió el péptido con Fmoc-Asp(OtBu)-OH dos veces seguido por 5-azido-valerato.
- Con este fin, se preparó una disolución de ácido (1,2 mmol), HATU (465 mg, 1,2 mmol) y DIPEA (397 µl, 2,4 mmol) 15 en DMF (5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se siguió cada acoplamiento por una etapa de lavado con DMF (6 x 1 min x 5 ml) y desprotección con Fmoc tal como se describió anteriormente. Tras el acoplamiento de la azida, se preparó una disolución de Cul (76 mg, 0,12 mmol), TBTA (21 mg, 0,12 mmol) y alquino 10 (329 mg, 1,2 mmol) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con
- 20 la resina durante 48 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (4,4 ml), TIS (100 µl), H₂O (100 µl), m-cresol (200 µl) y tioanisol (200 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se disolvió en MeCN ac. y 25 se liofilizó para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (468 mg, 0,3 mmol, cuant.).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13,09 (s, 2H), 8,37 (s, 4H), 8,29-8,26 (m, 3H), 8,14 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,91 (s, 2H), 7,80-7,78 (m, 3H), 7,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,65 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,60-4,48 (m, se solapa con el pico de H₂O amplio), 4,33 (t, J = 7,0 Hz, se solapa con el pico de H₂O amplio), 4,19-4,13 (m, se solapa con el pico de H₂O amplio), 30 3,64-3,59 (m, 6H), 3,44 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,27-3,23 (m, 2H), 3,05-3,00 (m, 4H), 2,77-2,48 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,20 (t, J = 7,2 Hz, 4H), 2,04-1,96 (m, 4H), 1,86-1,78 (m, 4H), 1,74-1,63 (a m, 1H), 1,61-1,16 (a m, 9H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₅₄H₈₃N₂₂O₂₃S₄ 1535,4879; encontrado 1535,4868.

Síntesis de B3 (compuesto de referencia)

35

40

5

A éster de NHS IRDye750 (100 µg, 84 nmol) en DMSO (10 µl) y DMF (100 µl) se le añadió derivado de acetazolamida B1 (200 µg, 366 nmol) en DMSO (20 µl) y DIPEA (2 µl, 12 µmol). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h y luego se purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{max} = 750 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (50 μl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 750 nm (ε_{750} = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS pH 7.4 (640 μM, 32 nmol, 38%).

45 HRMS: (m/z) [M + 4H]⁺ calculado para C₆₈H₉₂N₁₁O₁₉S₆ 1558,4890; encontrado 1558,4844.

Síntesis de B4 (compuesto de referencia)

A éster de NHS IRDye750 (100 μg, 84 nmol) en DMSO (10 μl) y DMF (100 μl) se le añadió B2 (200 μg, 130 nmol) en DMSO (20 ul) y DIPEA (2 ul, 12 umol). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h y luego se 50 purificó directamente sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{max} = 750 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (50 µl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinaron su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la 55 absorbancia a 750 nm (ε₇₅₀ = 260.000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS pH 7,4 (287 μM, 14 nmol, 17%).

HRMS: (m/z) [M + 4H]⁺ calculado para C₁₀₃H₁₄₁N₂₄O₃₆S₈ 2545,7700; encontrado 2545,7703.

60 Rendimiento de unión mediante resonancia de plasmón superficial

Los experimentos de unión de derivados de AAZ monovalentes y bivalentes a CAIX usando resonancia de plasmón superficial indicaron una rápida asociación para ambos compuestos ($k_a = 1,48 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ y } k_{a1} = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, k_{a2}$ = 1,36×10⁶ RU⁻¹ respectivamente). Aunque el ligando monovalente B1 se disoció completamente de la superficie recubierta con CAIX en el plazo de segundos ($k_d = 0.015 \text{ s}^{-1}$, $K_d = 10.5 \text{ nM}$), el compuesto bivalente B2 no presentó

ES 2 735 348 T3

disociación aparente y sólo podía eliminarse con tratamiento con ácido fuerte (figura 1b).

Rendimiento de unión mediante citometría de flujo

- 5 Se realizó citometría de flujo tal como se describió anteriormente con conjugados de colorante en el infrarrojo cercano monovalentes y bivalentes B3 y B4 y conjugados de control negativo que carecen del ligando en células SKRC52 positivas para CAIX y células HEK negativas para CAIX⁵. Los resultados indicaron una unión clara dependiente del ligando y el receptor a células. El desplazamiento en la intensidad de fluorescencia para el conjugado bivalente B4 era más pronunciado que el observado para B3 monovalente, que es coherente con los resultados obtenidos de SPR.
- 10

Investigación in vivo del rendimiento de selección como diana

Estudios adicionales sometieron a prueba la capacidad de conjugados de colorante en el infrarrojo cercano B3 y B4 de localizar xenoinjertos de SKRC52 que expresan CAIX *in vivo*. Ambos conjugados de colorante se acumularon fuertemente en el tumor, tal como se reveló mediante obtención de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano de animales completos y mediante análisis de los órganos extraídos. Aunque el perfil de aclaramiento inicial fue comparable para ambas moléculas seleccionadas como diana, el conjugado bivalente B4 presentó una residencia significativamente más larga en el tumor. Veinticuatro horas después de la inyección, la señal de fluorescencia integrada en el tumor del conjugado bivalente B4 era del 40%, mientras que el conjugado monovalente B3 había

disminuido hasta el 14% de su valor inicial (p = 0,002; prueba de la t de dos caras no apareada; figura complementaria
 4).

Para obtener un mejor entendimiento de la captación tumoral absoluta de conjugado de colorante monovalente B3 en comparación con B4 bivalente y selectividad de tumor frente a órgano, se extrajeron los órganos, se homogeneizaron los tejidos y se midió la intensidad de fluorescencia por gramo. La comparación con una serie de dilución estándar de IRDye750 en órgano homogeneizado permitió la medición de niveles de captación absolutos en órganos, como porcentaje de dosis inyectada por gramo (% de ID g⁻¹). El conjugado de colorante bivalente B4 presentó una acumulación absoluta mayor >3 veces en tumores en comparación con B3 monovalente a las 24 h (5,3 ± 0,6 frente a 1,4 ± 0,6% de ID g⁻¹). Por tanto, el compuesto B4 se compara muy favorablemente con los anticuerpos monoclonales
recientemente descritos contra CAIX. Aunque la captación en el corazón, bazo, músculo y circulación en sangre con relación al tumor era baja (tumor: órgano > 30), se observaron razones de tumor con respecto a órgano ligeramente

relación al tumor era baja (tumor: órgano > 30), se observaron razones de tumor con respecto a órgano ligeramente inferiores para los riñones y el estómago para ambos conjugados. De manera interesante, las razones de tumor:hígado y tumor:intestino fueron menores para B3 monovalente que para B4 bivalente mientras que B4 presentó una razón de tumor:pulmón mayor que B3. 35

Síntesis de conjugados de fármaco

Se prepararon conjugados de fármaco seleccionados y no seleccionados como diana B7 y B8 que tenían las estructuras mostradas en la figura 10 tal como sigue. El compuesto B7 es un ejemplo de referencia de conjugado bivalente y tiene el mismo grupo funcional de selección como diana bivalente que B2 y B4. B8 es un ejemplo de referencia que tiene un grupo funcional similar pero sin ligandos de selección como diana de AAZ.

Síntesis de B7 (compuesto de referencia)

- 45 Se disolvieron ligador seleccionado como diana bivalente B11 (20 mg, 13 μmol), TCEP.HCl (7,6 mg, 27 μmol) y DIPEA (2 μl) en DMF desgasificada (500 μl). Tras 1 h, se añadió 2,2'-dipiridildisulfuro (11,7 mg, 53 μmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h, se diluyó con NMP (500 μl) y se añadió gota a gota a dietil éter helado (40 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se volvió a disolver en DMF (200 μl) y NMP (200 μl) y se precipitó de nuevo con dietil éter helado (40 ml) y se secó a vacío para dar el disulfuro activado como un residuo blanco (18
- 50 mg, 11 μmol, 85%). Se disolvió una alícuota del disulfuro activado (15 mg, 9 μmol) en DMF (400 μl) y se añadió tiol libre de DM1 (7 mg, 9 μmol). Se dejó la reacción en reposo a temperatura ambiente durante 48 h tras lo cual se recuperó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (9,5 mg, 4 μmol, 47%).
- 55

40

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12,98 (s, 2H), 8,31 (s, 4H), 8,22-8,15 (m, 4H), 8,07 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,85 (s, 2H), 7,69-7,59 (m, 2H), 7,12 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,61-6,52 (m, 3H), 5,92 (s a, 1H), 5,57-5,52 (m, 1H), 5,30-5,29 (m, 1H), 4,52-4,43 (m, 5H), 4,39-4,34 (m, 1H), 4,27 (t, *J* = 6,9 Hz, 4H), 4,19-4,16 (m, 1H), 4,08-4,03 (m, 1H), 3,92-3,90 (m, 3H), 3,53-2,41 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,13-2,12 (m, 4H), 2,04-2,01 (m, 1H), 1,97-1,91 (m, 4H), 1,79-1,73 (m, 4H), 1,67-1,54 (m, 4H), 1,51-1,10 (m, 21H), 0,77 (s, 3H);

HRMS: $(m/z) [M + 2H]^{2+}$ calculado para $C_{86}H_{119}CIN_{24}O_{33}S_6$ 1122,3270; encontrado 1122,3279.

Síntesis de B8 (compuesto de referencia)

Se disolvieron ligador no seleccionado como diana bivalente B12 (20 mg, 17 µmol), TCEP.HCl (19 mg, 68 µmol) y DIPEA (10 µl) en DMF desgasificada (1 ml). Tras 1 h, se añadió 2,2'-dipiridildisulfuro (22 mg, 100 µmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 h, se diluyó con NMP (500 μl) y se añadió gota a gota a dietil éter helado (40 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación, se volvió a disolver en DMF (200 µl) y NMP (200 µl) y se

- precipitó de nuevo con dietil éter helado (40 ml) y se secó a vacío para dar el disulfuro activado como un residuo 5 blanco (45 mg, producto + productos secundarios). Se disolvió una alícuota del residuo (15 mg) en DMF (400 µl) y se añadió tiol libre de DM1 (7 mg, 9 µmol). Se dejó la reacción en reposo a temperatura ambiente durante 48 h tras lo cual se recuperó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Se agruparon fracciones que contenían el producto deseado mediante EM y se 10 liofilizaron para dar el compuesto del título como un polvo blanquecino (7,4 mg, 3,9 µmol, 42%).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,22-8,09 (m, 5H), 7,83 (s, 2H), 7,64-7,58 (m, 2H), 7,12 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,61-6,52 (m, 3H), 5,93 (s, 1H), 5,55 (dd, J = 9,1, 14,8 Hz, 1H), 5,32-5,28 (m, 1H), 4,56-4,43 (m, 6H), 4,27 (t, J = 6,85 Hz, 4H), 4,20-4,17 (m, 1H), 4,05 (t, J = 12,2 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,49-2,41 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,25 (t, J = 7,4 Hz, 4H), 2,15 (m, 4H), 2,04-2,02 (a m, 1H), 1,80-1,73 (m, 8H), 1,62-1,10 m, 24H), 0,77 (s, 3H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₈₂H₁₁₆ClN₁₆O₃₁S₂ 1919,7117; encontrado 1919,7098.

Síntesis de B9 (compuesto de referencia)



20

25

15

Se hinchó resina de carbonato de p-nitrofenilo Wang y poliestireno comercialmente disponible (250 mg, 0,15 mmol) se hinchó en DMF (5 ml durante 5 min) y se hizo reaccionar con una disolución de 2,2'-(etano-1,2diilbis(oxi))dietanoamina (250 µl), DIPEA (500 µl) y DMAP (2,5 mg) en DMF (4,5 ml) durante 12 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó la resina con DMF (3 x 5 ml durante 1 min), MeOH (3 x 5 ml durante 1 min) y de nuevo DMF (3 x 5 ml durante 1 min). Se preparó una disolución de ácido 5-azido valérico (65 mg, 0,45 mmol), HATU (171 mg, 0,45 mmol) y DIPEA (148 µl, 0,9 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se preparó una disolución de Cul (2,9 mg, 0,015 mmol), TBTA (8 mg, 0,015 mmol) y ácido 5-hexinoico (51 mg, 50 µl, 0,45 mmol) en una mezcla de DMF (1 ml)

- y THF (1 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 24 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min 30 x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (2,2 ml), TIS (50 µl), H₂O (50 µl), m-cresol (100 µl) y tioanisol (100 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 2,5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado
- 35 mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (21 mg, 54 µmol, 36%).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 7,90-7,86 (m, 5H), 4,29 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,60-3,51 (m, 6H), 3,40 (t, J = 6,1) 40 Hz, 2H), 3.20 (a, J = 5.8 Hz, 2H), 3.00-2.96 (m, 2H), 2.62 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.26 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.10 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1,85-1,74 (m, 4H), 1,46-1,42 (m, 2H); ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 174,8, 172,4, 146,7, 122,3, 70,1, 69,8, 69,5, 67,2, 49,4, 39,0, 38,9, 35,0, 33,6, 29,8, 24,9, 24,8, 22,7; HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₁₇H₃₂N₅O₅ 386,2398; encontrado 386,2403.

45 Síntesis de B10 (compuesto de referencia)



ES 2 735 348 T3

Se hinchó resina de carbonato de *p*-nitrofenilo Wang y poliestireno comercialmente disponible (500 mg, 0,3 mmol) se hinchó en DMF (5 ml durante 5 min) y se hizo reaccionar con una disolución de 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dietanoamina (500 µl), DIPEA (500 µl) y DMAP (5 mg) en DMF (4 ml) durante 12 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó

- 5 la resina con DMF (3 x 5 ml durante 1 min), MeOH (3 x 5 ml durante 1 min) y de nuevo DMF (3 x 5 ml durante 1 min). Se preparó una disolución de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (532 mg, 0,9 mmol), HBTU (341 mg, 0,9 mmol), HOBt (138 mg, 0,9 mmol) y DIPEA (298 μl, 1,8 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml) y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la
- siguiente etapa de acoplamiento. En lo siguiente, se extendió el péptido con Fmoc-Asp(OtBu)-OH dos veces seguido por 5-azido-valerato. Con este fin, se preparó una disolución de ácido (1,2 mmol), HATU (465 mg, 1,2 mmol) y DIPEA (397 µl, 2,4 mmol) en DMF (5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se siguió cada acoplamiento por una etapa de lavado con DMF (6 x 1 min x 5 ml) y desprotección con Fmoc tal como se describió anteriormente. Tras el acoplamiento de la azida, se preparó una disolución de Cul (76 mg, 0,12
- 15 mmol), TBTA (21 mg, 0,12 mmol) y ácido 5-hexionico (440 μl, 1,2 mmol) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 48 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA (4,4 ml), TIS (100 μl), H₂O (100 μl), m-cresol (200 μl) y tioanisol (200 μl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las
- 20 disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (64 mg, 53 μmol 17%).
- 25 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,25-8,22 (m, 3H), 8,09 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,85 (s, 2H), 7,78-7,73 (a m, 3H), 7,66 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,59 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 4,55-4,44 (m, 4H), 4,29 (t, J = 7,0 Hz, 4H), 4,14-4,09 (m, 2H), 3,60-3,55 (m, 6H), 3,40 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,22-3,19 (m, 2H), 3,01-2,92 (m, 4H), 2,73-2,44 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,26 (t, J = 7,4 Hz, 4H), 2,15 (t, J = 7,2 Hz, 4H), 1,85-1,74 (m, 7H), 1,70-1,60 (a m, 1H), 1,55-1,14 (a m, 9H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₅₀H₇₉N₁₄O₂₁ 1211,5539; encontrado 1211,5515.
- 30

Síntesis de B11 (compuesto de referencia)



- 35 Se hinchó Fmoc-Cys(Trt) precargado comercialmente disponible en resina Tentagel (500 mg, 0,415 mmol, RAPP polymere) en DMF (3 x 5 min x 5 ml), se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml). Se preparó una disolución de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (736 mg, 1,25 mmol), HBTU (472 mg, 1,25 mmol), HOBt (191 mg, 1,25 mmol) y DIPEA (412 μl, 2,5 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 40 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 min y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la siguiente etapa de acoplamiento. En lo siguiente, se extendió el péptido con Fmoc-Asp(OtBu)-OH dos veces seguido por 5-azido-valerato. Con este fin, se preparó una disolución de ácido (1,7 mmol), HATU (643 mg, 1,7 mmol) y DIPEA (549 µl, 3,3 mmol) en DMF (5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se siguió cada acoplamiento por 45 una etapa de lavado con DMF (6 x 1 min x 5 ml) y desprotección con Fmoc tal como se describió anteriormente. Tras el acoplamiento de la azida, se preparó una disolución de Cul (106 mg, 0,17 mmol), TBTA (29 mg, 0,17 mmol) y alquino 10 (455 mg, 1,7 mmol) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 48 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml) y DCM (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una
- 50 mezcla de TFA (4,4 ml), TIS (100 μl), H₂O (100 μl), m-cresol (200 μl) y tioanisol (200 μl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (68 mg, 45 μmol, 10%).
- 55

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13,01 (s, 2H), 8,32 (s, 4H), 8,21 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 8,09 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,87 (s, 2H), 7,74 (d, *J* = 7,84 Hz, 1H), 7,61 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,55-4,45 (m, se solapa con el

pico de agua amplio), 4,40-4,34 (m, se solapa con el pico de agua amplio), 4,29 (t, J = 7,0 Hz, se solapa con el pico de agua amplio), 4,24-4,22 (m, se solapa con el pico de agua amplio), 3,07-2,94 (a m, 2H), 2,90-2,41 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,15 (t, J = 7,1 Hz, 4H), 1,99-1,92 (m, 4H), 1,82-1,74 (m, 4H), 1,71-1,24 (a m, 10H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₅₁H₇₄N₂₁O₂₃S₅ 1508,3864; encontrado 1508,3861.

Síntesis de B12 (compuesto de referencia)



- Se hinchó Fmoc-Cys(Trt) precargado comercialmente disponible en resina Tentagel (500 mg, 0,415 mmol, RAPP polymere) en DMF (3 x 5 min x 5 ml), se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml y 2 x 10 min x 5 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml). Se preparó una disolución de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (736 mg, 1,25 mmol), HBTU (472 mg, 1,25 mmol), HOBt (191 mg, 1,25 mmol) y DIPEA (412 μl, 2,5 mmol) y se hizo reaccionar inmediatamente con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 5 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 1 min x 5 ml) y se lavó
- la resina con DMF (6 x 1 min x 5 ml) antes de que se iniciara la siguiente etapa de acoplamiento. En lo siguiente, se extendió el péptido con Fmoc-Asp(OtBu)-OH dos veces seguido por 5-azido-valerato. Con este fin, se preparó una disolución de ácido (1,7 mmol), HATU (643 mg, 1,7 mmol) y DIPEA (549 μl, 3,3 mmol) en DMF (5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se siguió cada acoplamiento por
- 20 una etapa de lavado con DMF (6 x 1 min x 5 ml) y desprotección con Fmoc tal como se describió anteriormente. Tras el acoplamiento de la azida, se preparó una disolución de Cul (106 mg, 0,17 mmol), TBTA (29 mg, 0,17 mmol y ácido 5-hexionico (609 μl, 1,7 mmol) en una mezcla de DMF (2,5 ml) y THF (2,5 ml) y se hizo reaccionar con la resina durante 48 h a temperatura ambiente. Tras lavar con DMF (3 x 1 min x 5 ml), disolución de EDTA ac. 50 mM (3 x 1 min x 5 ml), DMF (3 x 1 min x 5 ml), se escindió el compuesto agitando la resina con una mezcla de TFA
- (4,4 ml), TIS (100 μl), H₂O (100 μl), m-cresol (200 μl) y tioanisol (200 μl) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con TFA (1 x 5 min x 5 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (100 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 20 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (147 mg, 0,12 mmol, 30%).
- 30

35

5

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8,22-8,19 (m, 3H), 8,08 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,83 (s, 2H), 7,72 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,59-7,56 (m, 1H), 4,56-4,43 (m, 3H), 4,37-4,34 (m, 1H), 4,27-4,20 (m, 4H), 3,03-2,92 (m, 2H), 2,87-2,39 (m, se solapa con el pico del disolvente), 2,25 (t, *J* = 7,35 Hz, 4H), 2,13 (t, *J* = 7,0 Hz, 4H), 1,83-1,21 (a m, 16H); HRMS: (m/z) [M + H]⁺ calculado para C₄₇H₇₀N₁₃O₂₁S 1184,4524; encontrado 1184,4508.

Propiedades de conjugados de fármaco

Tanto el fármaco seleccionado como diana B7 como no seleccionado como diana B8 fueron igualmente tóxicos in vitro. Si se internalizaran conjugados de manera dependiente del receptor y se activaran a nivel intracelular, se esperaría que el conjugado seleccionado como diana B7 se acumulase en células que expresan CAIX y fuera más 40 tóxico que el fármaco no seleccionado como diana B8. Este no parece ser el caso. Por tanto, los presentes han planteado la hipótesis de que el conjugado se acumularía en el sitio tumoral, donde los agentes reductores (por ejemplo, glutatión liberado de células moribundas) escindirían el enlace disulfuro en el espacio extracelular y conducirían a liberación de fármaco. Entonces DM1 se difundiría en células adyacentes para actuar sobre su diana 45 intracelular. Se llevó a cabo un estudio de hallazgo con dosis preliminares con el conjugado B7. Incluso una dosis tan baja como 6 nmol en 8 días consecutivos condujo a una reducción del volumen tumoral sustancial. Cinco dosis de 48 nmol en el plazo de seis días erradicaron completamente el tumor pero mostraron algo de toxicidad. Finalmente, se usó un programa terapéutico de 35 nmol en 8 días consecutivos, que era bien tolerado en ratones que tenían un tumor SKRC52 (figura 11). El 12º día tras el inicio del tratamiento, dos ratones carecían de tumores y el volumen tumoral 50 promedio para todos los ratones había descendido desde un volumen tumoral inicial de 200 mm³ hasta por debajo de 50 mm³. Los dos ratones con regresión completa y uno del estudio de aumento de la dosis carecían de tumores 90 días después del inicio de la terapia y, por tanto, se consideraron curados. Los tumores restantes volvieron a crecer. De manera importante, los conjugados de control que carecen del ligando de selección como diana, o grupo funcional bivalente B2 sin la carga útil no tuvieron un efecto antitumoral estadísticamente significativo.

55

(C) Restos de unión mediante examen de una biblioteca codificada por ADN

Las tecnologías químicas para el descubrimiento de aglutinantes proteicos de alta afinidad proporcionan técnicas para ir más allá de los ligandos que se producen de manera natural para aplicaciones que seleccionan enfermedades como

ES 2 735 348 T3

diana. Pueden construirse y examinarse bibliotecas químicas combinatorias de tamaño sin precedentes etiquetando moléculas orgánicas con fragmentos de ADN, que sirven como códigos de barras de identificación amplificables [grupo Liu; grupo Neri]. Pueden sintetizarse bibliotecas químicas codificadas por ADN, postuladas en primer lugar por Lerner y Brenner [REF], con uno o dos conjuntos de moléculas presentadas en las extremidades de hebras de ADN complementarias, produciendo bibliotecas químicas de uno o dos farmacóforos, respectivamente.

Los presentes inventores han estudiado una biblioteca química de autoensamblaje codificada por ADN (ESAC) novedosa, que contiene 111.100 moléculas pequeñas con el fin de identificar un nuevo resto de unión bivalente para CAIX.

Síntesis de biblioteca química de autoensamblaje codificada por ADN (ESAC)

Se sintetizó una biblioteca ESAC de dos farmacóforos de 111.100 compuestos usando una estrategia química novedosa que permite la identificación basada en secuencias y cuantificación de miembros de biblioteca. Se construyó
la biblioteca química de autoensamblaje codificada (ESAC) hibridando dos sub-bibliotecas de cadenas sencillas purificadas y sintetizadas individualmente A y B. Los compuestos químicos que portan un ácido carboxílico, anhídrido, éster de N-hidroxisuccinimida o grupos isotiocianato se acoplaron al grupo amino primario en el extremo 5' (sub-biblioteca A) o extremo 3' (sub-biblioteca B) de oligonucleótidos modificados para producir la biblioteca tal como se muestra en la figura 13.

u Síntesis de

5

10

Síntesis de la sub-biblioteca A.

La síntesis de la sub-biblioteca codificada por ADN A de 550 compuestos la ha descrito Dumelin, C.E., Scheuermann, J., Melkko, S. & Neri, D. en Bioconjugate chemistry 17, 366-370 (2006). En resumen, se hicieron reaccionar oligonucleótidos de 48 meros (IBA GmbH) que portan un grupo amino libre en el extremo 5' (ω-diéster de fosfato de aminohexilo) con elementos estructurales que contienen isotiocianato, cloruro de sulfonilo o ácido carboxílico activado para dar los correspondientes conjugados de amina, sulfonamida y tiourea. Las secuencias de oligonucleótido siguieron el patrón 5'-GGA GCT TCT GAA TTC TGT GTG CTG XXX XXX CGA GTC CCA TGG CGC AGC-3', en donde XXX XXX representa la secuencia codificante (6 nucleótidos) que identifica inequívocamente cada miembro de biblioteca individual.

Síntesis de la sub-biblioteca B.

Se construyó la sub-biblioteca B usando oligonucleótidos modificados en 3'-amino de 41 meros, que se acoplaron
 elementos estructurales de cloruro de sulfonilo, anhídrido de ácido carboxílico, ácido carboxílico y aminoácido protegido con Fmoc activado para dar los correspondientes conjugados de amida o sulfonamida. Todos los compuestos de biblioteca se acoplaron inicialmente al mismo oligonucleótido de la secuencia 5'-CAT GGG ACT CG
 ddd ddd CAG CAC ACA GAA TTC AGA AGC TCC-3' (IBA GmbH), que se diseñó para ser complementaria a los oligonucleótidos de la sub-biblioteca A y contenía una región espaciadora abásica de 6 nucleótidos (d, desoxiabásica), que permite formación de dúplex prolífica con la región codificante de la sub-biblioteca.

Conjugación de ácidos carboxílicos y aminoácidos protegidos con Fmoc con oligonucleótido de la sub-biblioteca B con 3'-amino modificado:

- 45 Se añadieron ácidos carboxílicos o aminoácidos protegidos con Fmoc en dimetilsulfóxido (DMSO, 12,5 μl, 100 mM), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en DMSO (12 μl, 100 mM), *N*-hidroxisulfosuccinimida (S-NHS) en DMSO/ H₂O 2:1, (10 μl, 333 mM) a DMSO (215 μl) y se dejaron en reposo a 30°C durante 30 min. Posteriormente, se añadió una mezcla de oligonucleótido de la sub-biblioteca B con amino modificado en H₂O (5 μl, 5 nmol) y clorhidrato de trietilamina en H₂O (TEA • HCl, 50 μl 500 mM, pH 10,0) y se mantuvo la reacción a 30°C durante 12 h. Se
- 50 extinguieron reacciones de conjugación de ácido carboxílico con clorhidrato de tris(hidroxilmetil)aminometano en H₂O (Tris HCl, 20 μl, 500 mM, pH 8,1) a 30°C durante 1 h. Se extinguieron reacciones de conjugación de aminoácidos protegidos con Fmoc y se desprotegieron con Tris en H₂O (5 μl, 1 M) y TEA (5 μl) a 30°C durante 1 h. Tras la extinción y desprotección, se precipitó el conjugado del compuesto de ADN con EtOH antes de la purificación mediante HPLC. Se secaron a vacío durante la noche los conjugados de oligonucleótido-compuesto separados y recogidos, se volvieron a disolver en H₂O (100 μl), y se analizaron mediante ESI-CL-EM31.

Conjugación de cloruros de sulfonilo con oligonucleótido de la sub-biblioteca B con 3'-amino modificado:

 Se mezclaron cloruros de sulfonilo en acetonitrilo (MeCN, 25 μl, 100 mM) con hidrogenocarbonato de sodio en H₂O
 (25 μl, 1 M, pH 9,0), MeCN (100 μl), H₂O (95 μl) y se hicieron reaccionar posteriormente con oligonucleótido de la subbiblioteca B con amino modificado en H₂O (5 μl, 5 nmol) a 30°C durante 12 h. Se extinguió la reacción con Tris • HCl
 (20 μl, 500 mM, pH 8,1) a 30°C durante 1 h. Tras la extinción, se precipitó el conjugado del compuesto de ADN con EtOH antes de la purificación mediante HPLC. Se secaron a vacío durante la noche los conjugados de oligonucleótidocompuesto separados y recogidos, se volvieron a disolver en H₂O (100 μl), y se analizaron mediante ESI-CL-EM. Se

65 secaron a vacío los conjugados de oligonucleótido-compuesto separados y recogidos durante la noche, se volvieron

a disolver en H₂O (100 µl), y se analizaron mediante ESI-CL-EM.

Conjugación de anhídridos de ácido carboxílico con oligonucleótido de la sub-biblioteca B con 3'-amino modificado:

- Se mezclaron anhídridos de ácido carboxílico en DMSO (25 μl, 100 mM) con hidrogenofosfato de sodio en H₂O (25 μl, 500 mM, pH 7,1), DMSO (195 μl), H₂O (35 μl) y se hicieron reaccionar posteriormente con oligonucleótido de la subbiblioteca B con amino modificado en H₂O (5 μl, 5 nmol) durante la noche a 30°C. Se extinguió la reacción con Tris HCI (20 μl, 500 mM, pH 8,1) a 30°C durante 1 h. Tras la extinción, se precipitó el conjugado del compuesto de ADN con EtOH antes de la purificación mediante HPLC31. Se secaron a vacío durante la noche los conjugados de oligonucleótido-compuesto separados y recogidos, se volvieron a disolver en H₂O (100 μl), y se analizaron mediante ESI-CL-EM.
- Para marcar inequívocamente miembros de biblioteca en la sub-biblioteca B, se extendieron conjugados de oligonucleótido-compuesto individuales con una secuencia identificadora única. Con este fin, se usaron 202 oligonucleótidos de código de 39 meros de secuencia 5'-CCT GCA TCG AAT GGA TCC GTG XXX XXX GCA GCT GCG C-3' (IBA GmbH), donde XXX XXX denota una región de código de 8 dígitos. Se ligaron los 202 conjugados de oligonucleótido-compuesto purificados por HPLC con estos oligonucleótidos codificantes con la ayuda de un oligonucleótido adaptador quimérico (ADN/ARN) (5'-CGA GTC CCA TGG CGC AGC TGC-3', en negrita: porciones de ARN), que es complementario a ambos, los conjugados de oligonucleótido-compuesto de la sub-biblioteca B. Finalmente, se eliminó el oligonucleótido adaptador mediante
- tratamiento con ARNasa H (New England Biolabs).

Protocolo de ligación: se mezclaron conjugado de oligonucleótido-compuesto de la sub-biblioteca B en H₂O (50 μl, 2 μM), oligonucleótido de código de la sub-biblioteca B en H₂O (10 μl, 15 μM), oligonucleótido adaptador de ARN/AND
quimérico de la sub-biblioteca B en H₂O (10 μl, 30 μM), tampón de reacción de ligación 10x (10 μl, New England Biolabs) y H₂O (19,5 μl) y se calentaron hasta 90°C durante 2 min antes de que se dejara enfriar la mezcla hasta 22°C. Se añadió ligasa de ADN T4 (0,5 μl, New England Biolabs) y se realizó ligación a 16°C durante 10 horas antes de inactivar la ligasa a 70°C durante 15 min.

30 Hibridación de biblioteca y transferencia de código a la hebra de la sub-biblioteca A.

Para obtener la biblioteca final, se hibridaron en primer lugar las sub-bibliotecas A y B, dando como resultado una colección de dúplex combinatoria, en donde cada miembro de la sub-biblioteca A podía emparejarse con cada miembro de la sub-biblioteca B. Para la identificación inequívoca de cualquier combinación de farmacóforo dual

- 35 mediante secuenciación de alto rendimiento, la información de codificación para A y B ha de proporcionarse en la misma hebra de ADN. Esto se logró mediante una extensión de la hebra de la sub-biblioteca A asistida por polimerasa Klenow de los heterodúplex A/B, que transfirió la información de codificación de la hebra de la sub-biblioteca B a la hebra de la sub-biblioteca A. Protocolo de hibridación y codificación de Klenow: se mezclaron la sub-biblioteca A en H₂O (115 µl, mezcla equimolar de todos los miembros de biblioteca, concentración total 864 nM), y sub-biblioteca B
- 40 en H₂O (100 μl, mezcla equimolar de todos los miembros de biblioteca, concentración total 1 μM), tampón de reacción NEB₂ 10x (100 μl, New England Biolabs) y H₂O (685 μl) y se calentaron hasta 90°C durante 2 min, luego se enfriaron hasta 22°C. Se purificó la biblioteca hibridada con columnas de eliminación de nucleótidos (Qiagen, elución con 6 x 140 μl de tampón EB de Qiagen en seis columnas separadas). Para la codificación de Klenow, se mezclaron biblioteca ESAC hibridada y purificada en tampón EB (800 μl), tampón de reacción NEB₂ 10x (100 μl, New England Biolabs),
- 45 mezcla de disolución de desoxinucleótidos (dNTP) (100 μl, 500 μM, concentración final 50 μM, New England Biolabs) y fragmento Klenow (10 μl, New England Biolabs) y se incubaron a 37°C durante 30 min.

Clonación, expresión y biotinilación de CAIX.

50 Se clonó CAIX humana etiquetada con His6 recombinante y se expresó tal como se describe por J.K. Ahlskog *et al.* en British Journal of Cancer 101, 645-657 (2009). La proteína se biotiniló químicamente con NHS-biotina EZ-Link (Thermo Scientific) para examen de afinidad según instrucciones del proveedor.

Examen de afinidad de la biblioteca ESAC frente a CAIX.

55 Se realizaron selecciones de afinidad usando un procesador de partículas magnéticas KingFisher (Thermo Scientific). Se resuspendieron perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (0,1 mg) en PBS (100 μl, NaPi 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se incubaron posteriormente con CAIX biotinilada (100 μl, concentración de 0,1 μM o 1,0 μM) durante 30 min con mezclado suave continuo. Se lavaron perlas recubiertas con CAIX tres veces con PBST (200 μl, NaPi 50 μl, NaPi 50

60 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0,05% v/v, pH 7,4) que se complementó con biotina (100 μM) con el fin de bloquear sitios de unión restantes en estreptavidina, y se incubaron posteriormente con la biblioteca ESAC (100 μl, concentración total de 100 nM, en PBST) durante 1 h con mezclado suave continuo. Tras retirar miembros de biblioteca no unidos lavando cinco veces con PBST (200 μl), se resuspendieron perlas que portan miembros de biblioteca unidos en tampón EB (100 μl, kit de purificación mediante PCR QIAquick, Qiagen) y se separaron los conjugados de ADN- compuesto de las perlas mediante desnaturalización térmica de estreptavidina y CAIX (95°C durante 5 min). Se amplificó el ADN de los miembros de biblioteca eluidos mediante PCR, introduciendo al mismo tiempo códigos de barras de ADN específicos de la selección adicionales, y se sometió a secuenciación de ADN de alto rendimiento Illumina®.

5

En múltiples experimentos de selección, se encontró que el par de farmacofóros A-493/B-202 estaba muy enriquecido (figura 14), en comparación con la biblioteca no seleccionada y con los demás miembros de biblioteca tras selección de CAIX (enriquecimiento de >200 veces):



10

Estudios de unión in vitro

- Se conjugaron en primer lugar A-493 y B-202 con ácidos nucleicos bloqueados con amino modificado complementarios de 8 meros marcados fluorescentemente (LNA[™]), se dejó que formaran una estructura de heterodúplex y se sometieron a mediciones de afinidad de polarización de fluorescencia frente a CAIX. Se realizaron mediciones de polarización de fluorescencia (FP) incubando sonda marcada fluorescentemente 5 nM y anhidrasa carbónica humana recombinante IX con concentraciones crecientes durante 1 h a 22°C. Se midió la FP en un lector de placas de modo múltiple Spectra Max Paradigm (Molecular Devices). En LNA[™], la combinación A-493/B-202 reveló una constante de
- disociación de 14,6 \pm 0,7 nM, mientras que B-202 (acetazolamida) solo tuvo una K_d de 34,9 \pm 0,9 nM.

Síntesis de ligandos de CAIX de referencia con y sin fluoróforos

- 25 A continuación, se sintetizaron compuestos químicos unidos que tenían restos de unión con y sin fluoróforos que tenían las estructuras mostradas en la figura 16 usando procedimientos de acoplamiento en fase sólida convencionales usando diversos espaciadores, que contienen un sitio de modificación para una conjugación de fluoróforo opcional. Se realizaron síntesis representativas (compuestos C5a y C5c) tal como sigue.
- 30 <u>N-[4,4-bis(4-hidroxifenil)pentanoil]-β-aspartil-β-aspartil-N-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil}-6-(4-{4-oxo-4-[(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]butil}-1H-1,2,3-triazol-1-il)-L-norleucinamida (C5a)</u>

En primer lugar se hinchó O-bis-(aminoetil)etilenglicol precargado comercialmente disponible en resina de tritilo (200 mg, 0,12 mmol) en DCM (3 x 5 min x 2 ml) y luego en DMF (3 x 5 min x 2 ml). Se disolvieron azidolisina protegida con Fmoc (142 mg, 0,36 mmol), HBTU (137 mg, 0,36 mmol), HOBt·H₂O (55 mg, 0,36 mmol) y DIPEA (119 μ l, 0,72 mmol) en DMF (2 ml), se dejó reposar la mezcla a 22°C durante 15 min y luego se hicieron reaccionar con la resina durante 1 h con agitación suave. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 2 ml) se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 x 2 min x 2 ml y 2 x 10 min x 2 ml) y se lavó la resina con DMF (6 x 1 min x 2 ml) antes de que se extendiera el péptido 2x con éster α -terc-butílico de ácido N- α -Fmoc-L-aspártico (148 mg, 0,36 mmol) y ácido 4,4-bis(4-

- 40 hidroxifenil)valérico (103 mg, 0,36 mmol) en el orden indicado usando las mismas condiciones de acoplamiento (HBTU/HOBt·H₂O/DIPEA) y desprotección de Fmoc (el 20% de piperidina en DMF) mencionadas anteriormente. Después de la última etapa de acoplamiento de péptidos, se preparó una disolución de Cul (2,3 mg, 0,01 mmol), TBTA (6,4 mg, 0,01 mmol) y alquino 10 (99 mg, 0,36 mmol) en una mezcla de DMF (1 ml) y THF (1 ml) y se hizo reaccionar con la resina a 22°C durante 2 h. Tras lavar con DMF (6 x 1 min x 2 ml), se escindió el compuesto agitando la resina
- 45 con una mezcla de TFA (4,5 ml), TIPS (250 μl) y H₂O (250 μl) a 22°C durante 2 h. Se lavó la resina con TFA (1 x 5min x 2 ml) y se añadieron las disoluciones de lavado y escisión combinadas gota a gota a dietil éter helado (50 ml). Se recogió el precipitado mediante centrifugación y se purificó el producto mediante HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 20% de A / el 80% de B a lo largo de 30 min). Tras la liofilización, se recogió el compuesto del título como un polvo blanco (49 mg, 46 μmol, el 38% de rendimiento).
- 50

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 13,01 (*s*, 1H), 9,19 (a. *s*, 2H), 8,33 (*s*, 2H), 8,19 (*d*, *J* = 8,0, 1H), 8,09 (*d*, *J* = 7,9, 1H) 7,91 (*d*, *J* = 8,1, 1H), 7,88 (*t*, *J* = 6,0, 1H), 7,84 (*s*, 1H), 7,79 (a. *s*, 3H), 6,92 (*d*, *J* = 8,4, 4H), 6,64 (*d*, *J* = 8,4, 4H), 4,54

- 4,44 (*m*, 2H), 4,24 (*t*, *J* = 7,2, 2H), 4,17 (*td*, *J* = 8,3, 5,5, 1H), 3,58 (*t*, *J* = 5,3, 2H), 3,56 - 3,50 (*m*,4H), 3,38 (*t*, *J* = 6,1, 2H), 3,24 - 3,15 (*m*, 2H), 2,97 (sext, *J* = 5,6, 2H), 2,65 (*t*, *J* = 7,5, 2H), 2,64 - 2,55 (*m*, 4H), 2,51 - 2,41 (*m*, 2H), 2,17 (*t*, *J* = 8,2, 2H) 1,94 (quin, *J* = 7,5, 2H), 1,88 - 1,82 (*m*, 2H), 1,75 (quin, *J* = 7,5, 2H), 1,66 - 1,60 (*m*, 1H), 1,53 - 1,46 (*m*, 1H), 1,45 (*s*, 3H), 1,28 - 1,17 (*m*, 2H). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-d₆): δ 172,84, 172,79, 172,30, 172,04, 171,62, 169,19, 169,09, 164,33, 161,09, 154,96, 146,06, 139,65, 139,58, 127,81, 121,84, 114,68, 69,68, 69,46, 68,85, 66,70, 52,34, 49,08, 48,70, 43,86, 38,70, 38,53, 37,14, 36,95, 36,75, 34,27, 31,36, 31,27, 29,44, 27,39, 24,42, 24,23, 22,28.

 $\frac{N-[4,4-bis(4-hidroxifenil)pentanoil]-\beta-aspartil-\beta-aspartil-N-[2-(2-{2-[(5-{4-[(6E)-6-{(2E)-2-[3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-iliden]etiloideno}-2-{(E)-2-[3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-sulfobutil)-3H-indolio-2-il]etenil}ciclohex-1-en-1-il]fenil}pentanoil)amino]etoxi}etoxi)etil]-6-(4-{4-oxo-4-[(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]butil}-1H-1,2,3-triazol-1-il}-L-norleucinamida (C5c)}$

HRMS (ESI): *m/z* calculado para C₄₅H₆₃N₁₂O₁₅S₂ [M + H]⁺: 1075,3972; encontrado: 1075,3966.

A C5a (161 μg, 150 nmol) en DMSO (16,1 μl) se le añadió éster de NHS IRDye® 750 (99 μg, 83 nmol) en DMSO (10 μl) seguido por DMF (100 μl) y DIPEA (2 μl, 12 μmol). Se agitó la disolución a 22°C durante 2 h y luego se extinguió con hidrogenocarbonato de sodio (100 μl, 100 mM, pH 8,0) antes de purificar sobre HPLC de fase inversa (el 95% de A / el 5% de B con respecto al 40% de A / el 60% de B a lo largo de 30 min). Se identificaron fracciones que contenían conjugado de colorante a través de su espectro de UV/VIS característico (λ_{máx} = 756 nm), se agruparon, se liofilizaron y se disolvieron en DMSO (50 μl) para dar una disolución de reserva verde oscuro. Se determinó su concentración y el rendimiento de reacción midiendo la absorbancia a 756 nm (ε₇₅₆ = 260'000 M⁻¹ cm⁻¹) de muestras de reserva diluidas 1:200 en PBS (pH 7,4): 1,00 mM, 50 nmol, 60% de rendimiento. HRMS (MALDI/ESI dual): *m/z* calculado para

 $C_{94}H_{121}N_{14}O_{28}S_6$ [*M*+]: 2085,6793; encontrado: 2085,6793. Las afinidades de unión de los compuestos de síntesis de la figura 16 se caracterizaron entonces mediante polarización

25 de fluorescencia y mediante resonancia de plasmón superficial, tal como sigue.

Determinación de afinidad de ligandos de CAIX mediante mediciones de polarización de fluorescencia (FP).

- Se incubaron ligandos marcados con fluoresceína (5 nM diluido con PBS de reservas de DMSO, contenido de DMSO
 final ajustado al 0,001%) a 22°C durante 1 h en una placa negra de 384 pocillos (Greiner, sin unión) en PBS (pH 7,4)
 con concentraciones crecientes de CAIX hasta un volumen final de 60 µl. Se midió la anisotropía de fluorescencia en un lector de placas de modo múltiple Spectra Max Paradigm (Molecular Devices). Se realizaron experimentos por triplicado y se ajustaron los valores de anisotropía medios a la siguiente ecuación usando KaleidaGraph 4.1.3 (Synergy Software),
- 35

40

5

$$A = \frac{1}{2} \left\{ \left([P]_0 + [L]_0 + K_D \right) - \sqrt{\left([P]_0 + [L]_0 + K_D \right)^2 - 4[P]_0 [L]_0} \right\}$$

en donde A es la anisotropía, $[P]_0$ la concentración de proteínas total, $[L]_0$ la concentración total del ligando marcado fluorescentemente y K_D la constante de disociación.

Determinación de afinidad de ligandos de CAIX mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR).

Se llevaron a cabo experimentos de resonancia de plasmón superficial a temperatura ambiente (25°C) usando un instrumento Biacore™ T200 y chips CM5 (GE Healthcare). Para todas las mediciones, se usó un tampón PBS (pH

7,4) que contenía DMSO (5% v/v) y tensioactivo P20 (0,05% v/v, GE Healthcare). Se inmovilizó la proteína CAIX sobre el chip a aproximadamente 3.000 unidades de respuesta usando EDC • HCl y NHS tal como describe el fabricante del instrumento. Se usaron diluciones en serie de compuestos no marcados (de 0,08 nM a 620 nM en etapas de 1/2) como analitos. Después de cada ciclo, se regeneró la superficie del sensor mediante un tratamiento corto con DMSO (50% v/v) en H₂O. Los sensorgramas se corrigieron con disolvente y se analizó la cinética de unión con el software de evaluación Biacore™ T200 (versión 2.0) usando un modo de unión Langmuir 1:1.

Los mejores aglutinantes presentaron un resto de Asp-Asp en el ligador (C5a y C5b) y un valor de K_d de 0,2 ± 0,1 nM mediante polarización de fluorescencia en disolución. Las mediciones de SPR dieron constantes de disociación ligeramente mayores. El mejor aglutinante parecía ser uno con el ligador más largo.

55

60

Las propiedades de unión del mejor conjugado de A-493/B-202 se estudiaron además en células de cáncer de riñón humano SK-RC-52 mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Con estos fines, se reemplazó el resto de fluoresceína con un colorante fluorescente en el infrarrojo cercano (IRDye® 750). Se usaron compuestos que carecían del resto B o ambos restos A/B como controles en el experimento.

Cultivo celular.

Se mantuvieron células SK-RC-52 y HEK en medio RPMI (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal (10%

v/v, FCS, Life Technologies) y antibiótico-antimicótico (AA, Life Technologies) a 37°C y el 5% de CO₂. Para el pase, se separaron células usando tripsina-EDTA al 0,05 % (Life Technologies) cuando se alcanza el 90% de confluencia y se volvieron a sembrar a una dilución de 1:10.

5 <u>Análisis de unión a ligando mediante citometría de flujo.</u>

Se separaron células de placas de cultivo usando disolución de EDTA (50 mM) en PBS (pH 7,4), se contaron y se suspendieron hasta una concentración final de 1,5 x 10^6 células ml⁻¹ en una disolución de FCS (1% v/v) / PBS (pH 7,4). Se centrifugaron alícuotas de 3 x 10^5 células (200μ l) y se resuspendieron en disoluciones de ligandos marcados

- 10 con IRDye® 750 (Licor) (30 nM) en FCS (1% v/v) en PBS (200 μl, pH 7,4) y se incubaron a 4°C durante 1 h. Se lavaron las células una vez con 200 μl de FCS (1% v/v)/ PBS (pH 7,4), se centrifugaron, se resuspendieron en una disolución de yoduro de propidio (30 μM, Sigma-Aldrich) en FCS (1% v/v) / PBS (300 μl, pH 7,4) y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD Bioscience). Se usó FlowJo versión 8.7 (Treestar) para análisis de datos y visualización.
- 15 Estos experimentos mostraron que el compuesto marcado con IRDye 750 C5c (figura 17) tiñó células con más fuerza que el correspondiente control de acetazolamida marcado con IRDye 750 C1a (figura 17). Estos resultados se muestran en la figura 18.

Estudios de unión in vivo

20

40

Para experimentos de obtención de imágenes IVIS, a ratones que tenían tumores SK-RC-52 subcutáneos se les inyectó por vía intravenosa 3 nmol de ligandos de CAIX marcados con IRDye® 750 C1c, C5c y C6 (figuras 15,17) disueltos en DMSO al 5% v/v en PBS pH 7,4 (150 µl). Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se adquirieron imágenes de fluorescencia en un sistema de obtención de imágenes IVIS Spectrum (Xenogen, exposición 1 s, factor

- 25 de agrupamiento 8, excitación a 745 nm, filtro de emisión a 800 nm, f número 2, campo de visión 13,1). Se administró alimento y agua a voluntad entre mediciones. Posteriormente los ratones se sacrificaron mediante luxación cervical. Se extrajeron el corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, una sección del intestino, músculo esquelético y el tumor y se obtuvieron imágenes individualmente usando los parámetros anteriores.
- 30 El colorante no seleccionado como diana C6 no se ubicó preferiblemente en el tumor en ningún momento, en total analogía con agentes quimioterápicos convencionales. El derivado de acetazolamida C1c presentó una rápida acumulación preferencial en el tumor, pero se disoció gradualmente de la masa neoplásica a lo largo del tiempo. En cambio, el ligando A-493/B-202 bidentado de alta afinidad C5c presentó una selección como diana de tumores duradera y selectiva. La eficacia de la selección como diana de tumores de C5c y C1c (el 18% y el 3,7% de dosis
- 35 inyectada por gramo de a las 24 h, respectivamente) se comparó favorablemente con los datos de biodistribución obtenidos en el mismo modelo animal usando dos anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad en formato de IgG.

Preparación de un ligando radiomarcado que tiene propiedad de unión a CAIX

Un ligando anti-CAIX según la presente invención que tiene la siguiente estructura química:



45 se radiomarcó con tecnecio 99m tal como sigue. Se mezclaron 50 μl de ligando (1,2 mM) en PBS desgasificado pH 7,4 con 50 μl de disolución recién preparada de SnCl₂ (4 mg/ml) en agua MQ desgasificada, 100 μl de glucoheptonato de Na (200 mg/ml) recién preparado en agua MQ desgasificada, y 600 μl de TBS pH 7,4. Se desgasificó la disolución durante al menos 5 min haciendo burbujear nitrógeno. Se añadieron 200 μl de eluato generador ^{99m}Tc (aproximadamente 200 MBq) a la disolución, que luego se calentó hasta 90°C durante 20 min y se dejó enfriar hasta 50 temperatura ambiente.

Evaluación de la biodistribución de ligando anti-CAIX radiomarcado

Se evaluó el rendimiento de la biodistribución del ligando marcado con tecnecio 99m en ratones tal como sigue. A ratones balb/c nu/nu se les inyectó por vía subcutánea 10⁷ células de carcinoma de células renales SKRC52. Se dejó que los tumores SKRC52 establecidos crecieran hasta un tamaño promedio de 500 mm³ antes de recibir inyecciones intravenosas del ligando radiomarcado. También se radiomarcó un ligando no seleccionado como diana / irrelevante con tecnecio 99m y se usó como control negativo.

Seis horas después de la inyección, se sacrificaron los ratones, se extirparon órganos individuales y se analizaron para determinar la captación de ligando radiomarcado.

Los resultados expresados como dosis inyectada por gramo de tejido se muestran en la figura 19. Puede observarse que el ligando de CAIX se ubicaba fuertemente en el tumor en comparación con el ligando no seleccionado como diana.

10 <u>Síntesis de un fármaco de auristatina conjugado con un resto de unión a CAIX de molécula pequeña que tiene un ligador peptídico que puede escindirse mediante catepsina B (compuesto de referencia)</u>

Se muestran el esquema de reacción y la estructura del conjugado de fármaco de este ejemplo de referencia en la figura 20.

Se preparó el péptido AAZ-triazol-AspArgAspCys-COOH (1) tal como se describió previamente (Krall *et. al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 4231). Se añadió una disolución de 1 (4,5 mg, 5 μmol) en PBS desgasificado pH 7,4 (1 ml) a maleimidocaproílo – valina citrulina - para-amino carbamato de bencilo de monometil auristatina E comercialmente disponible (MC-VC-PAB-MMAE (2), 6,5 mg, 4,9 μmol) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min.
MMAE es el resto tóxico. MC-VC-PAB es el ligador que puede escindirse.

Se purificó la mezcla sobre HPLC (Synergi RP Polar, MeCN al 5% en TFA ac. al 0,1% hasta el 80% a lo largo de 20 min) y se identificaron fracciones que contenían el producto mediante espectrometría de masas de baja resolución. Tras la liofilización, se recogió el producto como un polvo blanco (7,5 mg, 3,4 μ mol, 68%). HRMS: (m/z) [M + 2H⁺] C₉₈H₁₅₃N₂₅O₂₈S₃, 1112,0234; encontrado 1112,0237.

Evaluación de la actividad antitumoral del conjugado de auristatina con resto de unión a CAIX y ligador peptídico que puede escindirse de catepsina B.

30 Se evaluó la actividad antitumoral del conjugado de fármaco tal como se muestra en la figura 19 tal como sigue. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 20.

A ratones balb/c nu/nu se les inyectó por vía subcutánea 10⁷ células de carcinoma de células renales SKRC52. Se permitió que los tumores SKRC52 establecidos crecieran hasta un tamaño promedio de 700 mm³ antes de recibir inyecciones intravenosas del SMDC a las siguientes dosis y esquemas: 50 nm en el día 1 únicamente; 25 nm cada uno en el día 1 y día 2; y 10 nm cada uno en los días 1, 2, 3, 4 y 5. Se registraron los volúmenes tumorales cada día con la ayuda de un calibrador digital. Se observó una actividad antitumoral significativa incluso a la dosis más baja de 10 nmoles.

40 La figura 20 muestra que se observó una fuerte actividad antitumoral del SMDC en el modelo de carcinoma de células renales SKRC52 establecido en ratones desnudos. Se observó la regresión de tumores con el tamaño de 700 mm³ con diferentes dosis y regímenes de tratamiento.

Bibliografía

5

25

45

55

[1] T. Iwakiri, M. Okumura, M. Hidaka, Y. Kumagai, E. Ichihara, Y. Kawano, K. Arimori, J. Appl. Toxicol. 2008, 28, 329.

[2] H. H. Ku, J. Res. Nat. Bur. Stand. Sec. C: Eng. Inst. 1966, 70C, 263.

50 [3] J. K. Ahlskog, C. Schliemann, J. Marlind, U. Qureshi, A. Ammar, R. B. Pedley, D. Neri, Br. J. Cancer 2009, 101, 645.

[4] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, Anal. Biochem. 2004, 332, 261.

[5] K. Frey, C. Schliemann, K. Schwager, R. Giavazzi, M. Johannsen, D. Neri, J. Urology 2010, 184, 2540.

[6] M. Steiner, K. Gutbrodt, N. Krall, D. Neri, Bioconj. Chem. 2013, 24, 234.

60 [7] E. Oroudjev, M. Lopus, L. Wilson, C. Audette, C. Provenzano, H. Erickson, Y. Kovtun, R. Chari, M. A. Jordan, Mol. Cancer. Ther. 2010, 9, 2700.

[8] M. Lapeyre, J. Leprince, M. Massonneau, H. Oulyadi, P. Y. Renard, A. Romieu, G. Turcatti, H. Vaudry, Chemistry 2006, 12, 3655.

- 65
- [9] A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J. C. Florent, L. Johannes, Angew. Chem. Int. Ed.

	[10] L. F. Tietze, F. Major, Eur. J. Org. Chem. 2006, 2314.
5	[11] R. N. Zuckermann, <i>et al.</i> , J. Med. Chem. 1994, 37, 2678.
	[12] J. T. t. Lundquist, J. C. Pelletier, Org. Lett. 2001, 3, 781.
10	[13] F. Carta, V. Garaj, A. Maresca, J. Wagner, B. S. Avvaru, A. H. Robbins, A. Scozzafava, R. McKenna, C. T. Supuran, Bioorg. Med. Chem. 2011, 19, 3105.
	[14] K. M. Amore, N. E. Leadbeater, T. A. Miller, J. R. Schmink, Tet. Lett. 2006, 47, 8583.
15	[15] A. W. Schuttelkopf, L. Gros, D. E. Blair, J. A. Frearson, D. M. van Aalten, I. H. Gilbert, Bioorg. Med. Chem. 2010, 18, 8334.
	[16] G. Chouhan, K. James, Org. Lett. 2011, 13, 2754.
20	Lista de secuencias
	<110> Eidgenoessische Technische Hochschule Zurich
	<120> Conjugados de fármaco de molécula pequeña
25	<130> P4472PC00
	<140> Documento PCT/EP2015/052214 <141> 03-02-2015
30	<150> Documento GB 1401819.6 <151> 03-02-2014
35	<150> Documento GB 1407530.3 <151> 29-04-2014
	<150> Documento GB 1419994.7 <151> 10-11-2014
40	<160> 5
	<170> PatentIn versión 3.3
45	<210> 1 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> Ligador peptídico sintético
	<400> 1
	Asp Arg Asp Cys 1
55	<210> 2 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético de la sub-biblioteca A del documento PCT/EP2015/052214
<u>c</u> e	<220> <221> misc_feature

65 <222> (25)..(30)

2007, 46, 6469.

<223> Secuencia codificante que identifica inequívocamente cada miembro de biblioteca individual del documento PCT/EP2015/052214 <400> 2 5 ggagcttctg aattctgtgt gctgnnnnn cgagtcccat ggcgcagc 48 <210> 3 <211> 41 <212> ADN 10 <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido sintético de la sub-biblioteca B del documento PCT/EP2015/052214, diseñado para ser complementario a los oligonucleótidos de la sub-biblioteca A de SEQ ID NO: 2 15 <220> <221> misc_feature <222> (12)..(17) <223> Región espaciadora abásica 20 <400> 3 catgggactc gnnnnncag cacacagaat tcagaagctc c 41 <210> 4 25 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> 30 <223> Oligonucleótido sintético <220> <221> misc feature <222> (22)..(29) 35 <223> n22 a n29 denota una región de código de 8 dígitos <400> 4 cctgcatcga atggatccgt gnnnnnnng cagctgcgc 39 40 <210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial 45 <220> <223> Oligonucleótido adaptador quimérico sintético (ADN/ARN) <220> <221> misc feature 50 <222> (4)..(6) <223> Porción de ARN <220> <221> misc_feature 55 <222> (14)..(17) <223> Porción de ARN <400> 5 cgagtcccat ggcgcagctg c 21 60

REIVINDICACIONES

1. Ligando específico para CAIX que tiene la fórmula:



5

2. Ligando según la reivindicación 1, en el que el ligando está radiomarcado con tecnecio 99m.



marcador a = FITC fluorescente: b = Alexa546 c = IRDye750

Fig. 1



Fig. 2







Fig. 4





Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8



B1 R = HB3 R = IRDye750

Fig. 9



B2 R = HB4 R = IRDye750

Fig. 10



$$X = N + S + SO_2NH_2$$

N-N

B7

B8 X = OH

Fig. 11



- Vehículo;
- ▼ligando B2 (8 x 35 nmol)
- ▲ Conjugado seleccionado como diana B7 (8 x 35 nmol)
- Conjugado no seleccionado como diana B8 (8 x 35 nmol)

Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14



C6

Fig. 15



Fig. 16



Fig. 17



Fig. 18





ES 2 735 348 T3



Fig. 19



Fig. 21