



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-972209

54. TITULO

CONJUGADOS DE AGENTES TERAPÉUTICOS O CITOTÓXICOS Y
PEPTIDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K31/27; A61K38/08;
A61K47/42

71. SOLICITANTE

THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

DOMICILIO

New Orleans, Estado de Louisiana, Estados Unidos de América.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,

29/09/2004.

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04097209 00000000 Folios: 243
Fecha (AMB): 2004-09-29 17:27:38
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

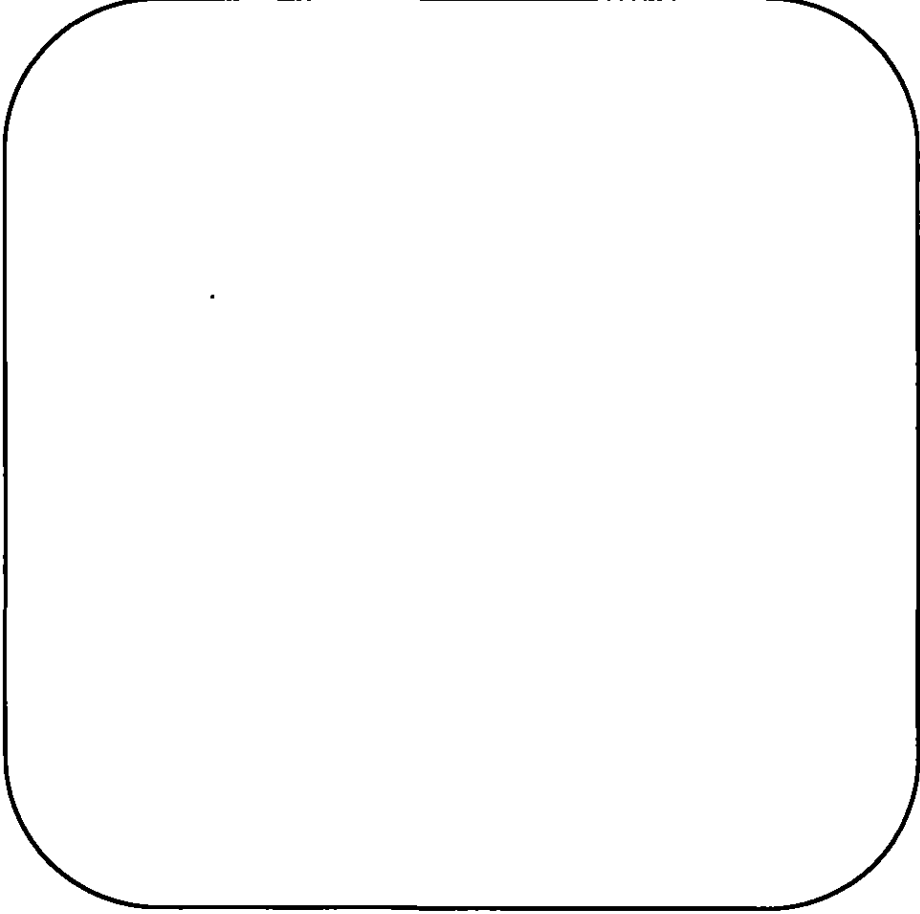
1		SOLICITUD DE:	
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2	SOLICITANTE (71)	Nombre: THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND organización constituida y existente bajo las leyes del estado de Louisiana, Estados Unidos de América Dirección: 1430 Tulane Avenue, New Orleans, Louisiana 70112, Estados Unidos de América Domicilio: New Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: _____
3	REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 38 11 Fax: 217 92 11 E-mail: <u>clientes@camyp.com.</u> Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: <u>438.019</u> T.P. <u>31.929</u>
4	INVENTOR (ES) (72)	1. Joseph A. FUSELIER 8220 Neron Place, New Orleans, Louisiana 70118, Estados Unidos de América 2. David H. COY, 1529 Fourth Street., New Orleans, Louisiana 70130 Estados Unidos de América	
5	PCT (88) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US03/08657</u> Fecha: <u>03 de marzo de 2003</u> Publicación Interacional No. <u>WO 03/074551 A2</u> Fecha: <u>12 de septiembre de 2003</u>		
6	Título (54) CONJUGADOS DE AGENTES TERAPÉUTICOS O CITOTÓXICOS Y PÉPTIDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS ver folio 238		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K</u> // <u>A61K38/08</u> // <u>A61K47A2</u>		

A61K 31/27.

8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	US	01 de marzo de 2002	60/360.831

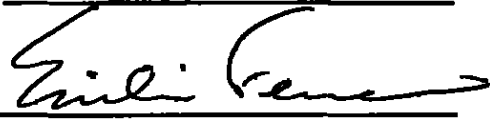
9	Comprobante de pago No.: 04 - 74.332	Fecha: 20 de septiembre de 2004
---	--------------------------------------	---------------------------------

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00.
☐	Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
☒	Poderes, si fuere el caso.
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
☐	Declaraciones.
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☒	Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
☐	Arte final 12x12
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☐	Otros

11	FIGURA CARACTERISTICA:
	

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

D DLM

CAVELIER

ABOGADOS

SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, S. COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs,
trademarks, commercial names, trade emblems,
slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños
industriales, marcas de fábrica, nombres
comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

11876
1878

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND

of/domiciliado (s) en 1430 Tulane Ave., New
Orleans, Louisiana 70112, United States of America,

hereby ratify the patent application No.99.072.002 filed by EMILIO FERRERO on November 16, 1999 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys, so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative-contencioso and judicial, as well as before Arbitration Courts, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity-infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 11-17-99

in/en New Orleans, LA

Signature Carlos A. Sisk 11/17/99 Firma

CAVELIER ABOGADOS
WPPODEKE-181 (MINUTA N° 12.1.1.2.6 USA)

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 17 días del mes de Noviembre de 19 99
ante mí, Notario Público de Orleans Parish
compareció(eron) personalmente Carla Fishman

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 17 de Noviembre de 19 99
compareció(eron) ante mí
Carla H. Fishman

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen
to en representación de la Sociedad/compañía

denominada ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos: Resolución de la
Tenth Administration fechado 26 Junio, 1882
y modificado hasta 21 Noviembre
1996, Acta No. 43 de la Sesión General
de 1884

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND

2.1. Que EDUCATIONAL FUND
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes del Estado de Louisiana,
Estados Unidos de América.

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
1430 Tulane Ave., New Orleans, Louisiana
70112, Estados Unidos de América.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Carla H. Fishman

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad New Orleans

Estado Louisiana

Hoy 17 Nov. de 19 99

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 17 day of NOVEMBER 19 99
before me, a Notary Public of ORLEANS PARISH
personally appeared CARLA H. FISHMAN

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

Notary Public

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 17 day of NOVEMBER 19 99
appeared before me
CARLA H. FISHMAN

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company

named ADMINISTRATORS OF THE TULANE
EDUCATIONAL FUND

I Certify:

1. That I have seen the following documents:
Resolution of the Board of
Administrators, adopted June 26,
1882 and as amended up to November 21,
1996 & Act No. 43 of the General Session of 1884

2. That the above documents duly prove the following:

ADMINISTRATORS OF THE TULANE
2.1. That EDUCATIONAL FUND
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Louisiana,
United States of America.

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
1430 Tulane Ave., New Orleans, Louisiana
70112, United States of America.

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

2.4. That ~~the~~ CARLA H. FISHMAN

is ~~was~~ authorized to grant the present Power of Attorney.

City NEW ORLEANS

State LOUISIANA

This 17 day of Nov. 19 99

Nancy W. Jackson

* Documents must be identified with date and origin.

RESPUESTA AL TEXTO
Estado de Louisiana
Civil District Court
2000 MAGISTRATE
JESUS DE LEGACIONES
VIAFE DE BOUYA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
d.ney
28470
Firma Arce en el
DOCUMENTO DESEMPENA
IS FUNCIONES INDICADAS

I, DALE N. ATKINS, Clerk of the Civil District Court for the Parish of Orleans, State of Louisiana, the same being a Court of Record, having probate Jurisdiction, DO HEREBY CERTIFY, that

NANCY W. JACKSON

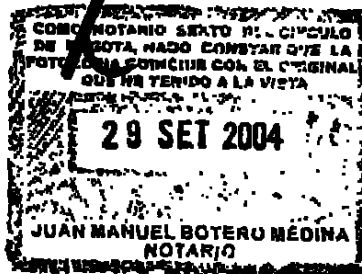
Whose name is subscribed to the certificate of proof, acknowledgment, or affidavit of the annexed instrument, and thereon written, was at the time of taking such proof, acknowledgment or affidavit a Notary Public within and for said Parish, residing in said Parish, duly appointed, commissioned and sworn, and authorized by the laws of said State to administer oaths, and to take the acknowledgments and proofs of deeds or conveyances of lands, tenements and hereditaments, in said State, and other instruments to be recorded therein and to certify the same; that full faith and credit are and ought to be given to his official acts; and I further certify that I have compared the signature to the original certificate with that deposited in this office by such person and verily believe that the signature to the attached certificate is his genuine signature, and the person signing such certificate is not required by law to file in this office an impression of his official seal.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said Court at the City of New Orleans in said Parish and State on the

3rd day of December 19 99

Dale N. Atkins

Clerk

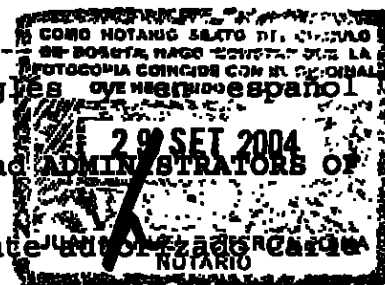


6

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 090300 al español de un documento escrito en inglés, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

Documento escrito en inglés y español por medio del cual ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND, ratifica la Solicitud de Patente N° 99.072.002 presentada por el doctor Emilio Ferrero el 16 de noviembre de 1999 y otorga poder a favor EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER. Dado y firmado el 17 de noviembre de 1999 en New Orleans, Lcuisiana, Estados Unidos de América (firmado) Carla H. Fishman

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND y su representante autorizada Carla



H. Fishman, expedida el 17 de noviembre de 1999 en Nueva Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América (firmado) Nancy W. Jackson, Notario Público (Aparece sello notarial en relieve)

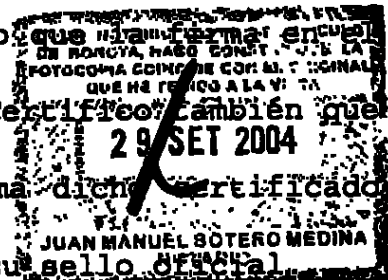
Estado de Louisiana
Corte Civil Distrital
Parroquia de Orleans

Yo, DALE N. ATKINS, Escribano de la Corte Civil Distrital para la Parroquia de Orleans, Estado de Louisiana, siendo la misma

una Corte de Registro, con jurisdicción en materia de sucesiones, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que

NANCY W. JACKSON

quien suscribe el certificado de prueba, reconocimiento o declaración juramentada del instrumento anexo, era en el momento de recibir dicha prueba, reconocimiento o declaración juramentada, un Notario Público dentro de dicha Parroquia y para la misma, residente en ella, debidamente nombrado, comisionado, juramentado y autorizado por las leyes del mencionado estado para tomar juramentos y para recibir las pruebas de escrituras o traspasos de tierras y bienes inmuebles en dicho estado y demás instrumentos que deban registrarse en el mismo, así como para certificarlos. Que se da y debe darse plena fe y crédito a sus actos oficiales. Certifico además que he comparado la firma en el certificado original con la firma depositada en esta oficina por dicha persona y realmente creo que la firma en el certificado anexo es su firma auténtica. Certifico también que la ley no ordena que la persona que firma dicho certificado archive en esta oficina una impresión de su sello oficial.



EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado mi firma y el sello de dicha Corte en la ciudad de Nueva Orleans en la mencionada Parroquia y Estado el 3 de diciembre de 1999. (firmado) DALE N. ATKINS, Escribano.

N° 006. EL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA en Nueva Orleans, Louisiana, Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de Nancy W. Jackson, el 16 de diciembre de 1999. Pagado impuesto de timbre y derechos consulares. (firmado) MARIA INES

PANTOJA, Cónsul General

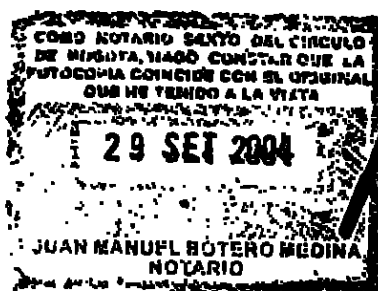
EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá,
D.C. certifica la firma y las funciones de Inés Pantoja, el 01
de marzo del 2000. N° 128470. (firmado) Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los
archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me
remito.

Santa Fe de Bogotá, D.C., marzo 09 del 2000

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B.
TRABAJADOR E INTERPRETE OFICIAL
Bos 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

COLO: 11876-801-001-9
WPC11876 - ID # 5



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
93675
LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO RESEMEJA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 MAR 10 A 11:43
JEFE DE LEGALIZACIONES
CALLE DE BOGOTA D.C.

Notario Público en el Estado de
Enrique E. Gonsanto
CÓDIGO NOTARIAL DEL ESTADO DE CALIFORNIA
SANTO DOMINGO, CALIFORNIA
10 MAR 2000

NOTARIA
ENRIQUE E. GONSANTO
SANTO DOMINGO, CALIFORNIA

NOTARIO EN EL ESTADO DE CALIFORNIA
EN EL CÍRCULO
DE NOTARÍA SE DEBE COMPROBAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE SE TENDIÓ A LA VISTA
20 SET 2004
A. HILARIO MEDINA
NOTARIO

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/074551 A3

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395, C07K 16/46, 7/06, 12/00 (74) Agent: CLARK, Paul, T.; Clark & Elbing LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2003/006657 (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 3 March 2003 (03.03.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/360,831 1 March 2002 (01.03.2002) US (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 607360,831 (CIP) Filed on 1 March 2002 (01.03.2002)
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND [US/US]; 1430 Tulane Avenue, New Orleans, LA 70112 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (*for US only*): FUSELIER, Joseph, A. [US/US]; 8220 Neron Place, New Orleans, LA 70118 (US). COY, David, H. [US/US]; 1529 Fourth Street, New Orleans, LA 70130 (US).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 25 March 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 2003/074551 A3

(54) Title: CONJUGATES OF THERAPEUTIC OR CYTOTOXIC AGENTS AND BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

(57) Abstract: The invention features conjugates of therapeutic or cytotoxic agents and biologically active peptides and methods of use thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/46, 7/06, 12/00

US CL : 424/178.1; 530/322, 330,391.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/178.1; 530/322, 330,391.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ingallinella, P, et al A New Method for Chemoselective Conjugation of Unprotected Peptides to Doxorubicin and Doxorubicin Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters November 2001 pages 1343-1346 Scheme 1	1-114
Y	US 5,663,306 A (ALDWIN, et al) 2 September 1997 (2.09.1997) Examples 10 and 11	1-114
Y	US 5,948,750 B (GARSKY, et al) 7 September 1999 (7.09.1999) Examples 4 and 5	1-115

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority date(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document number of the same patent (family)

Date of the actual completion of the international search

01 December 2003 (01.12.2003)

Date of mailing of the international search report

21 JAN 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Edward C Ward

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06363

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 4-7

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

JUN 25 2004

To:
PAUL T. CLARK
CLARK & ELBING LLP
101 FEDERAL STREET
BOSTON, MA 02110ACTION DUE Reply
DUE DATE 8-23-04
INITIALS mw

PCT CLARK & ELBING LLP

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Applicant's or agent's file reference		Date of Mailing (day/month/year)
07003/007WO2		25 JUN 2004
International application No.		REPLY DUE
PCT/US03/06657		within 1 months/days from the above date of mailing
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)	
03 March 2003 (03.03.2003)	01 March 2002 (01.03.2002)	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC		
IPC(7): A61K 39/395; C07K 16/46, 7/06, 12/00 and US Cl.: 424/178.1; 530/322, 330,391.1		
Applicant		
THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATION FUND		

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. ~~The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.3(d).~~

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 01 July 2004 (01.07.2004).

Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Edward C Ward Telephone No. (703) 308-0196
--	---

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

WRITTEN OPINION

International application No. 12

PCT/US03/06657

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-58, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 59-75, as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1 and 2, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages 1-13, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☒ the description, pages none
- ☒ the claims, Nos. none
- ☒ the drawings, sheets/fig none

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/06657

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-114</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-114</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-114</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-114 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Ingallinella et al in view of Garisky et al. The instant claims embrace a peptide of sequence 1 conjugated to a daunorubicine moiety. Ingallinella et al disclose an oximo-Daunorubicine- peptide of sequence 1 conjugate (see Scheme1). The difference between Ingallinella et al and the claims is the particular conjugate bond. Garisky et al disclose the particular daunorubicine conjugate bond (see examples 3 and 4). Garisky et al further disclose vinca alkaloid, podophyllotoxine, mercaptopurine, and melphalan conjugates (see columns 13 to 14). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time that the invention was made to prepare conjugates of sequence 1, and daunorubicine because one would expect that similar protein- daunorubicine conjugates to treat tumors, similarly.

Claims 1-114 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Aldwin et al in view of Garisky et al. The instant claims embrace a peptide daunorubicine conjugate for treating tumors. Aldwin et al disclose an alkylating agent- peptide conjugate for treating tumors (see examples 9-11). The difference between Aldwin et al, and the claims is the antitumor drug conjugated to the peptide. Garisky et al disclose daunorubicine, melphalan, podophyllotoxin, and Vinca alkaloid conjugates for treating tumors (see columns 13-14, and examples 3-4). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time that the invention was made to prepare peptide daunorubicine conjugates to treat tumors because one would expect that similar peptide- daunorubicine conjugates would treat tumors, similarly.

WRITTEN OPINION

14
International application No.
PCT/US03/06657

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:

The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/074551 A2

- (51) International Patent Classification¹: C07K (74) Agent: CLARK, Paul, T.; Clark & Elbing LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US03/06657
- (22) International Filing Date: 3 March 2003 (03.03.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/360,831 1 March 2002 (01.03.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 607360,831 (CIP)
Filed on 1 March 2002 (01.03.2002)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND [US/US]; 1430 Tulane Avenue, New Orleans, LA 70112 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): FUSELIER, Joseph, A. [US/US]; 8220 Neron Place, New Orleans, LA 70118 (US). COY, David, H. [US/US]; 1529 Fourth Street, New Orleans, LA 07130 (US).
- Published:
— without International search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CONJUGATES OF THERAPEUTIC OR CYTOTOXIC AGENTS AND BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

(57) Abstract: The invention features conjugates of therapeutic or cytotoxic agents and biologically active peptides and methods of use thereof.

WO 03/074551 A2

20

CONJUGATES OF THERAPEUTIC OR CYTOTOXIC AGENTS AND BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

5

Field of the Invention

The invention relates to conjugates of therapeutic or cytotoxic agents and biologically active peptides and uses thereof.

10

Background of the Invention

The use of carbamate compounds as prodrugs is well known. Carbamate compounds are well suited for prodrug design because they can be used to regenerate the parent drug whether the point of connection to a vector molecule is a hydroxyl group or an amine. Carbamate prodrugs based on intramolecular cyclizations have been reported since the late 1980s. For example, U.S. Patent No. 4,812,590 (which corresponds to EP 0 296 811) discloses derivatives of 4-hydroxyanisole carbamate as prodrugs for the delivery and concentration of 4-hydroxyanisole in melanomas. Vigroux et al. (J. Med. Chem. 38, 3983-3994, 1995) disclose prodrugs of acetaminophen which incorporate *N*-(substituted 2-hydroxyphenyl)- and *N*-(substituted 2-hydroxypropyl)carbamates.

20

An optimal prodrug design is one in which the drug is conjugated to a biologically active vector such that the conjugate is completely stable in circulation, but releases the therapeutic agent cleanly when internalized into target cells. Various types of linker technologies attempt to achieve this goal by different chemical means. Two types of biodegradation phenomena, passive hydrolysis and enzymatic hydrolysis, are typically considered. Passive hydrolysis occurs when the molecule degrades by simple chemical decomposition; esters, carbonates, amides and urethanes are all susceptible to varying degrees of hydrolysis with the following order of stability at basic pH: urethanes > amides > carbonates > esters. Enzymatic hydrolysis occurs in plasma circulation as well as upon internalization. If the desired result is to transport the conjugate to the target cell, it is desirable that the conjugate be very resistant to plasma enzymes that could degrade the complex en route. Commonly used ester derivatives are a particularly poor choice of linker because peripherally circulating compound is rapidly attacked by ubiquitous esterases.

30

35

Another linker strategy capitalizes on pH differences existing between the inside and outside of cells. Lysosomes, which are responsible for degrading molecules within cells, have a pH of 4-6, while plasma and extracellular fluid has a pH of 7.4. A linker that is designed to degrade at pH 5, but is stable at pH 7, may be useful for delivering
5 the conjugate to cells, assuming that the conjugate does not undergo passive or enzymatic hydrolysis in plasma. However, this linker strategy is not optimal for peptide conjugates because most of the work-up and purification of synthetic peptides is done in acidic media.

Still other chemical linkers attempt to capitalize on specific enzymes found in
10 lysosomes. For example, many peptide sequences are stable in plasma but are specifically cleaved by lysosomal enzymes.

The toxic side effects of many of these therapies, as well as standard treatments of neoplastic disease, effectively limit the amount of active agent that may be administered to a patient. Additionally, many active agents cause organ-specific
15 toxicities, further limiting the dose that may be delivered to the target tissue. For instance, the cardiotoxicity of many anthracycline family members reduces the maximum therapeutic dose available for this group of chemotherapeutic agents. Targeted drug delivery of various therapeutic agents can lower toxicity in normal tissue and increase the efficacy of treatment by allowing concentrated localized effects on
20 specific tissues.

Somatostatin, bombesin, and other biologically active peptide analogs have been used to detect tumor cells that overexpress receptors specific for these peptides (see, e.g., Denzler and Reubi, Cancer 85(1):188-198, 1999). Moreover, somatostatin, bombesin and many other biologically active peptide agonist analogs are rapidly
25 internalized after binding to their receptors (see, e.g., Lukinius et al, Acta Onc. 38:383-387, 1999). This internalization of the peptide analogs may result in translocation to the cell nucleus (Chen et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol., 279: F440-F448, 2000).

Somatostatin analogs bind specific somatostatin receptor subtypes that are present on the surface of specific normal or diseased tissues. Somatostatin receptors are
30 up-regulated in specific diseased tissues, including inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis, and a variety of tumor types, as well as blood vessels supplying many tumors (Denzler and Reubi, Cancer, 85:4188-198, 1999). Similarly, receptors

17

specific for another biologically active peptide, Substance P, can be up-regulated in various diseases.

At least five somatostatin receptors subtypes have been characterized, and tumors can express various receptor subtypes. (Shaer, et al., Int. J. Cancer 70:530-537, 1997). Naturally occurring somatostatin and its analogs exhibit differential binding to these receptor subtypes, allowing precise targeting of a peptide analog to specific diseased tissues.

The physical and chemical properties of many cytotoxic agents make drug conjugation to biologically active peptides, such as somatostatin and bombesin, problematic. For example, the drug may reduce the specificity of binding or the biological activity of the peptide analog, limiting its effectiveness as a targeting agent. Additionally, therapeutic and cytotoxic agents may have chemical properties that promote accumulation of drug-peptide analogs in certain organs, increasing toxicity and reducing efficacy. Effective means to link cytotoxic agents to a targeting agent such as a biologically active peptide or an antibody, while retaining the activity of each component are needed to maximize therapeutic effects, while minimizing toxicity.

Summary of the Invention

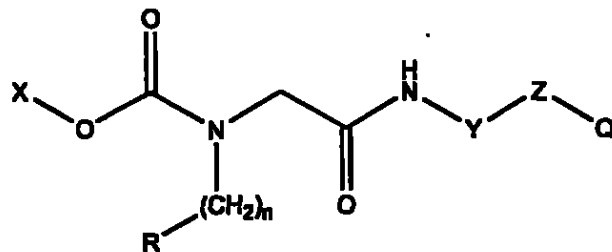
The invention features conjugates of a therapeutic agent or a cytotoxic agent and a targeting moiety. In particular, the invention features conjugates having a cleavable chemical linker which reduces the release of therapeutic or cytotoxic agent in circulation, thereby rendering the active agent component of the conjugate more readily internalized by a cell, and more readily subject to active control of release rate inside the cell.

Accordingly, in one aspect, the present invention features biologically active peptides conjugated to chemical compounds through a carbamate linkage. Conjugates of the present invention provide numerous advantages, such as retention of the biological activity of the peptide, enhanced stability of the conjugate in plasma, and intracellular release of the attached compound. Preferred peptides for use with conjugates of the invention include somatostatin, somatostatin analogs, bombesin, bombesin analogs, KiSS peptides and analogs, urotensin II peptides and analogs, GnRH I and II peptides and analogs, octreotide, depreotide, vapreotide, vasoactive intestinal peptide (VIP), cholecystokinin (CCK), insulin-like growth factor (IGF), RGD-

containing peptides, melanocyte-stimulating hormone (MSH) peptide, neurotensin, calcitonin, peptides from complementarity determining regions of an antitumor antibody, glutathione, YIGSR (leukocyte-avid peptides, e.g., P483H, which contain the heparin-binding region of platelet factor-4 (PF-4) and a lysine-rich sequence), atrial natriuretic peptide (ANP), β -amyloid peptides, delta-opioid antagonists (e.g., [125I]ITIPP(psi) [H-Tyr(3T)-Ticpsi[CH2NH]Phe-Phe-OH]; ITIPP(psi)), annexin-V, endothelin, interleukin (IL)-1, IL-1ra, IL-2, and IL-8, leukotriene B4 (LTB4), chemotactic peptides (e.g., N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-lysine (fMLFK)), GP IIb/IIIa receptor antagonists (e.g., DMP444), epidermal growth factor, human neutrophil elastase inhibitor (e.g., EPI-HNE-2 and EPI-HNE-4), plasmin inhibitor, antimicrobial peptides, apticide (e.g., P280 and P274), thrombospondin receptor (including analogs such as TP-1300), bitistatin, pituitary adenylate cyclase type I receptor (PAC1), fibrin α -chain, and derivatives and analogs thereof. Also included are peptides derived from a phage display library, and conservative substitutions thereof, that are targeted to a cell or tissue in the body of a mammal (e.g., diseased tissue, such as a tumor or a proliferative angiogenic blood vessel; see, e.g., Aina et al., *Biopolymers* 66:184-199, 2002). Such peptides are useful for specifically targeting therapeutic agents and cytotoxic agents to a cell, such as a cancer cell, or to a tissue in the body of a mammal (e.g., the delivery of anti-apoptotic drugs to cardiac or brain tissue), or to selectively target white blood cells or tubercles infected with tuberculosis. For example, when somatostatin or bombesin is used as the biologically active peptide in a conjugate of the invention, the therapeutic or cytotoxic agent may be targeted to a cancer cell that expresses a somatostatin receptor or a bombesin receptor. The invention also features antibodies (e.g., a monoclonal antibody) or a fragment thereof, that can be linked to the conjugate of the invention. As discussed above with respect to peptides, when an antibody is incorporated in a conjugate of the invention, the therapeutic or cytotoxic agent may be targeted to specific antibody binding sites.

Conjugates of the first aspect of the invention have the following general formula:

30



wherein

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

5 n is an integer from 0 to 6, wherein $(CH_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

R is $N(R_1R_2)$, OR_1 , or SR_1 where R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group;

10 Y is an hydrophilic spacer sequence, or is omitted;

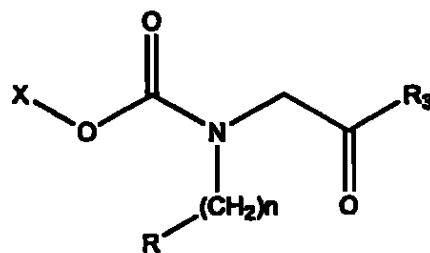
Z is a linking peptide, or is omitted; and

Q, when present, is a targeting moiety.

In this and the other aspects of the invention, the alkyl group preferably contains 1-8 carbon atoms; the alkenyl group preferably contains 1-X carbon atoms; the alkynyl group contains 1-X carbon atoms; the cyclic group contains...

15

A second aspect of the invention features a conjugate having the formula:



20 wherein

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

n is an integer from 0 to 6, wherein $(CH_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

R is $N(R_1R_2)$, OR_1 , or SR_1 where R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group, and wherein R_3 is a $NH(CH_2)_mSH$ group (where $m = 2$ to 6), a D or L cysteine, a benzophenone (e.g., p-benzoyl-phenylalanine), or an OH group. A conjugate compound having this formula can be used to link to a peptide, protein, or antibody through the thiol, carboxylate, or photoactive benzophenone containing R_3 group. In addition, a peptide or protein can be easily prepared by synthesizing the peptide or protein directly onto the compound. For example, the compound can be provided such that the R group is a tBoc protected primary or secondary amino group, and can be added to the peptidyl resin as described in the examples provided below.

Peptides, proteins, and antibodies can also be attached to the compound through the use of known thiol-reactive chemical reactions when the R_3 group contains a thiol group, or by a photoreactive reaction when R_3 contains a benzophenone moiety (see, e.g., Greg T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques" p. 146-152, 1996).

In preferred embodiments of all aspects of the invention, X is a cytotoxic agent selected from camptothecin, homocamptothecin, colchicine, combretastatin, dolistatin, doxorubicin, methotrexate, podophyllotoxin, rhizoxin, rhizoxin D, a taxol, paclitaxol, CC1065, or a maytansinoid and derivatives and analogs thereof. For example, the cytotoxic agent camptothecin is linked through its single free hydroxyl group to a carbamate linker. In these embodiments of the invention, n is preferably 2 and R is preferably NH_2 .

Y is an hydrophilic spacer sequence that may be, preferably, a peptide that increases the biodistribution of the conjugate, or a hydrophilic polymer. For example, Y may be a peptide sequence that increases the hydrophilic biodistribution of the biologically active peptide conjugate. In a preferred embodiment, Y has the formula $U(V-V)_n$, wherein U is D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosine, Lys, Orn, Dab, Dap, 4- NH_2 -Phe, or $(NH_2-(CH_2)_m-COOH)$, where $m=2-10$, inclusive, or is deleted; each V is independently selected from the group consisting of: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, or L-4 hydroxy-Pro; and $n=1-50$, inclusive. In another preferred embodiment, each V is independently D-Ser or L-Ser. In another preferred embodiment, at least one V is a D-amino acid.

Y may be a hydrophilic polymer. For example, Y may be polyethylene glycol, polyvinyl acetate, polyvinyl alcohol, HPMA (N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) or HPMA copolymers, α , β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide (PHEA), or α , β -poly(N-hydroxypropyl)-DL-aspartamide.

5 Z is a linking peptide that preserves at least fifty percent of the biological activity of Q, when Z is bonded to Q through the terminal or side-chain amino group of Q. Generally, Z may be a peptide of 2, 3, 4, or 5 residues. Z has the formula: A-B-C-E-F, where A is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, or L-Ser, or deleted; B is D-Lys or D-Tyr, or is deleted; C is Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2,3, or 4) 3-pyridyl-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, or L-4-OH-Pro, or is deleted; E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5
10 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-
15 D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; provided that when A, B, C, and E are Tyr, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Lys; and when A, B, C, and E, are Lys, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys; and when A and B are deleted, and C and E are Lys and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys. In some peptides, it may be preferable that Z is absent.

20 In other embodiments, Z has the formula (when A, B, and C are deleted):

E-F

where E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5
25 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln.

In preferred embodiments, Z is D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 1), D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 2), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr (SEQ ID NO: 3), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 4), D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 5), D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO: 5), D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 6), D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 7), D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 8), Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 9), Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 10), Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO:
30

10), Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 11), Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 12), Pal-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 13), Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 14), D-Ser-D-Lys, D-Ser-D-Tyr, D-Lys-D-Lys, D-Lys-D-Tyr, or D-Tyr-D-Lys.

Q is a targeting moiety, such as a biologically active peptide or phage derived peptides. In preferred embodiments, Q is a peptide, such as somatostatin, a somatostatin analog, bombesin, a bombesin analog, or an antibody, such as a monoclonal antibody. Preferred biologically active peptide or targeting moieties are internalized by select cells via an active internalization process, such as when binding to a G-protein coupled receptor or somatostatin type 2 receptors (SSTR2).

Another aspect of the invention features a method for the treatment of a disease or modification of a biological function. The method includes administering to a warm-blooded animal in need thereof, e.g., a human, a therapeutically effective or biological function modifying amount of a conjugate of the invention. One of skill in the art will recognize that the particular conjugate used will depend on the disease state to be treated or the biological system to be modified. In particular, one skilled in the art will be able to select a particular targeting moiety and cytotoxic or therapeutic agent to prepare a conjugate of the invention which has specificity for the treatment of the disease or is able to modify the biological function desired. In preferred embodiments, the disease is a tumor of the lung, breast, brain, eye, prostate or colon or a tumor of neuroendocrine origin (e.g., carcinoid syndrome). The disease is also a condition that results from or causes proliferation of angiogenic blood vessels.

By "administration" or "administering" is meant a method of giving a dosage of a pharmaceutical composition to a mammal, where the method is, e.g., topical, oral, intravenous, intraperitoneal, or intramuscular. The preferred method of administration can vary depending on various factors, e.g., the components of the pharmaceutical composition, site of the potential or actual disease and severity of disease.

In the generic descriptions of compounds of this invention, the number of atoms of a particular type in a substituent group is generally given as a range. For example, an alkyl group containing from 1 to 8 carbon atoms or C₁₋₈ alkyl. Reference to such a range is intended to include specific references to groups having each of the integer number of atoms within the specified range. For example, an alkyl group from 1 to 8 carbon atoms includes each of C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, and C₈. A C₁₋₈ heteroalkyl, for

example, includes from 1 to 8 carbon atoms in addition to one or more heteroatoms.

Other numbers of atoms and other types of atoms may be indicated in a similar manner.

As used herein, "alkyl", is intended to include aliphatic branched or straight chain hydrocarbon group and combinations thereof. An alkyl is optionally substituted with one or more substituents which may be the same or different. An alkyl group contains 1 to 20 carbon atoms, preferably 1 to 8 carbon atoms. Examples include methyl, ethyl, n-propyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isoamyl, hexyl, octyl and the like. By "lower alkyl" is meant a branched or straight chain alkyl group having fewer than 11 carbon atoms, preferably a C₁-C₈ alkyl. By "lower alkylamide" is meant a lower alkyl group as described above substituted with one or more amide-containing groups. As used herein, the terms "alkyl" and the prefix "alk-" can also refer to cyclic groups, i.e., cycloalkyl and cycloalkenyl groups. Cyclic groups can be monocyclic or polycyclic and preferably have from 3 to 8 ring carbon atoms, inclusive.

The term "alkenyl", alone or in combination, means a straight-chain or branched-chain hydrocarbon having one or more double bonds and containing from 2 to 20 carbon atoms, preferably from 2 to about 8 carbon atoms. The term "alkynyl", alone or in combination, means a straight-chain or branched-chain hydrocarbon having one or more triple bonds and containing from 2 to about 20 carbon atoms, preferably from 2 to 8 carbon atoms.

By "heteroalkyl" is meant a branched or unbranched group in which one or more methylenes (-CH₂-) are replaced by nitrogen, oxygen, sulfur, carbonyl, thiocarbonyl, phosphoryl, sulfonyl, or NR, where R is an alkyl. Some examples include tertiary amines, ethers, thioethers, amides, thioamides, carbamates, thiocarbamates, phosphoramidates, sulfonamides, and disulfides. A heteroalkyl may optionally include monocyclic, bicyclic, or tricyclic rings, in which each ring desirably has three to six members. The heteroalkyl group may be substituted or unsubstituted.

By "analog" is meant a molecule that differs from, but is structurally, functionally, and/or chemically related to the reference molecule. The analog may retain the essential properties, functions, or structures of the reference molecule. Most preferably, the analog retains at least one biological function of the reference molecule. Generally, differences are limited so that the structure or sequence of the reference molecule and the analog are similar overall. A peptide analog and its reference peptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, and/or

deletions, in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code of the peptide analog. An analog of a peptide or polypeptide may be naturally occurring, such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring analogs of peptides may
5 be made by direct synthesis, by modification, or by mutagenesis techniques.

By "biologically-active peptide" is meant any naturally occurring, modified, or synthetic peptide that is involved in a biological process or function. Examples of biologically active peptides include, but are not limited to: hormones, growth factors, neurotransmitters, antigens, antibodies, or fragments thereof.

10 The term "bombesin peptide" is meant bombesin, or an analog thereof, having at least one biological activity of native bombesin; preferably, this activity is the ability to specifically bind to one or all of the three known bombesin receptor subtypes on a bombesin receptor-bearing cell. Bombesin analogs include, but are not limited to, peptides selected from the group containing the octapeptide G-Trp-H-I-His-J-K-NHV
15 (SEQ ID NO: 15), wherein G is Gln, Asn, Nle, or Nva; H is Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva; I is β -Ala, 4-aminobutyric acid, Gly, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, or N-Me-D-Ala; J is Phe, Tyr, 4-Chloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva; K is Met, Phe, Tyr, 4-Chloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva; and N represents an amide or a N-alkylamide
20 and V is H or a lower alkylamide.

By "cyclic" is meant a hydrocarbon group having from 3 to 10 carbons and more preferably from 3 to 6 carbons.

By "cytotoxic agent" is meant any naturally-occurring, modified, or synthetic compound that is toxic to tumor cells. Such agents are useful in the treatment of
25 neoplasms, as well as inflammatory diseases, autoimmune disorders, and in the treatment of other symptoms or diseases characterized by cell proliferation or a hyperactive cell population. Cytotoxic agents include, but are not limited to, alkylating agents, antibiotics, antimetabolites, tubulin inhibitors, topoisomerase I and II inhibitors, hormonal agonists or antagonists, or immunomodulators. Cytotoxic agents may be
30 cytotoxic when activated by light or infrared (Photofrin, IR dyes; Nat. Biotechnol. 19(4):327-331, 2001), may operate through other mechanistic pathways, or be supplementary potentiating agents.

By "hydrophilic biodistribution" is meant the affinity of the peptide agents of the invention for the bodily fluids of a subject administered the peptide agents (e.g., blood, cerebrospinal fluid, urine, or other bodily fluids), such that the peptide agents distribute throughout the body of the subject, but are rapidly secreted in the urine via the kidney, while avoiding uptake by peripheral organs such as liver, gall bladder, and kidney proximal tubules.

By "hydrophilic polymer" is meant a naturally-occurring or synthetic water-soluble polymer optionally modified that alters the biodistribution of a peptide agent of the invention. Examples of such polymers include, but are not limited to poly(ethylene glycol) (PEG), poly(vinyl alcohol) (PVA), polyvinyl acetate, dextran, hydroxyethyl starch, gelatin, PVP, PHPMA, α , β -poly[N(2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide (PHEA), polysuccinamide (PSI), α , β -poly(N-hydroxypropyl)-DL-aspartamide, etc. These polymers may be modified by, for example, succinylation (negative charge), partial hydrolysis of PSI (carboxylic groups), or reaction with compounds to add amino- or carboxyl- containing groups, etc. Such optional modifications may increase or change the hydrophilicity of the polymer, or enable coupling to the peptide or cytotoxic or therapeutic agent of the invention. Such polymers and modifications are known in the art and are described in, for example, Yamoaka et al., J. Pharmacol. Sci. 83:601-606, 1994; Rypacek et al., Pflugers Arch. 392:211-217, 1982; Yamoaka et al., J. Pharm. Pharmacol. 47:479-486, 1995; Francesco, Bioconjugate Chemistry 9(4):418-450, 1998; Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27(4):290-306, 1994; each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

By "hydrophilic spacer sequence" is meant an hydrophilic peptide or hydrophilic polymer that increases biodistribution of a compound of the invention, such as by inhibiting peripheral accumulation and/or promoting renal clearance. Examples of hydrophilic spacer sequences for use with the present invention are provided herein.

By "peptide" is meant any polypeptide, peptide (including cyclic or branched peptides), or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds. As used herein, peptide refers to short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, up to about 100 residues in length. Peptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids, and linkages other than peptide bonds. Peptides include amino acid sequences modified either by natural processes, or by chemical modification

techniques that are well known in the art. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains, and the amino or carboxyl termini.

The notations used herein for the peptide amino acid residues are those abbreviations commonly used in the art. The less common abbreviations Abu, Ava, β -Ala, hSer, Nle, Nva, Pal, Dab, and Dap stand for 2-amino-butyric acid, amino valeric acid, beta-aminopropionic acid, homoserine, norleucine, norvaline, (2, 3, or 4) 3-pyridyl-Ala, 1,4-diaminobutyric acid, and 1,3-diaminopropionic acid, respectively. In all aspects of the invention, it is noted that when amino acids are not designated as either D- or L-amino acids, the amino acid is either an L-amino acid or could be either a D- or L-amino acid, unless the context requires a particular isomer.

By "somatostatin peptide" is meant a somatostatin, or an analog thereof, having at least one biological activity of native somatostatin; preferably, this activity is the ability to specifically bind to a somatostatin receptor on a somatostatin receptor-bearing cell. Many such analogs having biological activity are known and have been described, for example, in Hornik et al., U.S.P.N. 5,770,687; Coy et al., U.S.P.N. 5,708,135; Hoeger et al., U.S.P.N. 5,750,499; McBride et al., U.S.P.N. 5,620,675; Coy et al., U.S.P.N. 5,633,263; Coy et al., U.S.P.N. 5,597,894; Taylor et al., U.S.P.N. 5,073,541; Coy et al., U.S.P.N. 4,904,642; Dean, U.S.P.N. 6,017,509; Hoffman et al., WO 98/47524; and A. E. Bogden, U.S.P.N. 5,411,943, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

By "targeting moiety" is meant any molecule that specifically binds or reactively associates or complexes with a receptor or other receptive moiety associated with a given target cell population. This cell reactive molecule, to which the drug reagent is linked via the linker in the conjugate, can be any molecule that binds to, complexes with or reacts with the cell population sought to be therapeutically or otherwise biologically modified and, which possesses a free reactive amine group or can be modified to contain a such an amine group. The cell reactive molecule acts to deliver the conjugate, and, thus, the cytotoxic or therapeutic agent to the particular target cell population with which the ligand reacts. Such molecules include, but are not limited to, large molecular weight proteins (generally greater than 10,000 daltons) such as, for example, antibodies, smaller molecular weight proteins (generally, less than 10,000 daltons), polypeptide or peptide ligands, and non-peptidyl ligands.

By "therapeutic agent" is meant any compound that is used in the detection, diagnosis or treatment of human disease. Such compounds may be naturally-occurring, modified, or synthetic. Therapeutic agents may promote or inhibit any biological process implicated in a human disease pathway. Preferred disease targets include, but are not limited to, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, neoplastic cells apoptosis, cardiac tissues, or aberrantly proliferating cells, carcinoid syndrome, acromegaly, tuberculosis, and angiogenesis that causes inappropriate proliferation of blood vessels (e.g., macular degeneration which results from excess angiogenesis in the eye). A therapeutic agent may be, for example, antineoplastic, including cytotoxic.

Antineoplastic agents may be alkylating agents, antibiotics, antimetabolites, hormonal agonists or antagonists, tubulin inhibitors, topoisomerase I and II inhibitors, anti- or pro-apoptotic agents, or immunomodulators. Antineoplastic agents may operate through other mechanistic pathways, or antineoplastic agents may be supplementary potentiating agents.

By "treating" is meant administering a pharmaceutical composition for prophylactic and/or therapeutic purposes. To "prevent disease" refers to prophylactic treatment of a patient who is not yet ill, but who is susceptible to, or otherwise at risk of, a particular disease. To "treat disease" or use for "therapeutic treatment" refers to administering treatment to a patient already suffering from a disease to ameliorate the disease and improve the patient's condition. Thus, in the claims and embodiments, treating is the administration to a mammal either for therapeutic or prophylactic purposes.

Brief Description of the Drawings

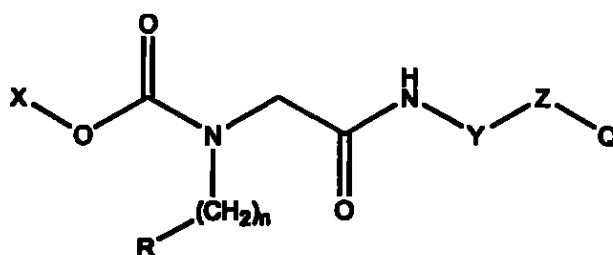
Figure 1 is a diagram demonstrating the on-resin synthesis of a BINAR group-containing somatostatin analogue and attachment of camptothecin via a carbamate linking group followed by removal from the resin to give compound 2. Basic conditions or enzymatic attack results in nucleophile-assisted release of free camptothecin.

Figure 2 is a graph demonstrating the dose-response curve for conjugates 1-6 and showing the ability of conjugates 1-6 to kill somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) positive IMR-32 cells after incubation for 3 days using a cell viability MTT assay.

Detailed Description of the Invention

The present invention features conjugates of cytotoxic or therapeutic agents and biologically peptides. These conjugates provide many advantages for the administration of such cytotoxic or therapeutic agents. Conjugates of the invention may be directed to target sites or specific cells, resulting in effective internalization of the cytotoxic or therapeutic agent. In addition, conjugates of the invention exhibit reduced release of cytotoxic or therapeutic agent in circulation. Conjugates of the invention may be modified as desired to adjust the release of cytotoxic or therapeutic agent.

Conjugates of the invention have the following general formula:



wherein X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

n is an integer from 0 to 6, wherein $(\text{CH}_2)_n$ is substituted or unsubstituted, straight or branched chain, alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic.

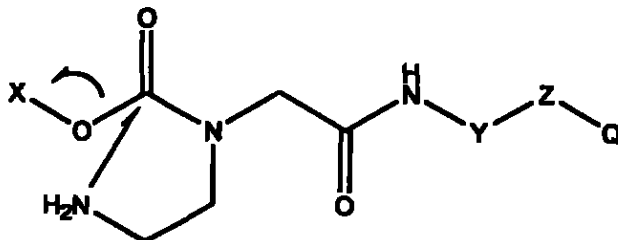
R is $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$, OR_1 , or SR_1 where R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group;

Y is an hydrophilic spacer sequence, or is omitted;

Z is a linking peptide, or is omitted; and

Q is a targeting moiety.

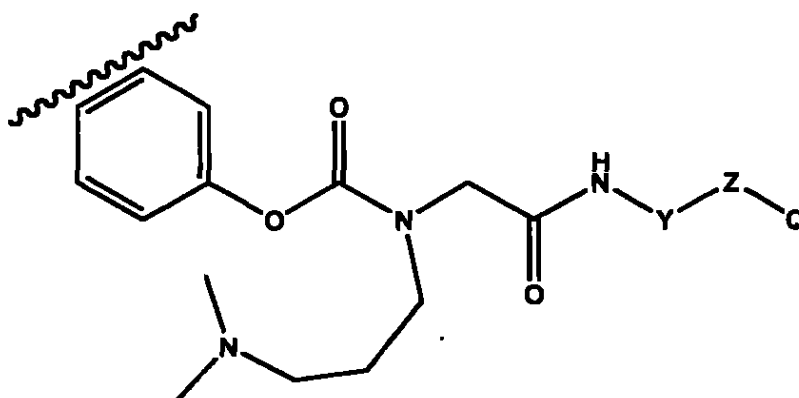
According to the present invention, the release rate of cytotoxic agent may be controlled by modifying the chemical structure of the conjugate. For example, when R is NH_2 and $n = 2$, the following displacement reaction can occur:



Without wishing to be bound by any theory, in the above mechanism, the nucleophilic group aids in the intracellular release of cytotoxic or therapeutic agent (as "X-OH") in an adjustable fashion dependent on n. The reactivity of the nucleophile may be increased or decreased according to the length of the hydrocarbon side chain, i.e.,

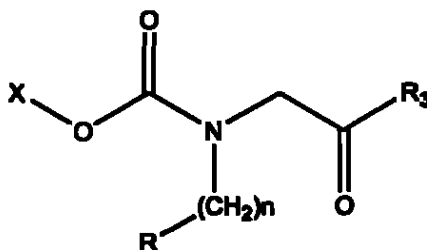
5 according to the value of n, or by changing R to NCH₃, OH, or N(CH₃)₂. For example, n = 2 is preferable when the cytotoxic group is bound to the carbamate linkage through an alkyl-OH group, e.g., camptothecin, homocamptothecin, colchicine, combretastatin, dolistatin, doxorubicin, methotrexate, podophyllotoxin, rhizoxin, rhizixin D, rocaglamide, anguidine, a taxol, paclitaxol, CC1065, or a maytansinoid. However,

10 when the cytotoxic group is bound through an aryl-OH group (e.g., combretastatin or rocaglamide) R is N(CH₃)₂ and n = 3 is preferable:



15 Thus, it is apparent from the teachings herein that conjugates of the invention may be designed to control the release of the cytotoxic or therapeutic agent.

The invention also features a compound having the formula:

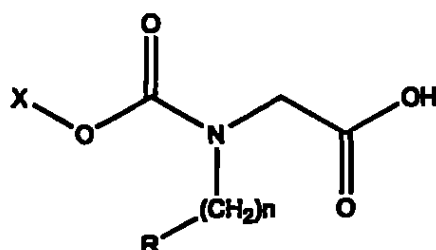


20 wherein

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

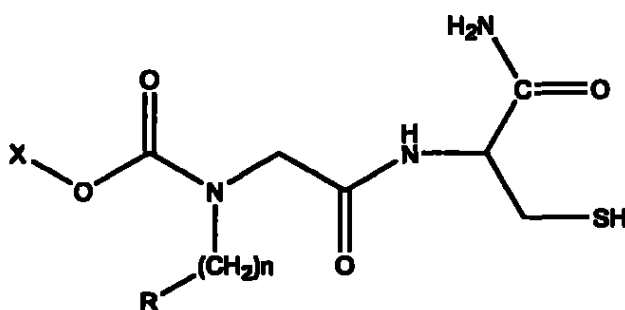
n is an integer from 0 to 6, wherein $(CH_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

R is $N(R_1R_2)$, OR_1 , or SR_1 where R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group, and wherein R_3 is a $(CH_2)SH$ group or an OH group. For example, a compound having the formula:



can be used to link the compound to a peptide, protein, or antibody. In addition, a peptide or protein can be directly synthesized onto this conjugate, thereby providing an easy means of preparing conjugate compounds containing a peptide or protein. The compound can be provided such that the R group is a t Boc protected primary or secondary amino group, and a peptide or protein can be added to the compound as described in the examples provided below.

Peptides, proteins, and antibodies can also be attached to a compound having the formula:



This unprotected R derivative can be used to link peptides, proteins, and antibodies using known thiol-reactive chemical reactions that attach to the thiol moiety at the R_3 position (see, e.g., Greg T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques" p. 146-152, 1996, and EXAMPLE 21 below).

24

In all of the conjugates of the invention, X is preferably selected from cytotoxic agents and therapeutic agents containing a primary, secondary, tertiary, benzylic or phenolic hydroxyl group. One skilled in the art will recognize that, for those cytotoxic or therapeutic agents which lack a hydroxyl group, a derivative containing such a hydroxyl group may be prepared using procedures known in the art.

Preferred cytotoxic agents are those used for cancer therapy, such as, in general, alkylating agents, anti-proliferative agents, tubulin binding agents and the like. Preferred classes of cytotoxic agents include, for example, the anthracycline family of drugs, the vinca drugs, the mitomycins, the bleomycins, the cytotoxic nucleosides, the pteridine family of drugs, diynenes, and the podophyllotoxins. Particularly useful members of those classes include, for example, adriamycin, carminomycin, daunorubicin, aminopterin, methotrexate, methopterin, dichloromethotrexate, mitomycin C, porfiromycin, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurine, cytosine arabinoside, podophyllotoxin, or podophyllotoxin derivatives such as etoposide or etoposide phosphate, melphalan, vinblastine, vincristine, leurosidine, vindesine, leurosine and the like. As noted previously, one skilled in the art may make chemical modifications to the desired compound in order to make reactions of that compound more convenient for purposes of preparing conjugates of the invention. In preferred embodiments, X is a cytotoxic agent selected from camptothecin, homocamptothecin, colchicine, combretastatin, dolistatin, doxorubicin, methotrexate, podophyllotoxin, rhizoxin, rhizoxin D, a taxol, paclitaxol, CC1065, or a maytansinoid, and derivatives and analogs thereof. For example, the cytotoxic agent camptothecin is linked through its single free hydroxyl group to a carbamate linker and thiocolchicine can be derivatized such that it contains a hydroxy group suitable for use of the described linking group strategy. In this embodiment of the invention, n is preferably 2 and R is preferably NH₂.

In conjugates of the present invention, X can be any cytotoxic or therapeutic moiety, e.g., Antineoplastic agents such as: Acivicin; Aclarubicin; Acodazole Hydrochloride; Acronine; Adozelesin; Adriamycin; Aldesleukin; Altretamine; Ambomycin; A. metantrone Acetate; Aminoglutethimide; Amsacrine; Anastrozole; Anthramycin; Asparaginase; Asperlin; Azacitidine; Azetepa; Azotomycin; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamide; Bisantrone Hydrochloride; Bisanafide Dimesylate; Bizelesin; Bleomycin Sulfate; Brequinar Sodium; Bropiramine; Busulfan; Cactinomycin; Calusterone; Camptothecin; Caracemide; Carbetimer; Carboplatin; Carmustine;

Carubicin Hydrochloride; Carzelesin; Cedefingol; Chlorambucil; Cirolemycin;
 Cisplatin; Cladribine; Colchicine; Combretastatin A-4; Crisnatol Mesylate;
 Cyclophosphamide; Cytarabine; Dacarbazine; DACA (N- [2- (Dimethyl-amino) ethyl]
 acridine-4-carboxamide); Dactinomycin; Daunorubicin Hydrochloride; Daunomycin;
 5 Decitabine; Dexormaplatin; Dezaguanine; Dezaguanine Mesylate; Diaziquone;
 Docetaxel; Dolasatins; Doxorubicin; Doxorubicin Hydrochloride; Droloxifene;
 Droloxifene Citrate; Dromostanolone Propionate; Duazomycin; Edatrexate; Eflornithine
 Hydrochloride; Ellipticine; Elsamitrucin; Enloplatin; Enpromate; Epiropidine;
 Epirubicin Hydrochloride; Erbulozole; Eserubicin Hydrochloride; Estramustine;
 10 Estramustine Phosphate Sodium; Etanidazole; Ethiodized Oil I 131; Etoposide;
 Etoposide Phosphate; Etoprine; Fadrozole Hydrochloride; Fazarabine; Fenretinide;
 Floxuridine; Fludarabine Phosphate; Fluorouracil; 5-FdUMP; Flurocitabine;
 Fosquidone; Fostriecin Sodium; Gemcitabine; Gemcitabine Hydrochloride; Gold Au
 198; Homocamptothecin; Hydroxyurea; Idarubicin Hydrochloride; Ifosfamide;
 15 Ilmofoosine; Interferon Alfa-2a; Interferon Alfa-2b; Interferon Alfa-n1; Interferon Alfa-
 n3; Interferon Beta-I a; Interferon Gamma-I b; Iproplatin; Irinotecan Hydrochloride;
 Lanreotide Acetate; Letrozole; Leuprolide Acetate; Liarozole Hydrochloride;
 Lometrexol Sodium; Lomustine; Losoxantrone Hydrochloride; Masoprocol;
 Maytansine; Mechlorethamine Hydrochloride; Megestrol Acetate; Melengestrol
 20 Acetate; Melphalan; Menogaril; Mercaptopurine; Methotrexate; Methotrexate Sodium;
 Metoprine; Meturedapa; Mitindomide; Mitocarcin; Mitocromin; Mitogillin; Mitomalcin;
 Mitomycin; Mitosper; Mitotane; Mitoxantrone Hydrochloride; Mycophenolic Acid;
 Nocodazole; Nogalamycin; Ormaplatin; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargase; Peliomycin;
 Pentamustine; Peploycin Sulfate; Perfosamide; Pipobroman; Pipo sulfan; Piroxantrone
 25 Hydrochloride; Plicamycin; Plomestane; Porfimer Sodium; Porfiriomycin;
 Prednimustine; Procarbazine Hydrochloride; Puromycin; Puromycin Hydrochloride;
 Pyrazofurin; Rhizoxin; Rhizoxin D; Riboprine; Rogletimide; Safingol; Safingol
 Hydrochloride; Semustine; Simtrazene; Sparfosate Sodium; Sparsomycin;
 Spirogermanium Hydrochloride; Spiromustine; Spiroplatin; Streptonigrin; Streptozocin;
 30 Strontium Chloride Sr 89; Sulofenur; Talisomycin; Taxane; Taxoid; Tecogalan Sodium;
 Tegafur; Teloxantrone Hydrochloride; Temoporfin; Teniposide; Teroxirone;
 Testolactone; Thiocolchicine; Thiamiprine; Thioguanine; Thiotepa; Thymitaq;
 Tiazofurin; Tirapazamine; Tomudex; TOP53; Topotecan Hydrochloride; Toremifene

Citrate; Trestolone Acetate; Triciribine Phosphate; Trimetrexate; Trimetrexate
 Glucuronate; Triptorelin; Tubulozole Hydrochloride; Uracil Mustard; Uredapa;
 Vapreotide; Verteporfin; Vinblastine; Vinblastine Sulfate; Vincristine; Vincristine
 Sulfate; Vindesine; Vindesine Sulfate; Vinepidine Sulfate; Vinglycinatate Sulfate;
 5 Vinleurosine Sulfate; Vinorelbine Tartrate; Vinrosidine Sulfate; Vinzolidine Sulfate;
 Vorozole; Zeniplatin; Zinostatin; Zorubicin Hydrochloride; 2-Chlorodeoxyadenosine; 2'
 Deoxyformycin; 9-aminocamptothecin; raltitrexed; N-propargyl-5,8-dideazafolic acid;
 2chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine; 2-chloro-2'-deoxyadenosine; amisomycin;
 trichostatin A; hPRL-G129R; CEP-751; linomide; sulfur mustard; nitrogen mustard
 10 (mechlorethamine); cyclophosphamide; melphalan; chlorambucil; ifosfamide; busulfan;
 N-methyl-N-nitrosourea (MNU); N, N'-Bis (2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU); N-
 (2-chloroethyl)-N' cyclohexyl-N-nitrosourea (CCNU); N- (2-chloroethyl)-N'- (trans-4-
 methylcyclohexyl)-N-nitrosourea (MeCCNU); N- (2-chloroethyl)-N'- (diethyl)
 ethylphosphonate-N-nitrosourea (fotemustine); streptozotocin; diacarbazine (DTIC);
 15 mitozolomide; temozolomide; thiotepa; mitomycin C; AZQ; adozelesin; Cisplatin;
 Carboplatin; Ormaplatin; Oxaliplatin; C1-973; DWA 2114R; JM216; JM335; Bis
 (platinum); tomudex; azacitidine; cytarabine; gemcitabine; 6-Mercaptopurine; 6-
 Thioguanine; Hypoxanthine; teniposide 9-amino camptothecin; Topotecan; CPT-11;
 Doxorubicin; Daunomycin; Epirubicin; darubicin; mitoxantrone; losoxantrone;
 20 Dactinomycin (Actinomycin D); amsacrine; pyrazoloacridine; all-trans apthal; 14-
 hydroxy-retro-retinol; all-trans retinoic acid; N- (4- Hydroxyphenyl) retinamide; 13-cis
 retinoic acid; 3-Methyl TTNEB; 9-cis retinoic acid; fludarabine (2-F-ara-AMP); or 2-
 chlorodeoxyadenosine (2-Cda).

Other suitable anti-neoplastic compounds include, but are not limited to, 20-pi-
 25 1,25 dihydroxyvitamin D3; 5-ethynyluracil; abiraterone; aclarubicin; acylfulvene;
 adecypenol; adozelesin; aldesleukin; all-tyrosine kinase antagonists; altretamine;
 ambamustine; amidox; amifostine; aminolevulinic acid; amrubicin; amsacrine;
 anagrelide; anastrozole; andrographolide; angiogenesis inhibitors; antagonist D;
 antagonist G; antarelix; anti-dorsalizing morphogenetic protein-1; antiandrogen,
 30 prostatic carcinoma; antiestrogen; antineoplaston; antisense oligonucleotides;
 aphidicolin glycinate; apoptosis gene modulators; apoptosis regulators; apurinic acid;
 ara-CDP-DL-PTBA; argininedeaminase; asulacrine; atamestane; atrimustine; axinastatin
 1; axinastatin 2; axinastatin 3; azasetron; azatoxin; azatyrosine; baccatin III derivatives;

balanol; batimastat; BCR/ABL antagonists; benzochlorins; benzoylstaurosporine; beta
 lactam derivatives; beta-alethine; betaclamycin B; betulinic acid; basic fibroblast growth
 factor (bFGF) inhibitor; bicalutamide; bisantrene; bisaziridinylspermine; bisnafide;
 bistratene A; bizelesin; breflate; bleomycin A2; bleomycin B2; broprimine; budotitane;
 5 buthionine sulfoximine; calcipotriol; calphostin C; camptothecin derivatives (e. g., 10-
 hydroxy-camptothecin); canarypox IL-2; capecitabine; carboxamide-amino-triazole;
 carboxyamidotriazole; CaRest M3; CARN 700; cartilage derived inhibitor; carzelesin;
 casein kinase inhibitors (ICOS); castanospermine; cecropin B; cetrorelix; chlorins;
 chloroquinoxaline sulfonamide; cicaprost; cis-porphyrin; cladribine; clomifene
 10 analogues; clotrimazole; colliamycin A; colliamycin B; combretastatin A4;
 combretastatin analogue; conagenin; crambescidin 816; crisnatol; cryptophycin 8;
 cryptophycin A derivatives; curacin A; cyclopentantraquinones; cycloplatam;
 cypemycin; cytarabine ocfosfate; cytolytic factor; cytosatin; dacliximab; decitabine;
 dehydrodidemnin B; 2'-deoxycoformycin (DCF); daslorelin; dexifosfamide;
 15 dextrazoxane; dexverapamil; diaziquone; didemnin B; didox; diethylnorspermine;
 dihydro-5-azacytidine; dihydrotaxol, 9- ; dioxamycin; diphenyl spiromustine;
 discodermolide; docosanol; dolasetron; doxifluridine; droloxifene; dronabinol;
 duocarmycin SA; ebselen; ecomustine; edelfosine; edrecolomab; eflornithine; elemene;
 emitefur; epirubicin; epothilones (A, R = H; B, R = Me); epithilones; epristeride;
 20 estramustine analogue; estrogen agonists; estrogen antagonists; etanidazole; etoposide;
 etoposide 4'-phosphate (etopofos); exemestane; fadrozole; fazarabine; fenretinide;
 filgrastim; finasteride; flavopiridol; flezelastine; fluasterone; fludarabine;
 fluorodaunorubicin hydrochloride; forfenimex; formestane; fostriecin; fotemustine;
 gadolinium texaphyrin; gallium nitrate; galocitabine; ganirelix; gelatinase inhibitors;
 25 gemcitabine; glutathione inhibitors; hepsulfam; heregulin; hexamethylene bisacetamide;
 homoharringtonine (HHT); hypericin; ibandronic acid; idarubicin; idoxifene;
 idramantone; ilmofofene; ilomastat; imidazoacridones; imiquimod; immunostimulant
 peptides; insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor; interferon agonists; interferons;
 interleukins; iobenguane; iododoxorubicin; ipomeanol, 4- ; irinotecan; iroplact;
 30 irsogladine; isobengazole; isohomohalicondrin B; itasetron; jasplakmolide; kahalalide F;
 lamellarin-N triacetate; lanreotide; leinamycin; lenograstim; lentinan sulfate;
 leptolstatin; letrozole; leukemia inhibiting factor; leukocyte alpha interferon; leuprolide
 + estrogen + progesterone; leuprorelin; levamisole; liarozole; linear polyamine

analogue; lipophilic disaccharide peptide; lipophilic platinum compounds;
 liasoclinamide 7; lobaplatin; lombricine; lometrexol; lonidamine; losoxantrone;
 lovastatin; loxoribine; lurtotecan; lutetium texaphyrin; lysofylline; lytic peptides;
 maytansine; mannostatin A; marimastat; masoprocol; maspin; matrilysin inhibitors;
 5 matrix metalloproteinase inhibitors; menogaril; merbarone; meterelin; methioninase;
 metoclopramide; MIF inhibitor; ifepristone; miltefosine; mirimostim; mismatched
 double stranded RNA; mithracin; mitoguazone; mitolactol; mitomycin analogues;
 mitonafide; mitotoxin fibroblast growth factor-saporin; mitoxantrone; mofarotene;
 molgramostim; monoclonal antibody, human chorionic gonadotrophin; monophosphoryl
 10 lipid A + myobacterium cell wall sk; mopidamol; multiple drug resistance gene
 inhibitor; multiple tumor suppressor 1-based therapy; mustard anticancer agent;
 mycaperoxide B; mycobacterial cell wall extract; myriaporone; N-acetyldinaline; N-
 substituted benzamides; nafarelin; nagrestip; naloxone + pentazocine; napavin;
 naphterpin; nartograstim; nedaplatin; nemorubicin; neridronic acid; neutral
 15 endopeptidase; nilutamide; nisamycin; nitric oxide modulators; nitroxide antioxidant;
 nitrullin; 06-benzylguanine; octreotide; okicenone; oligonucleotides; onapristone;
 ondansetron; ondansetron; oracin; oral cytokine inducer; ormaplatin; osaterone;
 oxaliplatin; oxaunomycin; paclitaxel analogues; paclitaxel derivatives; palauamine;
 palmitoylrhizoxin; pamidronic acid; panaxytriol; panomifene; parabactin; pazelliptine;
 20 pegaspargase; peldesine; pentosan polysulfate sodium; pentostatin; pentrozole;
 perflubron; perfosamide; perillyl alcohol; phenazinomycin; phenylacetate; phosphatase
 inhibitors; picibanil; pilocarpine hydrochloride; pirarubicin; piritrexim; placetin A;
 placetin B; plasminogen activator inhibitor; platinum complex; platinum compounds;
 platinum-triamine complex; podophyllotoxin; porfimer sodium; porfiromycin; propyl
 25 bis-acridone; prostaglandin J2; proteasome inhibitors; protein A-based immune
 modulator; protein kinase C inhibitor; protein kinase C inhibitors, microalgal; protein
 tyrosine phosphatase inhibitors; purine nucleoside phosphorylase inhibitors; purpurins;
 pyrazoloacridine; pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate; raf antagonists;
 raltitrexed; ramosetron; ras farnesyl protein transferase inhibitors; ras inhibitors; ras-
 30 GAP inhibitor; retelliptine demethylated; rhenium Re 186 etidronate; rhizoxin;
 ribozymes; RII retinamide; rogletimide; rohitukine; romurtide; roquinimex; rubiginone
 B 1; ruboxyl; safingol; saintopin; SarCNU; sarcophytol A; sargramostim; Sdi 1
 mimetics; semustine; senescence derived inhibitor 1; sense oligonucleotides; signal

transduction inhibitors; signal transduction modulators; single chain antigen binding protein; sizofiran; sobuzoxane; sodium borocaptate; sodium phenylacetate; solverol; somatomedin binding protein; sonermin; sparfosic acid; spicamycin D; spiromustine; splenopentin; spongistatin 1; squalamine; stem cell inhibitor; stem-cell division inhibitors; stipiamide; stromelysin inhibitors; sulfinosine; superactive vasoactive intestinal peptide antagonist; suradista; suramin; swainsonine; synthetic glycosaminoglycans; tallimustine; tamoxifen methiodide; tauromustine; tazarotene; tecogalan sodium; tegafur; tellurapyrylium; telomerase inhibitors; temoporfin; temozolomide; teniposide; tetrachlorodecaoxide; tetrazomine; thaliblastine; thalidomide; thiocoraline; thrombopoietin; thrombopoietin mimetic; thymalfasin; thymopoietin receptor agonist; thymotrinan; thyroid stimulating hormone; tin ethyl etiopurpurin; tirapazamine; titanocene dichloride; topotecan; topaentin; toremifene; totipotent stem cell factor; translation inhibitors; tretinoin; triacetyluridine; triciribine; trimetrexate; triptorelin; tropisetron; turosteride; tyrosine kinase inhibitors; tyrphostins; UBC inhibitors; ubenimex; urogenital sinus-derived growth inhibitory factor; urokinase receptor antagonists; vapreotide; variolin B; vector system, erythrocyte gene therapy; velaresol; veramine; verdina; verteporfin; vinorelbine; vinxaltine; vitaxin; vorozole; zanoterone; zeniplatin; zilascorb; and zinostatin stimalamer.

X may also be an antiproliferative agent, for example piritrexim isothionate.

Alternatively, X may be an antiprostatic hypertrophy agent such as, for example, sitogluside, a benign prostatic hyperplasia therapy agent such as, for example, tamsulosin hydrochloride, or a prostate growth inhibitor such as, for example, pentomone.

X can also be a radioactive agent, including, but not limited to: Fibrinogen ^{125}I ; Fludeoxyglucose ^{18}F ; Fluorodopa ^{18}F ; Insulin ^{125}I ; Insulin ^{131}I ; lobenguane ^{123}I ; Iodipamide Sodium ^{131}I ; Iodoantipyrine ^{131}I ; Iodocholesterol ^{131}I ; Iodohippurate Sodium ^{123}I ; Iodohippurate Sodium ^{125}I ; Iodohippurate Sodium ^{131}I ; Iodopyracet ^{125}I ; Iodopyracet ^{131}I ; lofetamine Hydrochloride ^{123}I ; Iomethin ^{125}I ; Iomethin ^{131}I ; Iothalamate Sodium ^{125}I ; Iothalamate Sodium ^{131}I ; tyrosine ^{131}I ; Liothyronine ^{125}I ; Liothyronine ^{131}I ; Merisoprol Acetate ^{197}Hg ; Merisoprol Acetate ^{203}Hg ; Merisoprol ^{197}Hg ; Selenomethionine ^{75}Se ; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Antimony Trisulfide Colloid; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Bicisate; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Disofenin; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Etidronate; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Exametazime; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Furifosmin; Technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Gluceptate;

Technetium ^{99m}Tc Lidofenin; Technetium ^{99m}Tc Mebrofenin; Technetium ^{99m}Tc Medronate; Technetium ^{99m}Tc Medronate Disodium; Technetium ^{99m}Tc Mertiatide; Technetium ^{99m}Tc Oxidronate; Technetium ^{99m}Tc Pentetate; Technetium ^{99m}Tc Pentetate Calcium Trisodium; Technetium ^{99m}Tc Sestamibi; Technetium ^{99m}Tc Siboroxime; 5 Technetium ^{99m}Tc; Succimer; Technetium ^{99m}Tc Sulfur Colloid; Technetium ^{99m}Tc Teboroxime; Technetium ^{99m}Tc Tetrofosmin; Technetium ^{99m}Tc Tiatide; Thyroxine ¹²⁵I; Thyroxine ¹³¹I; Tolpovidone ¹³¹I; Triolein ¹²⁵I; or Triolein ¹³¹I.

Other suitable therapeutic or cytotoxic agents used in conjugate of the invention include, for example, anti-cancer Supplementary Potentiating Agents, including, but not 10 limited to: Tricyclic anti-depressant drugs (e.g., imipramine, desipramine, amitriptyline, clomipramine, trimipramine, doxepin, nortriptyline, protriptyline, amoxapine and maprotiline); non-tricyclic anti-depressant drugs (e.g., sertraline, trazodone and citalopram); Ca++ antagonists (e.g., verapamil, nifedipine, nitrendipine and caroverine); Calmodulin inhibitors (e.g., prenylamine, trifluoroperazine and clomipramine); 15 Amphotericin B; Triparanol analogues (e.g., tamoxifen); antiarrhythmic drugs (e.g., quinidine); antihypertensive drugs (e.g., reserpine); Thiol depleters (e.g., buthionine and sulfoximine) and Multiple Drug Resistance reducing agents such as Cremaphor RL.

The conjugates of the invention also can be administered with cytokines such as granulocyte colony stimulating factor. Preferred anticancer agents used in anti-cancer 20 cocktails (e.g., in combination with the agents of the invention) include (some with their MTDs shown in parentheses): gemcitabine (1000 mg/m²); methotrexate (15 gm/m² i.v. + leuco. < 500 mg/m² i.v. w/o leuco); 5-FU (500 mg/m²/day x 5days); FUDR (100 mg/kg x 5 in mice, 0.6 mg/kg/day in human i.a.); FdUMP; Hydroxyurea (35 mg/kg/d in man); Docetaxel (60-100 mg/m²); discodermolide; epothilones; vincristine (1.4 mg/m²); 25 vinblastine (escalating: 3.3-11.1mg/m², or rarely to 18.5 mg/m²); vinorelbine (30 mg/m²/wk); meta-pac; irinotecan (50-150 mg/m², 1 x/wk depending on patient response); SN-38 (-100 times more potent than Irinotecan); 10-OH campto; topotecan (1.5 mg/m²/day in humans, 1 x iv LdlOmice=75 mg/m²); etoposide (100 mg/m² in man); adriamycin; flavopiridol; Cis-Pt (100mg/m² in man); carbo-Pt (360 mg/m² in man); 30 bleomycin (20 mg/m²); mitomycin C (20 mg/m²); mithramycin (30 sug/kg); capecitabine (2.5 g/m² orally); cytarabine (100 mg/m²/day); 2-Cl-2'deoxyadenosine; Fludarabine-P04 (25 mg/m²/day, x 5days); mitoxantrone (12-14 mg/m²); mitozolomide (> 400 mg/m²); Pentostatin; and Tomudex.

X may preferably be an antimetabolic agent, such as methotrexate.

Antimetabolites include, but are not limited to, the following compounds and their derivatives: azathioprine, cladribine, cytarabine, dacarbazine, fludarabine phosphate, fluorouracil, gencitabine chlorhydrate, mercaptopurine, methotrexate, mitobronitol, mitotane, proguanil chlorhydrate, pyrimethamine, raltitrexed, trimetrexate glucuronate, urethane, vinblastine sulfate, vincristine sulfate, etc. More preferably, X may be a folic acid-type antimetabolite, a class of agents that includes, for example, methotrexate, proguanil chlorhydrate, pyrimethamine, trimethoprine, or trimetrexate glucuronate, or derivatives of these compounds.

10 In another embodiment, X can also be a member of the anthracycline family of neoplastic agents, including but not limited to aclarubicine chlorhydrate, daunorubicine chlorhydrate, doxorubicine chlorhydrate, epirubicine chlorhydrate, idarubicine chlorhydrate, pirarubicine, or zorubicine chlorhydrate. Furthermore, X may be a camptothecin, or its derivatives or related compounds such as 10, 11 methylenedioxycamptothecin. X may also be selected from the maytansinoid family of compounds, which includes a variety of structurally related compounds. For example, ansamitocin P3, maytansine, 2'-N-demethylmaytanbutine, or maytanbicyclinol are maytansinoids.

Y is an hydrophilic spacer sequence that may be, preferably, a peptide that increases the biodistribution of the conjugate, or a hydrophilic polymer. For example, Y may be a peptide sequence that increases the hydrophilic biodistribution of the biologically active peptide conjugate. In a preferred embodiment, Y has the formula $U(V-V)_n$, wherein U is D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosine, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, or (NH₂-(CH₂)_m-COOH), where m=2-10, inclusive, or is deleted; each V is independently selected from the group consisting of: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, or L-4 hydroxy-Pro; and n=1-50, inclusive. In another preferred embodiment, each V is independently D-Ser or L-Ser. In another preferred embodiment, at least one V is a D-amino acid.

Following the teachings herein, Y may be selected to facilitate biodistribution of a conjugate of the invention. Y may be a peptide or a polymer such as PEG or PVA. If Y is a hydrophilic peptide, Y may preferably be 1 to 50 amino acids in length, or more preferably 3 to 15 residues in length. For example, Y may be 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20 amino acid residues in length. When a peptide, Y

may contain charged or non-polar amino acids, their analogs or derivatives that are naturally occurring, synthetic or modified.

Y can also be a hydrophilic polymer. For example, Y may be polyethylene glycol (PEG), polyvinyl acetate, polyvinyl alcohol (PVA), N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) or HPMA copolymers, α,β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide (PHEA), or α,β -poly(N-hydroxypropyl)-DL-aspartamide. PEG, PHEA, and PVA groups used in conjugates of the invention are also known to be excellent promoters of rapid renal secretion which is correlated generally with lower potential drug toxicities (see, e.g., Yamoaka et al., *J. Pharmacol. Sci.*, 83:601-606, 1994; Rypacek et al., *Pflugers Arch.*, 392:211-217, 1982; Yamoaka et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 47:479-486, 1995). These groups may also promote lowered toxicity emanating from bioavailable, non-internalized conjugates.

Z is a linking peptide that preserves at least fifty percent of the biological activity of Q, when Z is bonded to Q through the terminal or side-chain amino group of Q. Generally, Z may be a peptide of 2, 3, 4, or 5 residues. Z has the formula: A-B-C-E-F, where A is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, or L-Ser, or deleted; B is D-Lys or D-Tyr, or is deleted; C is Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2,3, or 4) 3-pyridyl-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, or L-4-OH-Pro, or is deleted; E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; provided that when A, B, C, and E are Tyr, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Lys; and when A, B, C, and E, are Lys, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys; and when A and B are deleted, and C and E are Lys and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys.

In other embodiments, Z has the formula (when A, B, and C are deleted):

E-F

where E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-

Tyr, 3-5 aspartate-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln.

In preferred embodiments, Z is D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 1), D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 2), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr (SEQ ID NO: 3), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 4), D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 5), D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO: 5), D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 6), D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 7), D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 8), Lys-D-Ser-D-Ser (SEQ ID NO: 9), Ser-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 10), Ser-D-Lys-Ser (SEQ ID NO: 10), Nle-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 11), Lys-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 12), Pal-D-Lys-D-Ser (SEQ ID NO: 13), Thr-D-Tyr-D-Ser (SEQ ID NO: 14), D-Ser-D-Lys, D-Ser-D-Tyr, D-Lys-D-Lys, D-Lys-D-Tyr, or D-Tyr-D-Lys.

Q is a targeting moiety, such as a biologically active peptide. Non-immunoreactive protein, polypeptide, or peptide ligands which can be used to form the conjugates of this invention include, but are not limited to, transferrin, epidermal growth factors ("EGF"), bombesin, gastrin, gastrin-releasing peptide, platelet-derived growth factor, IL-2, IL-6, tumor growth factors ("TGF"), such as TGF- α and TGF- β , vaccinia growth factor ("VGF"), insulin and insulin-like growth factors I and II. Non-peptidyl ligands may include, for example, steroids, carbohydrates, vitamins, and lectins.

In preferred embodiments, Q is a peptide, such as somatostatin, a somatostatin analog, bombesin, a bombesin analog, or an antibody, such as a monoclonal antibody. Preferred biologically active peptide or targeting moieties are internalized by select cells via an active internalization process, such as when binding to a G-Protein coupled receptor or somatostatin type 2 receptors (SSTR2).

The conjugates of the invention inhibit accumulation of toxic peptides in tissues through inclusion of the Z group (or linking peptide (i.e., peptide terminal extension)), containing hydrophilic residues, and optional inclusion of an hydrophilic spacer sequence. These components promote rapid elimination of intact, non-bound peptides through the kidneys.

The conjugates of the invention are designed to preserve full biological potency of the biologically-active peptides when conjugated to a cytotoxic agent. A peptide analog of the invention has a biological potency that is preferably greater than or equal to the parent peptide analog from which it is derived, with a specificity that is greater, lesser, or equivalent to the parent peptide's target specificity. For example, a

somatostatin analog may bind to more somatostatin receptor subtypes than naturally-occurring somatostatin, or it may bind to a particular receptor subtype. Some analogs of the invention contain D-isomers of amino acids, or analogs thereof, facilitating stable coupling of cytotoxic agents while retaining high receptor affinity and biological potency of the peptide analog.

The cytotoxic or therapeutic conjugates of the invention can employ any of the large number of known somatostatin analogs that recognize the somatostatin receptor, such as those described above. Preferably, the somatostatin analog portion of the conjugate contains between 10 and 18 amino acids, and includes the core sequence: cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys] (SEQ ID NO: 37 and SEQ ID NO: 38). Preferably, the C-terminus of the analog is: Thr-NH₂. Bombesin analogs, as disclosed herein, may also be conjugated to cytotoxic or therapeutic agents in the peptide agents of the invention.

Specific targeting of therapeutic or cytotoxic agents allows selective destruction of a tumor expressing a receptor specific for a biologically active peptide. For example, a tumor expressing a somatostatin receptor includes a neoplasm of the lung, breast, prostate, colon, brain, gastrointestinal tract, neuroendocrine axis, liver, kidney, etc. (see Schaer et al., Int. J. Cancer, 70:530-537, 1997; Chave et al., Br. J. Cancer 82(1):124-130, 2000; Evans et al., Br. J. Cancer 75(6):798-803, 1997).

Peptides for use in conjugates of the invention include KiSS peptides and analogs, urotensin II peptides and analogs, GnRH I and II peptides and analogs, octreotide, depreotide, vapreotide, vasoactive intestinal peptide (VIP), cholecystokinin (CCK), insulinlike growth factor (IGF), RGD-containing peptides, melanocyte-stimulating hormone (MSH) peptide, neurotensin, calcitonin, peptides from complementarity determining regions of an antitumor antibody, glutathione, YIGSR (leukocyte-avid peptides, e.g., P483H, which contains the heparin-binding region of platelet factor-4 (PF-4) and a lysine-rich sequence), atrial natriuretic peptide (ANP), β -amyloid peptides, delta-opioid antagonists (such as ITTPP(psi)), annexin-V, endothelin, IL-1, IL-1ra, IL-2, IL-8, leukotriene B4 (LTB4), chemotactic peptides (e.g., N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-lysine (fMLFK)), GP Iib/IIIa receptor antagonists (e.g., DMP444), epidermal growth factor, human neutrophil elastase inhibitor (EPI-HNE-2 and EPI-HNE-4), plasmin inhibitor, antimicrobial peptides, apticide (P280 and P274), thrombospondin receptor (including analogs such as TP-1300), bitistatin, pituitary

adenylyl cyclase type I receptor (PAC1), fibrin α -chain, peptides derived from phage display libraries, and conservative substitutions thereof, that are targeted to a cell or tissue in the body of a mammal (e.g., diseased tissue, such as a tumor or a proliferative angiogenic blood vessel; see, e.g., those described by Aina et al., Biopolymers 66:184-199, 2002), and derivatives and analogs thereof. See, e.g., Signore et al., Eur. J. Nucl. Med. 28(10):1555-65, 2001.

Cytotoxic somatostatin peptide analogs may also be specific for tumor vasculature, or angiogenic blood vessels, such as those which over-express somatostatin receptors (see Denzler and Reubi, Cancer 85:188-198, 1999; Gulec et al., J. Surg. Res. 97(2):131-137, 2001; Woltering et al., J. Surg. Res. 50:245, 1991). Additionally, because the preferred somatostatin analogs of the invention are variously hydrophilic, they are water-soluble and, thus, have enhanced use as compared to previous hydrophobic analogs. The hydrophilic analogs described herein are soluble in blood, cerebrospinal fluid, and other bodily fluids, as well as in urine, facilitating excretion by the kidneys. This hydrophilic character facilitates the delivery of the analogs of the invention to almost every area of the body. The invention also discloses specific hydrophilic elements for incorporation into peptide analogs, allowing modulation of the analog's hydrophilicity to adjust for the chemical and structural nature of the various conjugated cytotoxic agents.

Somatostatin agonist analogs are rapidly internalized after binding to their receptors (see, e.g., Lukinius et al, Acta Onc., 38:383-387, 1999) and can thus be used as vectors for targeting various therapeutic agents – such as traditional tumor cytotoxic agents. It is possible that the specificity of such anti-tumor agents can be drastically improved since many tumor types heavily overexpress somatostatin type 2 receptors. In this manner, we propose that the toxic side effects associated with all conjugatable cytotoxic agents can be usefully lowered as long as a potent hybrid molecule can be designed which retains very high affinity for somatostatin receptors.

Immunoreactive ligands for use as a targeting moiety in the invention include an antigen-recognizing immunoglobulin (also referred to as “antibody”), or antigen-recognizing fragment thereof. Particularly preferred immunoglobulins are those that can recognize a tumor-associated antigen. As used herein, “immunoglobulin” refers to any recognized class or subclass of immunoglobulins such as IgG, IgA, IgM, IgD, or IgE. Preferred are those immunoglobulins which fall within the IgG class of

30

immunoglobulins. The immunoglobulin can be derived from any species. Preferably, however, the immunoglobulin is of human, murine, or rabbit origin. In addition, the immunoglobulin may be polyclonal or monoclonal, but is preferably monoclonal.

Conjugates of the invention may include an antigen-recognizing
5 immunoglobulin fragment. Such immunoglobulin fragments may include, for example, the Fab', F(ab')₂, F_v, or Fab fragments, or other antigen-recognizing immunoglobulin fragments. Such immunoglobulin fragments can be prepared, for example, by proteolytic enzyme digestion, for example, by pepsin or papain digestion, reductive alkylation, or recombinant techniques. The materials and methods for preparing such
10 immunoglobulin fragments are well-known to those skilled in the art. See Parham, J. Immunology, 131, 2895, 1983; Lamoyi et al., J. Immunological Methods, 56, 235, 1983.

The immunoglobulin used in conjugates of the invention may be a "chimeric antibody" as that term is recognized in the art. Also, the immunoglobulin may be a "bifunctional" or "hybrid" antibody, that is, an antibody which may have one arm
15 having a specificity for one antigenic site, such as a tumor associated antigen while the other arm recognizes a different target, for example, a hapten which is, or to which is bound, an agent lethal to the antigen-bearing tumor cell. Alternatively, the bifunctional antibody may be one in which each arm has specificity for a different epitope of a tumor associated antigen of the cell to be therapeutically or biologically modified. Hybrid
20 antibodies thus have a dual specificity, preferably with one or more binding sites specific for the hapten of choice or one or more binding sites specific for a target antigen, for example, an antigen associated with a tumor, an infectious organism, or other disease state.

Biological bifunctional antibodies are described, for example, in European Patent
25 Publication, EPA 0 105 360, which is hereby incorporated by reference in its entirety. Such hybrid or bifunctional antibodies may be derived either biologically, by cell fusion techniques, or chemically, such as with cross-linking agents or disulfide bridge-forming reagents, and may be comprised of whole antibodies and/or fragments thereof. Methods for obtaining such hybrid antibodies are disclosed, for example, in PCT application
30 W083/03679, published Oct. 27, 1983, and published European Application EPA 0 217 577, published Apr. 8, 1987, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. Particularly preferred bifunctional antibodies are those biologically prepared from a "polydroma" or "quadroma" or which are synthetically prepared with cross-

linking agents such as bis-(maleimido)-methyl ether ("BMME"), or with other cross-linking agents familiar to those skilled in the art.

In addition, the immunoglobulin may be a single chain antibody ("SCA"). An SCA may consist of single chain Fv fragments ("scFv") in which the variable light ("V_L") and
5 variable heavy ("V_H") domains are linked by a peptide bridge or by disulfide bonds. Also, the immunoglobulin may consist of single V_H domains (dAbs) that possess antigen-binding activity. See G. Winter and C. Milstein, Nature 349:295, 1991; R. Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362, 1990; and, E. S. Ward et al., Nature 341:544, 1989.

10 Especially preferred for use in the present invention are chimeric monoclonal antibodies; preferably those chimeric antibodies having specificity toward a tumor associated antigen. As used herein, the term "chimeric antibody" refers to a monoclonal antibody comprising a variable region, i.e. a binding region, from one source or species and at least a portion of a constant region derived from a different source or species,
15 usually prepared by recombinant DNA techniques. Chimeric antibodies having a murine variable region and a human constant region are especially preferred in certain applications of the invention, particularly human therapy, because such antibodies are readily prepared and may be less immunogenic than purely murine monoclonal antibodies. Such murine/human chimeric antibodies are the product of expressed
20 immunoglobulin genes comprising DNA segments encoding murine immunoglobulin variable regions and DNA segments encoding human immunoglobulin constant regions. Other forms of chimeric antibodies for use in conjugates of the invention are those in which the class or subclass has been modified or changed from that of the original antibody. Such "chimeric" antibodies are also referred to as "class-switched
25 antibodies." Methods for producing chimeric antibodies involve conventional recombinant DNA and gene transfection techniques now well known in the art. See Morrison, S. L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 81:6851, 1984.

The term "chimeric antibody" also includes a "humanized antibody," namely, those antibodies in which the framework or "complementarity determining regions"
30 ("CDR") have been modified to include the CDR of an immunoglobulin of different specificity, as compared to that of the parent immunoglobulin. In a preferred embodiment, a murine CDR is grafted into the framework region of a human antibody to prepare the "humanized antibody." See, e.g., L. Riechmann et al., Nature 332:323,

1988; M. S. Neuberger et al., Nature 314:268, 1985. Particularly preferred CDRs correspond to those representing sequences recognizing the antigens noted above for the chimeric and bifunctional antibodies. See, e.g., EPA 0 239 400 (published Sep. 30, 1987), which is hereby incorporated by reference in its entirety.

5 One skilled in the art will recognize that a bifunctional-chimeric antibody can be prepared which would have the benefits of lower immunogenicity of the chimeric or humanized antibody, as well as the flexibility, especially for therapeutic treatment, of the bifunctional antibodies described above. Such bifunctional-chimeric antibodies can be synthesized, for instance, by chemical synthesis using cross-linking agents and/or
10 recombinant methods of the type described above. The present invention should not be construed as limited in scope by any particular method of production of an antibody whether bifunctional, chimeric, bifunctional-chimeric, humanized, or an antigen-recognizing fragment or derivative thereof.

Conjugates of the invention may also include immunoglobulins (as defined
15 above) or immunoglobulin fragments to which are fused active proteins, for example, an enzyme of the type disclosed in Neuberger, et al., PCT application W086/01533, published Mar. 13, 1986, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

As used herein, "bifunctional," "fused," "chimeric" (including humanized), and "bifunctional-chimeric" (including humanized) antibody constructions also include,
20 within their individual contexts, constructions including antigen recognizing fragments. As one skilled in the art will recognize, such fragments may be prepared by traditional enzymatic cleavage of intact bifunctional, chimeric, humanized, or chimeric-bifunctional antibodies. In the event that intact antibodies are not susceptible to such cleavage, e.g., because of the nature of the construction involved, the noted
25 constructions can be prepared with immunoglobulin fragments used as the starting materials; or, if recombinant techniques are used, the DNA sequences, themselves, can be tailored to encode the desired "fragment" which, when expressed, can be combined *in vivo* or *in vitro*, by chemical or biological means, to prepare the final desired intact immunoglobulin "fragment." It is in this context that the term "fragment" is used
30 herein.

The immunoglobulin (antibody), or fragment thereof, used in conjugates of the present invention may be polyclonal or monoclonal in nature. Monoclonal antibodies are the preferred immunoglobulins. The preparation of polyclonal or monoclonal

antibodies is well known to those skilled in the art. See, e.g., G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495, 1975. In addition, hybridomas and/or monoclonal antibodies which are produced by such hybridomas and which are useful in the practice of the present invention are publicly available.

5 In a further embodiment, the invention features a method for the treatment of a disease or modification of a biological function. The method includes administering to a warm-blooded animal in need thereof, a therapeutically effective or biological function modifying amount of a conjugate of the invention. One of skill in the art will recognize that the particular conjugate used will depend on the disease state to be treated or the
10 biological system to be modified. In particular, one skilled in the art will be able to select a particular targeting moiety and cytotoxic or therapeutic agent to prepare a conjugate of the invention which has specificity for the treatment of the disease or is able to modify the biological function desired. It is envisioned that several disease are treatable using the conjugates of the invention, including, for example, tumors of the
15 lung, breast, brain, eye, prostate or colon; tumors of neuroendocrine origin (e.g., carcinoid syndrome); and proliferative angiogenic blood vessels (in, e.g., the eye), such as those associated with tumors, retinal macular degeneration, or diabetic retinopathy..

 Conjugates of the invention may be administered to a mammalian subject, such as a human, directly or in combination with any pharmaceutically acceptable carrier or
20 salt known in the art. Pharmaceutically acceptable salts may include non-toxic acid addition salts or metal complexes that are commonly used in the pharmaceutical industry. Examples of acid addition salts include organic acids such as acetic, lactic, pantoic, maleic, citric, malic, ascorbic, succinic, benzoic, palmitic, suberic, salicylic, tartaric, methanesulfonic, toluenesulfonic, or trifluoroacetic acids or the like; polymeric
25 acids such as tannic acid, carboxymethyl cellulose, or the like; and inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid phosphoric acid, or the like. Metal complexes include zinc, iron, and the like. One exemplary pharmaceutically acceptable carrier is physiological saline. Other physiologically acceptable carriers and their formulations are known to one skilled in the art and described, for example, in
30 Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Pharmaceutical formulations of a therapeutically effective amount of a conjugate of the invention, or pharmaceutically acceptable salt thereof, can be administered orally, parenterally (e.g., intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, or ocular injection, inhalation, intradermally, optical drops, or implant), nasally, vaginally, rectally, sublingually or topically, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier adapted for the route of administration.

Methods well known in the art for making formulations are found, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA. Compositions intended for oral use may be prepared in solid or liquid forms according to any method known to the art for the manufacture of pharmaceutical compositions. The compositions may optionally contain sweetening, flavoring, coloring, perfuming, and/or preserving agents in order to provide a more palatable preparation. Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. In such solid forms, the active compound is admixed with at least one inert pharmaceutically acceptable carrier or excipient. These may include, for example, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, sucrose, starch, calcium phosphate, sodium phosphate, or kaolin. Binding agents, buffering agents, and/or lubricating agents (e.g., magnesium stearate) may also be used. Tablets and pills can additionally be prepared with enteric coatings.

Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and soft gelatin capsules. These forms contain inert diluents commonly used in the art, such as water or an oil medium. Besides such inert diluents, compositions can also include adjuvants, such as wetting agents, emulsifying agents, and suspending agents.

Formulations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, or emulsions. Examples of suitable vehicles include propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils, gelatin, hydrogenated naphthalenes, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Such formulations may also contain adjuvants, such as preserving, wetting, emulsifying, and dispersing agents.

Biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be used to control the release of the compounds. Other potentially useful parenteral delivery systems for the

polypeptides of the invention include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes.

Liquid formulations can be sterilized by, for example, filtration through a bacteria-retaining filter, by incorporating sterilizing agents into the compositions, or by
5 irradiating or heating the compositions. Alternatively, formulations can also be manufactured in the form of sterile, solid compositions that can be dissolved in sterile water or some other sterile injectable medium immediately before use.

Compositions for rectal or vaginal administration are preferably suppositories that may contain, in addition to active substances, excipients such as cocoa butter or a
10 suppository wax. Compositions for nasal or sublingual administration are also prepared with standard excipients known in the art. Formulations for inhalation may contain excipients, for example, lactose, or may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or may be oily solutions for administration in the form of nasal drops or spray, or as a gel.

15 The amount of active ingredient in the compositions of the invention can be varied. One skilled in the art will appreciate that the exact individual dosages may be adjusted somewhat depending upon a variety of factors, including the polypeptide being administered, the time of administration, the route of administration, the nature of the formulation, the rate of excretion, the nature of the subject's conditions, and the age,
20 weight, health, and gender of the patient. In addition, the severity of the condition targeted by the biologically active peptide such as somatostatin or bombesin will also have an impact on the dosage level. Generally, dosage levels of between 0.1 µg/kg to 100 mg/kg of body weight are administered daily as a single dose or divided into multiple doses. Preferably, the general dosage range is between 250 µg/kg to 5.0 mg/kg
25 of body weight per day. Wide variations in the needed dosage are to be expected in view of the differing efficiencies of the various routes of administration. For instance, oral administration generally would be expected to require higher dosage levels than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, which are well known in the
30 art. In general, the precise therapeutically effective dosage will be determined by the attending physician in consideration of the above identified factors.

The conjugates of the invention can be administered in a sustained release composition, such as those described in, for example, U.S.P.N. 5,672,659 and U.S.P.N. 5,595,760. The use of immediate or sustained release compositions depends on the type of condition being treated. If the condition consists of an acute or over-acute disorder, a treatment with an immediate release form will be preferred over a prolonged release composition. Alternatively, for preventative or long-term treatments, a sustained released composition will generally be preferred.

Polypeptides used in the present invention can be prepared in any suitable manner. The polypeptides may be isolated from naturally occurring sources, recombinantly produced, or produced synthetically, or produced by a combination of these methods. The synthesis of short peptides is well known in the art. See e.g. Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 2d ed., 1984). The peptides of the present invention can be synthesized according to standard peptide synthesis methods known in the art.

The following examples are meant to illustrate the invention. They are not meant to limit the invention in any way.

EXAMPLE 1

Preparation of the chloroformate of camptothecin

Camptothecin (250 mg) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP; 50 mg) were suspended in 3 mL anhydrous pyridine and 50 mL anhydrous methylene chloride. Phosgene (750 μ L of a 20% solution in toluene) was added to the slurry and mixed 2 h at ambient temperature. Excess phosgene and methylene chloride were evaporated in a chemical fume hood and the chloroformate of camptothecin dissolved in DCM.

EXAMPLE 2

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-aminoethyl-glycine-D-tert-butyl-Ser-Nle-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 16)

Rink amide [4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin (0.063 mmole), 100-200 mesh (Novabiochem, San Diego, CA) was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in dimethylformamide (DMF) for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed (2 min). The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed (20 min) to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Thr(tBut) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin, which was mixed for 1 h, followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-L-threonine, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lysine, N^α-Fmoc-N^δ-Boc-D-tryptophan, Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Fmoc-O-t-butyl-D-tyrosine, N^α-Fmoc-Norleucine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin (3 eq), N-Boc-ethylenediamine was added in N-methyl-α-pyrrolidinone (NMP) and mixed (2 h) and then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

25

EXAMPLE 3

Preparation of camptothecin-carbonyl- N-(2-aminoethyl)-glycine-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amide (SEQ ID NO: 17)

30 The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 2 (0.063 mmol) was placed in a round bottomed flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h) and filtered and washed

several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL). A concentrated solution of iodine in methanol was added dropwise with vigorous stirring until a permanent brown coloration was formed whereupon excess iodine was removed by addition of a small quantity of ascorbic acid.

The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 µm). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product, as identified by analytical HPLC, were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 4

Preparation of chloroformate of paclitaxel

20

Paclitaxel (0.6 mmole) was dissolved in 30 mL anhydrous DCM in a 100 mL round bottomed (RB) flask. To this solution, diisopropylethylamine (DIEA; 3 mmol) dissolved in 20 mL anhydrous DCM was added over 20 minutes at 0°C under a dry nitrogen atmosphere. Phosgene (3 mmol) was added to the slurry and mixed for 30 minutes at 0°C and 2 hours at ambient temperature. Excess phosgene and methylene chloride were evaporated and the chloroformate of paclitaxel was dissolved in methylene chloride.

EXAMPLE 5

30 *Preparation of Paclitaxel-carbonyl-N-(2-hydroxyethyl)-glycine-D-trityl-Ser-Norleucine-D-trityl-Tyr-D-trityl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-mtt-Lys-trityl-Thr-S-trityl-Cys-trityl-Thr-Amino-xanthen-MBHA-resin (SEQ ID NO: 16)*

Fmoc-Amino-Xanthen-MBHA (4-Methylbenzhydrylamine Hydrochloride) polystyrene resin (0.063 mmol) [Bachem, catalog # D-2040, Lot # 0541173] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and
5 an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Thr(trityl) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-
10 hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-S-trityl-L-cysteine,
15 Fmoc-O- trityl -L-threonine, N^α-Fmoc-N^ε-mtt-L-lysine, N^α-Fmoc-D-tryptophan, Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-trityl -D-serine, Fmoc-O- trityl -D-tyrosine, N^α-Fmoc-Norleucine, Fmoc-O- trityl -D-serine, Bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) ethanolamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times
20 with DCM. Paclitaxel chloroformate from EXAMPLE 4 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 6

25 *Preparation of Paclitaxel-carbonyl- N-(2-hydroxyethyl)-glycine -D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amide (SEQ ID NO: 17)*

The paclitaxel-peptide resin prepared in EXAMPLE 5 (0.063 mmol) was placed in a RB flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (2%) in
30 methylene chloride. The suspension was agitated (2 h), filtered, and washed several times with methylene chloride. The methylene chloride was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a white powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL). A concentrated solution of iodine in methanol was added

35

dropwise with vigorous stirring until a permanent brown coloration was formed whereupon excess iodine was removed by addition of a small quantity of ascorbic acid.

The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude paclitaxel peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μ m). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy white powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

15

EXAMPLE 7

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-aminoethyl-glycine-D-tert-butyl-Ser-D-epsilon-tert-butyloxycarbonyl-Lys-Gln-Trp-Ala-Val-beta-Ala-trityl-His-Phe-Nle-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 18)

Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmol) [4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin, 100-200 mesh, Novabiochem, San Diego, CA] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Norleucine) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-N^{trt}-trityl-L-histidine, Fmoc-βAla, Fmoc-Valine, Fmoc-alanine, Fmoc-N^{trt}-Boc-L-tryptophan, Fmoc-glutamine, Fmoc-N^{trt}-Boc-D-lysine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) N-Boc-ethylenediamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 8

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-D-Ser-D-Lys-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-His-Phe-Nle-amide (SEQ ID NO: 18)

The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 7 (0.063 mmol) was placed in a round bottomed flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered, and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL).

The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μm). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 9

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-aminoethyl-glycine-D-tert-butyl-Ser-D-tert-butyl-Tyr-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-trityl-His-Phe-Nle-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 19)

5

Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmol) [4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin, 100-200 mesh, Novabiochem, San Diego, CA] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Norleucine (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-N^{tr}-trityl-L-histidine, Fmoc-βAla, Fmoc-Valine, Fmoc-alanine, Fmoc-N^{tr}-Boc-L-tryptophan, Fmoc-glutamine, Fmoc-O-t-butyl-D-Tyr, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) N-Boc-ethylenediamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

30

EXAMPLE 10

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-D-Ser-D-Tyr-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-His-Phe-Nle-amide (SEQ ID NO: 19)

5 The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 9 (0.063 mmol) was placed in a RB flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then
10 dissolved in 60% acetic acid (250 mL).

 The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μm). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was
15 employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was
20 obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 11

Preparation of Combretastatin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-D-tert-butyl-Ser-Norleucine-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 39)

 Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmole) [4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-
30 Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin, 100-200 mesh, Novabiochem, San Diego, CA] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF

was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Thr(tBut) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-L-threonine, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lysine, N^α-Fmoc-N^m-Boc-D-tryptophan, Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Fmoc-O-t-butyl-D-tyrosine, N^α-Fmoc-Norleucine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) N-Boc-ethylenediamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Combretastatin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 12

Preparation of combretastatin-carbonyl- N-(2-aminoethyl)-glycine-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amide (SEQ ID NO: 40)

The combretastatin-peptide resin prepared in Example 11 (0.063 mmol) was placed in a round bottomed flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a white powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL). A concentrated solution of iodine in methanol was added dropwise with vigorous stirring until a permanent brown coloration was formed whereupon excess iodine was removed by addition of a small quantity of ascorbic acid.

The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μ m). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo* and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy white powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid.

Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 13

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-(N-methyl-2-aminoethyl)-glycine-D-tert-butyl-Ser-Norleucine-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butyloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 39)

Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmol) [4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin, 100-200 mesh, Novabiochem, San Diego, CA] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Thr(tBut) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-S-trityl-L-cysteine,

Fmoc-O-t-butyl-L-threonine, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lysine, N^α-Fmoc-N^β-Boc-D-tryptophan, Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Fmoc-O-t-butyl-D-tyrosine, N^α-Fmoc-Norleucine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Bromoacetic acid. After completion of bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) N-Boc-N-methylethylenediamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

10

EXAMPLE 14

Preparation of camptothecin-carbonyl-N-(N-methyl-2-aminoethyl)-glycine-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amide (SEQ ID NO: 40)

15 The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 13 (0.063 mmol) was placed in a RB flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL). A concentrated solution of iodine in methanol was added dropwise with vigorous stirring until a permanent brown coloration was formed whereupon excess iodine was removed by addition of a small quantity of ascorbic acid.

20 The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μm). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo* and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid.

30

Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 15

5 *di-tert-butylloxycarbonyl-His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-tert-butylloxycarbonyl-Trp-tert-butyl-Tyr-Pro-Gln-Ile-tert-butyl-Ser-N-ε-camptothecin-carbonyl-N-(N-2-aminoethyl)-glycine-Lys-tert-butyl-Ser-Rink-amide-resin (SEQ ID NO: 20)*

Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmol) resin, 100-200 mesh,
10 Novabiochem, San Diego, CA) was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the
15 resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Serine(tBut) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

20 The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-N-ε-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)3-3methyl-butyl-L-Lysine, Fmoc-O-t-butyl-L-Serine, N^ε-Fmoc-L-Isoleucine, N-Fmoc-L-Glutamine, N-Fmoc-L-Proline, N-Fmoc-O-Trityl-L-Tyrosine, N^ε-Fmoc-N^{tr}-Boc-L-tryptophan, N-Fmoc-L-Proline, N-Fmoc-L-Glutamine,
25 N^ε-Fmoc-L-Isoleucine, N-Fmoc-L-Glutamine, N^ε-Fmoc-Leucine, Boc-O-t-butyl-L-Histidine.

The protected peptide resin was then treated 3 times (3 min each) with a 2% solution of hydrazine hydrate in DMF in order to remove the N-ε-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)3-methyl-butyl (ivDde) group on the lysine residue. The free
30 ε-amino group was then coupled with bromoacetic acid followed by addition of N-Boc-N-ethylenediamine (3 eq, 12 h) in NMP. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, washed with copious amounts of DMF

followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 16

5 *Preparation of Camptothecin Derivative of Phage Peptide p147:*

His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-Trp-Tyr-Pro-Gln-Ile-Ser-N-e-camptothecin-carbonyl-N-(N-2-aminoethyl)-glycine-Lys-Ser-NH₂ (SEQ ID NO: 20)

The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 15 (0.063 mmol) was placed in a RB flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (5 h), filtered and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder which was purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μ m). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

25

EXAMPLE 17

Preparation of N-carboxyanhydride of O-t-butyl-D,L-serine

O-t-butyl-D-serine (0.0062 mol) and O-t-butyl-L-serine (0.0062 mol) were suspended in 55 mL anhydrous tetrahydrofuran (THF) under nitrogen atmosphere. Phosgene (0.025 mol) was added to suspension and the suspension was refluxed for 15 minutes. Solvent and excess phosgene were evaporated and the resulting oil was dissolved in 10 mL THF then added to 600 mL Hexanes and crystallized at -20°C.

EXAMPLE 18

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-[D or L O-tert-butyl-Ser]₋₁₅-D-tert-butyl-Ser-Norleucine-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-
amide-resin (SEQ ID NO: 21, and SEQ ID NO: 23-SEQ ID NO 36)

Rink amide MBHA polystyrene resin (0.063 mmol) [4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin, 100-200 mesh, Novabiochem, San Diego, CA] was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in DMF for approximately 1 hour. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed for 2 minutes. The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed for 20 minutes to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-Thr(tBut) (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF and added to the resin which was mixed (1 h) followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, the following amino acids were successively reacted with the growing peptide chain: Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-L-threonine, N^α-Fmoc-N^α-Boc-L-lysine, N^α-Fmoc-N^α-Boc-D-tryptophan, Fmoc-L-phenylalanine, Fmoc-S-trityl-L-cysteine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine, Fmoc-O-t-butyl-D-tyrosine, N^α-Fmoc-Norleucine, Fmoc-O-t-butyl-D-serine. At this point the N-terminal Fmoc group was removed, the resin washed several times with DMF, then the resin was transferred to a 100 mL RB flask. O-tert-butyl-Serine NCA (1.5g) was dissolved in anhydrous DMF and added to the peptidyl resin and the suspended resin was shaken overnight at 40 °C. The resin was filtered and washed several times with DMF then placed back on the CS Bio synthesizer. Bromoacetic acid was then coupled to the N-terminal serine in DCM/DIC. After completion of Bromoacetic acid coupling to peptidyl resin, (3 eq) N-Boc-ethylenediamine was added in NMP and mixed for two hours then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and

mixed overnight, washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 19

5 *Preparation of camptothecin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-[Poly-D,L-Ser]-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amide (SEQ ID NO: 22)*

The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 18 (0.063 mmol) was placed in a RB flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid
10 (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered, and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (250 mL). A concentrated solution of iodine in methanol was added dropwise with vigorous stirring until a permanent
15 brown coloration was formed whereupon excess iodine was removed by addition of a small quantity of ascorbic acid.

The solution was reduced to a volume of around 10 mL *in vacuo* and the crude camptothecin peptide purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica
20 (Dynamax 300, 8 µm). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product as evidenced by analytical HPLC were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was
25 obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition was demonstrated by amino acid analysis of an acid hydrolysate and matrix assisted laser desorption mass spectrometry.

EXAMPLE 20

In Vivo and In Vitro Use of Conjugate Carbamate Compounds

Conjugate compounds with a carbamate linker were tested *in vitro* and *in vivo* for release rate of the cytotoxic agent. A carbamate linker was chosen because it is reasonably stable in plasma compared, for example, to commonly used ester-type linkages. We also tested carbamate compounds containing an intramolecular cyclic moiety that allows adjustment of the release rate of the alcoholic component of the carbamate culminating in the release of an attached alcohol derivative and formation of a cyclic urea which can be utilized to control release rates of suitable cytotoxins (Fig. 1). It is known that the pKa value of the leaving alcohol of a carbamate is important for the stability of the prodrug, therefore, we chose two different chemically suitable cytotoxic agents each containing one hydroxyl group with significantly different pKa values. One cytotoxic agent was the topoisomerase I inhibitor, camptothecin, which bears a tertiary hydroxyl group in ring position 20 (Fig. 1) with a pKa of approximately 18. The other cytotoxic agent was the tubulin-binding agent, combretastatin, which has one phenolic hydroxyl group attached to an aromatic ring, thus exhibiting a much lower pKa value of approximately 10.3.

All peptide conjugates shown in Table 1 were synthesized totally on Rink amide resin support using the standard Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) protection/deprotection strategy employing simple DIC couplings and HBTU activation as a second step only if a Kaiser test was positive (as described above). Once the peptide portion of the conjugate was complete, bromoacetic acid was coupled to the N-terminus using DIC/DCM. After washing the resin, a 5 M excess of N-BOC-ethylenediamine (or the appropriate protected diamine) in NMP was added and mixed for 1 h. Separately, camptothecin (200 mg; Aldrich) and DMAP (400 mg) in anhydrous DCM (40 mL) were mixed and cooled to 0°C. To this suspension was added 20% phosgene in toluene (600 uL) and the mixture was allowed to react for about 45 min. After solvent evaporation, the powder was suspended in DCM (40 mL) and added to the peptidyl resin bearing the free secondary amine and allowed to react overnight followed by washing several times with DMF, DCM, and methanol. The peptide was then cleaved from the resin for 2 h using the standard acid mixture TFA:H₂O:EDT:TIS, 95:2:2:1. After cleavage, the conjugate was precipitated 4 times in ethyl ether, dissolved

in 60% HOAC, and cyclized with iodine in methanol. It was then subjected to preparative chromatography and characterized by MS and amino acid analysis. All peptides were obtained in at least 90+% purity and yields were around 35% theoretical. Full retention of conjugate agonists potencies relative to somatostatin itself was

5 demonstrated by their ability to inhibit gonadotropin releasing hormone (GNRH)-stimulated GH release from monolayer cultures of rat pituitary cells, an assay system that has been shown to correlate well with binding affinity to the human type 2 somatostatin receptor (see, e.g., Raynor et al., Mol. Pharmacol. 43:838, 1993). Inhibitory potencies (IC₅₀'s) of the conjugates shown in Table 2 ranged from 0.26 to

10 0.49 nM compared to 0.63 nM for somatostatin-14 itself. This retention of full affinity is due to the employment of the N-terminal Nle-d-Tyr-d-Ser tripeptide extension of the cyclic somatostatin portion of the conjugate that we have found generally allows large groups to be attached with little to no loss of affinity.

15

Table 1: Structures of camptothecin and combretastatin conjugates containing various BINAR linking groups.

R ₁	R ₂	Compound
		1
		2
		3
		4
		5
		6

✓2

Table 2: Agonist activity, cytotoxicity, and buffer and serum half-life of compounds 1 – 6 and control compounds

Compounds	Cytotoxicity IC ₅₀ , nM ^a IMR-32 Cells	Half Life Phosphate Buffer (Hours)	Half-Life Rat Serum (Hours)	Growth Hormone Inhibition IC ₅₀ , nM ^a
1	374 ± 18	Stable ^b	106	0.32 ± 0.02
2	54.2 ± 6	123	18	0.27 ± 0.02
3	571 ± 48	Stable	59	0.30 ± 0.04
4	>1000	Stable	72	0.26 ± 0.03
5	>1000	na	na	0.49 ± 0.1
6	2.79 ± 0.33	31	4	0.31 ± 0.1
Camptothecin	2.21 ± 0.44	na	na	na
Combretastatin	4.36	na	na	na
SRIF (1-14)	na ^b	na	2-5 minutes	0.63 ± 0.029

^a Experiment carried out for 50 h.

^b Somatostatin analogues were non-toxic to IMR32 cells at up to 10⁻⁵ M concentrations.

Each peptide conjugate was subjected to phosphate buffer and rat serum stability studies. The analogues were incubated in either 0.1 M phosphate buffer or fresh rat serum at 37°C and aliquots were taken at different time points and examined by HPLC.

Compounds 1, 3, and 4 showed complete buffer stability for the length of the experiment (50 h; Table 2). Compound 2 was less stable in buffer with a half-life of around 120 h, while compound 6 was the least stable with a half-life of only 30 h in buffer. In rat serum, this same trend was evident, except that there was clearly a catabolic effect of serum on the stability of the compounds. Compounds 1, 3, and 4 were again the most stable, while compound 2's half-life was 18 h and combretastatin compound 6, which contains the phenolic hydroxyl, was least stable with a 4 h half-life.

The cytotoxic activities of these conjugates were measured using a standard MTT assay kit (Promega Corporation, Madison, WI). Each compound was incubated for 3 days with human neuroblastoma IMR32 cells (somatostatin receptor overexpression) at different concentrations in quadruplicate and IC50's were generated from the dose-response curves (Fig.2). Although the combretastatin-ethylenediamine BINAR compound 6 was the most cytotoxic, after reviewing the stability data in buffer, it is evident that 50% of this conjugate is free cytotoxin after 3 days and perhaps more since cell media will contain some enzymes. The N-Me-ethylenediamine camptothecin conjugate 2 was the second most potent. After 3 days, more than 80% of this conjugate was still intact. The next most potent was the ethylenediamine compound 1. This analogue demonstrated complete stability in phosphate buffer, but was seven times less potent than compound 2 and slightly more active than compound 3 even though it was

more stable in serum. This property is likely due to compound 1's ability to form a cyclic urea while compound 3 is unable to form this same species.

In preliminary tumor bearing animal studies, compounds 1 and 2 appear to be equally effective at inducing a cytotoxic effect in the tumor after repeated intraperitoneal administration. Compounds based on N,N-dimethylethylenediamine, diaminopropyl, and 2-hydroxyethylamine BINAR groups (Fig.2; Table 2) were essentially inactive presumably due to lack of release of any free cytotoxic agent intra- or extracellularly. The lead camptothecin conjugate 2 was able to significantly stabilize the growth of transplanted NCI-H69 small cell lung carcinomas (expression of SSTR2) in nude mice at doses far below the maximum tolerated equivalent doses of camptothecin alone. The data suggest not only a chemical component to the release rate of the alcohol but also some enzymatic component.

The value of the BINAR linking strategy lies both in its ability to be adjusted to accommodate ideal release rates for various types of alcohol containing groups and its ease of incorporation onto a peptide free amino group by simple solid-phase chemistries. The chemistry for introducing the groups is well suited for solid phase synthesis and is easily adapted for many different peptides, therapeutic agents, and cytotoxins. Although this strategy is readily applied to the N-terminus, it can also be applied to an orthogonally protected side chain as well should this be necessary for preservation of peptide binding affinity. With the present camptothecin conjugates, high cytotoxicity was achieved with compounds 1 and 2 (Fig.2; Table 2) even though they were very stable to cell media incubation conditions. High concentrations of intact peptide conjugate will be specifically bound to tumor cells whereupon internalization would take place. Furthermore, the conjugates are highly soluble and tissue clearance rates and routes can be readily further adjusted by altering the hydrophilicity of the peptide component, as described above. If the peptide conjugate remains reasonably intact during clearance, then toxic side effects should be much reduced.

EXAMPLE 21

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-aminoethyl-glycine-S-trityl-Cys-Rink-amide-resin

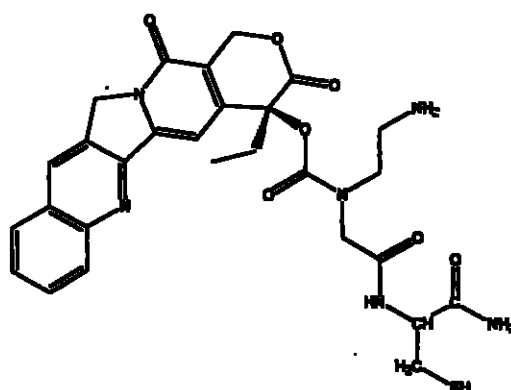
5 Rink amide [4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin (0.063 mmole), 100-200 mesh (Novabiochem, San Diego, CA) was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in dimethylformamide (DMF) for approximately 1 h. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed (2 min). The resin was filtered and
10 again an excess amount of 20% piperidine added and mixed (20 min) to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-S-trityl-L-cysteine (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF/DCM and added to the
15 resin, which was mixed for 1 h, followed by washing 4 times with DMF.

The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, Fmoc-N-(2-Boc-aminoethyl)glycine (Neosystem) was added. The Fmoc group was removed and the
20 peptidyl resin washed several times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, then washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

Preparation of camptothecin-carbonyl-N-(2-aminoethyl)-glycine-Cys-amide

The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 21 (0.063 mmol) was placed in a round bottomed flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), 1,2-ethanedithiol (2.5%), and
30 triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated (2 h), filtered, and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (15 mL).

The crude camptothecin peptide was purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μ m). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product, as identified by analytical HPLC, were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition, as shown below, was demonstrated by matrix assisted laser desorption mass spectrometry.



EXAMPLE 23

Preparation of Camptothecin-carbonyl-N-aminoethyl-glycine-Phe(benzophenone)-amide-resin

Rink amide [4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-(aminomethyl)phenoxyacetamido-norleucyl-methylbenzhydrylamine resin (0.063 mmole), 100-200 mesh (Novabiochem, San Diego, CA) was added to the reaction vessel of a CS136 automatic peptide synthesizer (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) and swollen in dimethylformamide (DMF) for approximately 1 h. The resin was filtered and an excess of 20% piperidine in DMF was added and mixed (2 min). The resin was filtered and again an excess amount of 20% piperidine added and mixed (20 min) to ensure complete removal of the resin Fmoc group. After deprotection, the resin was washed 4 times with DMF and then the first protected amino acid, Fmoc-L-p-benzoyl-Phenylalanine (0.188 mmol), diisopropylcarbodiimide (DIC) (0.188 mmol), and N-hydroxybenzotriazole

2/4

monohydrate (HOBt) (0.188 mmol) were all dissolved in DMF/DCM and added to the resin, which was mixed for 1 h, followed by washing 4 times with DMF.

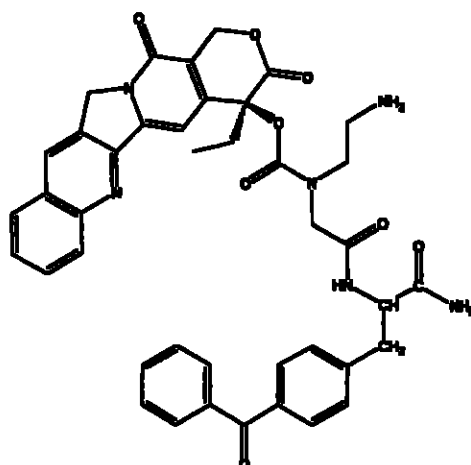
The Fmoc group was again removed by treatment with 20% piperidine/DMF solution and, following the same general coupling procedures, Fmoc-N-(2-Boc-aminoethyl)glycine (Neosystem) was added. The Fmoc group was removed and the peptidyl resin washed several times with DCM. Camptothecin chloroformate from EXAMPLE 1 was added to the resin and mixed overnight, then washed with copious amounts of DMF followed by methanol. After a final filtration the derivatized resin was air dried overnight.

EXAMPLE 24

Preparation of camptothecin-carbonyl- N-(2-aminoethyl)-glycine-p-Benzoyl-phenylalanine-amide

The camptothecin-peptide resin prepared in EXAMPLE 23 (0.063 mmol) was placed in a round bottomed flask to which was added 15 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) containing water (2.5%), and triisopropylsilane (1%). The suspension was agitated for 2 h, filtered, and washed several times with TFA. The TFA was evaporated *in vacuo* and ether added to the resulting oil to give a yellow powder that was then dissolved in 60% acetic acid (15 mL).

The crude camptothecin peptide was purified by preparative reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a column (21.4 x 250 mm) of C-18 bonded silica (Dynamax 300, 8 μ m). A linear gradient elution system at a flow rate of 20 mL/min was employed: buffer A consisted of 0.1% TFA and buffer B, 0.1% TFA in 80% MeCN; 20% B to 50% B was increased at 1% per min. The separation was monitored at 280 nm. The fractions containing the pure product, as identified by analytical HPLC, were pooled, concentrated *in vacuo*, and subjected to lyophilization. The peptide was obtained as a fluffy yellow powder of constant weight by lyophilization from aqueous acetic acid. Correct composition, as shown below, was demonstrated by matrix assisted laser desorption mass spectrometry.



Other Embodiments

5 Although the present invention has been described with reference to preferred embodiments, one skilled in the art can easily ascertain its essential characteristics and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. Those skilled in the art will recognize or be able to ascertain using no more than routine
10 experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed in the scope of the present invention.

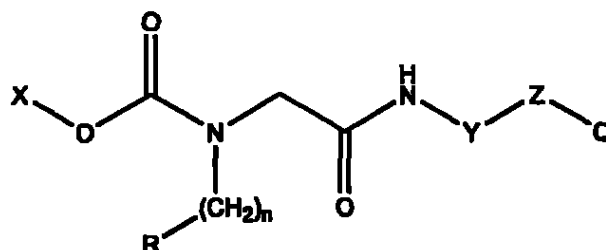
 All publications and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each independent publication or
15 patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

What is claimed is:

2/5

Claims

1. A conjugate compound represented by the following formula:



wherein:

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

n is an integer from 0 to 6, wherein $(\text{CH}_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

R is $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$, OR_1 , or SR_1 , wherein R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group;

Y is hydrophilic spacer sequence, or is omitted;

Z is a linking peptide that, when bonded to Q at the N-terminus or at a compatible side-chain amino group of Q, preserves at least 50% of the biological activity of Q, Z having the formula:

A-B-C-E-F, wherein:

A is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, or L-Ser, or is deleted;

B is D-Lys or D-Tyr, or is deleted;

C is Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, or 4) 3-pyridyl-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, or L-4-OH-Pro, or is deleted;

E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and

F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln;

provided that when A, B, C, and E are Tyr, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Lys; and when A, B, C, and E are Lys, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, E is not Tyr or Lys; and when A and B are deleted, and C and E are Lys and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys; and

Q is a targeting moiety, or is omitted.

2. The compound of claim 1, wherein X is a cytotoxic agent.

3. The compound of claim 2, wherein said cytotoxic agent is an alkylating agent, an antibiotic, an antimetabolite, a tubulin inhibitor, a topoisomerase I or II inhibitor, an hormonal agonist or antagonists, an apoptotic agent, or an immunomodulator.

4. The compound of claim 2, wherein said cytotoxic agent is camptothecin, homocamptothecin, colchicine, combretastatin, dolistatin, doxorubicin, methotrexate, podophyllotoxin, rhizoxin, rhizoxin D, a taxol, paclitaxol, CC1065, a maytansinoid, or derivatives or analogs thereof.

5. The compound of claim 1, wherein said hydrophilic spacer sequence is a peptide that increases the hydrophilic biodistribution of said compound.

6. The compound of claim 5, wherein said peptide has the formula $U(V-V)_n$, wherein U is D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosine, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, or (NH₂-(CH₂)_m-COOH), where m=2-10, inclusive, or is deleted; each V is independently selected from the group consisting of: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, or L-4 hydroxy-Pro; and n=1-50, inclusive.

7. The compound of claim 6, wherein V is independently D-Ser or L-Ser.

8. The compound of claim 6, wherein at least one V is a D-amino acid.

10

9. The compound of claim 1, wherein said hydrophilic spacer sequence is a hydrophilic polymer.

10. The compound of claim 9, wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol, polyvinyl acetate, polyvinyl alcohol, HPMA (N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) or HPMA copolymers, α , β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide (PHEA), or α , β -poly(N-hydroxypropyl)-DL-aspartamide.

11. The compound of claim 1, wherein said targeting moiety is a biologically-active peptide.

20

12. The compound of claim 11, wherein said biologically-active peptide is somatostatin, bombesin, a KiSS peptide, a urotensin II peptide, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and II peptides, octreotide, depreotide, vapreotide, vasoactive intestinal peptide (VIP), cholecystokinin (CCK), insulin-like growth factor (IGF), RGD-containing peptides, melanocyte-stimulating hormone (MSH) peptide, neurotensin, calcitonin, a peptide comprising the complementarity determining region of an antitumor antibody, glutathione, a leukocyte-avid peptide comprising the amino acid sequence YIGSR, the heparin-binding region of platelet factor-4 (PF-4), and a lysine-rich sequence, atrial natriuretic peptide (ANP), a β -amyloid peptide, a delta-opioid antagonist, annexin-V, endothelin, interleukin (IL)-1, IL-1ra, IL-2, IL-8, leukotriene B4 (LTB4), a chemotactic peptide, a GP IIb/IIIa receptor antagonist, epidermal growth factor, a human neutrophil elastase inhibitor, plasmin inhibitor, an antimicrobial peptide, apticide P280, apticide P274, a thrombospondin receptor, bitistatin, pituitary adenylyl cyclase type I receptor (PAC1), fibrin α -chain, or derivatives or analogs thereof.
13. The compound of claim 11, wherein said biologically-active peptide is an antibody or an antibody fragment.
14. The compound of claim 12, wherein said leukocyte-avid peptide is P483H.
15. The compound of claim 12, wherein said delta-opioid antagonist is ITIPP(psi).
16. The compound of claim 12, wherein said chemotactic peptide is N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-lysine (fMLFK).
17. The compound of claim 12, wherein said GP IIb/IIIa receptor antagonist is DMP444.
18. The compound of claim 12, wherein said human neutrophil elastase inhibitor is EPI-HNE-2 or EPI-HNE-4.

47

19. The compound of claim 12, wherein said thrombospondin receptor is TP-1300.

20. The compound of claim 11, wherein said biologically-active peptide targets
5 said compound to a cell or tissue in the body of a mammal.

21. The compound of claim 1, wherein said targeting moiety is a peptide derived
from a phage-display library, or conservative substitutions thereof, that targets said
compound to a cell or tissue in the body of a mammal.

10

22. The compound of claim 20 or 21, wherein said cell or tissue comprises a
cancer cell, a white blood cell, cardiac tissue, brain tissue, or a tubercle infected with
tuberculosis.

23. The compound of claim 20 or 21, wherein said tissue is a tumor or a
proliferative angiogenic blood vessel.

24. The compound of claim 23, wherein said blood vessel is in the eye.

25. The compound of claim 1, wherein Q is a somatostatin peptide.

26. The compound of claim 1, wherein Q is a bombesin peptide.

27. The compound of claim 13, wherein said antibody is a monoclonal antibody
25 or a fragment thereof.

28. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser.

29. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser.

30

30. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr.

31. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser.

32. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser.
33. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Ser-D-Lys-Ser.
- 5 34. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser.
35. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser.
- 10 36. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser.
37. The compound of claim 1, wherein Z is Lys-D-Ser-D-Ser.
38. The compound of claim 1, wherein Z is Ser-D-Lys-D-Ser.
- 15 39. The compound of claim 1, wherein Z is Ser-D-Lys-Ser.
40. The compound of claim 1, wherein Z is Nle-D-Tyr-D-Ser.
- 20 41. The compound of claim 1, wherein Z is Lys-D-Tyr-D-Ser.
42. The compound of claim 1, wherein Z is Pal-D-Lys-D-Ser.
43. The compound of claim 1, wherein Z is Thr-D-Tyr-D-Ser.
- 25 44. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-D-Lys.
45. The compound of claim 1, wherein Z is D-Ser-D-Tyr.
- 30 46. The compound of claim 1, wherein Z is D-Lys-D-Lys.
47. The compound of claim 1, wherein Z is D-Lys-D-Tyr.

28

48. The compound of claim 1, wherein Z is D-Tyr-D-Lys.

49. The compound of claim 1, wherein Z has the formula:

E-F, wherein:

5

E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Gln, or L-Gln; and

10

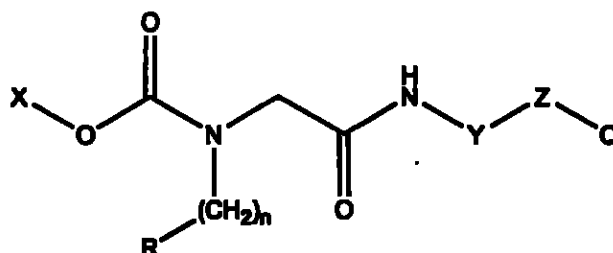
F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln.

50. The compound of claim 1, wherein R comprises 1 to 20 carbon atoms.

15

51. The compound of claim 51, wherein R comprises 1 to 8 carbon atoms.

52. A method of treating a disease comprising administering to a subject suffering from said disease a therapeutically effective amount of a compound having the formula:



5

wherein:

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

10

n is an integer from 0 to 6, wherein $(\text{CH}_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

15 R is $\text{N}(\text{R}_1, \text{R}_2)$, OR_1 , or SR_1 , wherein R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a lower alkyl group;

Y is a hydrophilic spacer sequence, or is omitted;

20 Z is a linking peptide that, when bonded to Q at the N-terminus or at a compatible side-chain amino group of Q, preserves at least 50% of the biological activity of Q, Z having the formula:

A-B-C-E-F, wherein:

25 A is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, or L-Ser, or is deleted;

B is D-Lys or D-Tyr, or is deleted;

30 C is Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, or 4) 3-pyridyl-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, or L-4-OH-Pro, or is deleted;

E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and

5

F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln;

10 provided that when A, B, C, and E are Tyr, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is not Lys; and when A, B, C, and E are Lys, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, E is not Tyr or Lys; and when A and B are deleted, and C and E are Lys and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys, and

15 Q is a targeting moiety, or is omitted.

53. The method of claim 52, wherein X is a cytotoxic agent.

20 54. The method of claim 53, wherein said cytotoxic agent is camptothecin, homocamptothecin, colchicine, combretastatin, dolistatin, doxorubicin, methotrexate, podophyllotoxin, rhizoxin, rhizoxin D, a taxol, paclitaxol, CC1065, a maytansinoid, or derivatives or analogs thereof.

25 55. The method of claim 52, wherein said hydrophilic spacer sequence is a peptide that increases the hydrophilic biodistribution of said compound.

30 56. The method of claim 55, wherein said peptide has the formula $U(V-V)_n$, wherein U is D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosine, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, or (NH₂-(CH₂)_m-COOH), where m=2-10, inclusive, or is deleted; each V is independently selected from the group consisting of: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, or L-4 hydroxy-Pro; and n=1-50, inclusive.

57. The method of claim 56, wherein V is independently D-Ser or L-Ser.

58. The method of claim 56, wherein at least one V is a D-amino acid.

59. The method of claim 52, wherein said hydrophilic spacer sequence is a
5 hydrophilic polymer.

60. The method of claim 59, wherein said hydrophilic polymer is polyethylene glycol, polyvinyl acetate, or polyvinyl alcohol.

10 61. The method of claim 52, wherein said targeting moiety is a biologically-active peptide.

62. The method of claim 61, wherein said biologically-active peptide is somatostatin, bombesin, a KiSS peptide, a urotensin II peptide, gonadotropin-releasing
15 hormone (GnRH) I and II peptides, octreotide, depreotide, vapreotide, vasoactive intestinal peptide (VIP), cholecystokinin (CCK), insulin-like growth factor (IGF), RGD-containing peptides, melanocyte-stimulating hormone (MSH) peptide, neurotensin, calcitonin, a peptide comprising the complementarity determining region of an antitumor antibody, glutathione, a leukocyte-avid peptide comprising the amino acid
20 sequence YIGSR, the heparin-binding region of platelet factor-4 (PF-4), and a lysine-rich sequence, atrial natriuretic peptide (ANP), a β -amyloid peptide, a delta-opioid antagonist, annexin-V, endothelin, interleukin (IL)-1, IL-1ra, IL-2, IL-8, leukotriene B4 (LTB4), a chemotactic peptide, a GP IIb/IIIa receptor antagonist, epidermal growth factor, a human neutrophil elastase inhibitor, plasmin inhibitor, an antimicrobial peptide,
25 apticide P280, apticide P274, a thrombospondin receptor, bitistatin, pituitary adenylyl cyclase type I receptor (PAC1), fibrin α -chain, or derivatives or analogs thereof.

63. The method of claim 61, wherein said biologically-active peptide is an
antibody or an antibody fragment.

30

64. The method of claim 62, wherein said leukocyte-avid peptide is P483H.

65. The method of claim 62, wherein said delta-opioid antagonist is ITIPP(psi).

66. The method of claim 62, wherein said chemotactic peptide is N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-lysine (fMLFK).

5 67. The method of claim 62, wherein said GP IIb/IIIa receptor antagonist is DMP444.

68. The method of claim 62, wherein said human neutrophil elastase inhibitor is EPI-HNE-2 or EPI-HNE-4.

10

69. The method of claim 62, wherein said thrombospondin receptor is TP-1300.

70. The method of claim 61, wherein said biologically-active peptide targets
15 said compound to a cell or tissue in the body of a mammal.

71. The method of claim 52, wherein said targeting moiety is a peptide derived from a phage-display library, or a derivative or analog thereof, that targets said compound to a cell or tissue in the body of a mammal.

20

72. The method of claim 70 or 71, wherein said cell or tissue comprises a cancer cell, a white blood cell, cardiac tissue, brain tissue, or a tubercle infected with tuberculosis.

25 73. The method of claim 70 or 71, wherein said tissue is a tumor or a proliferative angiogenic blood vessel.

74. The method of claim 73, wherein said blood vessel is in the eye.

30 75. The method of claim 50, wherein Q is somatostatin or an analog thereof, bombesin or an analog thereof, or an antibody.

76. The method of claim 52, wherein Q is a somatostatin peptide.

77. The method of claim 52, wherein Q is a bombesin peptide.
78. The method of claim 63, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
- 5 79. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser.
80. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser.
- 10 81. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr.
82. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser.
83. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser.
- 15 84. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Ser-D-Lys-Ser.
85. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser.
- 20 86. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser.
87. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser.
88. The method of claim 52, wherein Z is Lys-D-Ser-D-Ser.
- 25 89. The method of claim 52, wherein Z is Ser-D-Lys-D-Ser.
90. The method of claim 52, wherein Z is Ser-D-Lys-Ser.
- 30 91. The method of claim 52, wherein Z is Nle-D-Tyr-D-Ser.
92. The method of claim 52, wherein Z is Lys-D-Tyr-D-Ser.

|||

93. The method of claim 52, wherein Z is Pal-D-Lys-D-Ser.

94. The method of claim 52, wherein Z is Thr-D-Tyr-D-Ser.

5 95. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-D-Lys.

96. The method of claim 52, wherein Z is D-Ser-D-Tyr.

97. The method of claim 52, wherein Z is D-Lys-D-Lys.

10

98. The method of claim 52, wherein Z is D-Lys-D-Tyr.

99. The method of claim 52, wherein Z is D-Tyr-D-Lys.

15

100. The method of claim 52, wherein Z has the formula:

E-F, wherein:

E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5
20 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Gln, or L-Gln; and

F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D
Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5
25 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln.

101. The method of claim 52, wherein said disease is inflammatory bowel
disease, rheumatoid arthritis, acromegaly, tuberculosis, a tumor of the lung, breast,
brain, eye, prostate or colon; a tumor of neuroendocrine origin; or angiogenesis that
30 causes inappropriate proliferation of blood vessels.

102. The method of claim 101, wherein said tumor of neuroendocrine origin is
carcinoid syndrome.

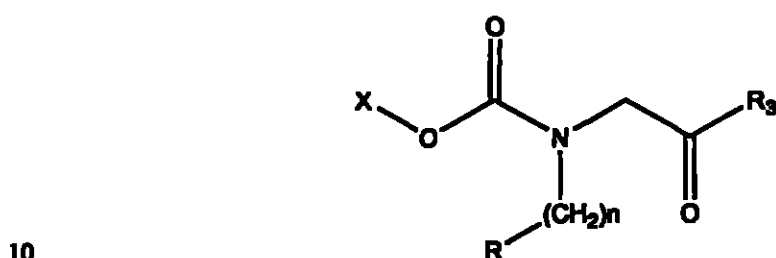
103. The method of claim 101, wherein said blood vessels are in the eye.

104. The method of claim 52, wherein comprises 1 to 20 carbon atoms.

5

105. The method of claim 104, wherein R comprises 1 to 8 carbon atoms.

106. A compound represented by the following formula:



wherein:

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

15

n is an integer from 0 to 6, wherein (CH₂)_n is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

20 R is N(R₁R₂), OR₁, or SR₁, wherein R₁ and R₂ are, independently, hydrogen or a lower alkyl group, and wherein R₃ is a NH(CH₂)_mSH group and m = 2 to 6, D or L cysteine, a benzophenone, or an OH group.

107. The compound of claim 106, wherein the R₃ group can be used to attach a peptide, protein, or antibody to said compound.

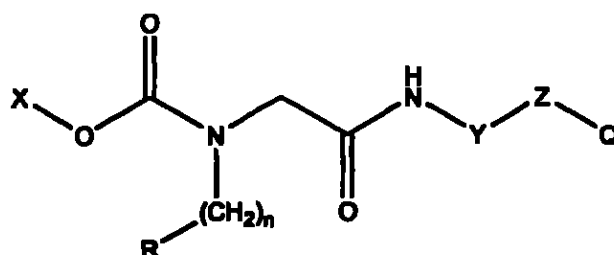
108. The compound of claim 106, wherein R₃ is NH(CH₂)_mSH and m = 2 to 6, and wherein said peptide, protein, or antibody is attached to said compound by a thiol reaction.

30

109. The compound of claim 106, wherein R₃ is a benzophenone and said peptide, protein, or antibody is attached to said compound by a photochemical reaction.

110. The compound of claim 109, wherein said benzophenone is p-benzoyl-
5 phenylalanine.

111. Use of a conjugate compound for the manufacture of a medicament for the treatment of a disease, said compound having the formula:



5

wherein:

X is a cytotoxic agent or therapeutic agent;

10 n is an integer from 0 to 6, wherein $(\text{CH}_2)_n$ is substituted or unsubstituted, a straight or branched chain, or is an alkyl, alkenyl, alkynyl, cyclic, heterocyclic, aromatic, or heteroaromatic group;

R is $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$, OR_1 , or SR_1 , wherein R_1 and R_2 are, independently, hydrogen or a
15 lower alkyl group;

Y is a hydrophilic spacer sequence, or is omitted;

Z is a linking peptide that, when bonded to Q at the N-terminus or at a
20 compatible side-chain amino group of Q, preserves at least 50% of the biological activity of Q, Z having the formula:

A-B-C-E-F, wherein:

A is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, or L-Ser, or is deleted;
25

B is D-Lys or D-Tyr, or is deleted;

C is Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, or 4) 3-pyridyl-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, or L-4-OH-Pro, or is deleted;
30

E is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln; and

5 F is D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-iodo-D-Tyr, 3-5 diiodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, or L-Gln;

provided that when A, B, C, and E are Tyr, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, F is
10 not Lys; and when A, B, C, and E are Lys, Tyr, Lys, and Tyr, respectively, E is not Tyr or Lys; and when A and B are deleted, and C and E are Lys and Tyr, respectively, F is not Tyr or Lys, and

Q is a targeting moiety, or is omitted.

15

112. The use of claim 111, wherein said disease is inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, acromegaly, tuberculosis, a tumor of the lung, breast, brain, eye, prostate or colon; a tumor of neuroendocrine origin; or angiogenesis that causes
inappropriate proliferation of blood vessels.

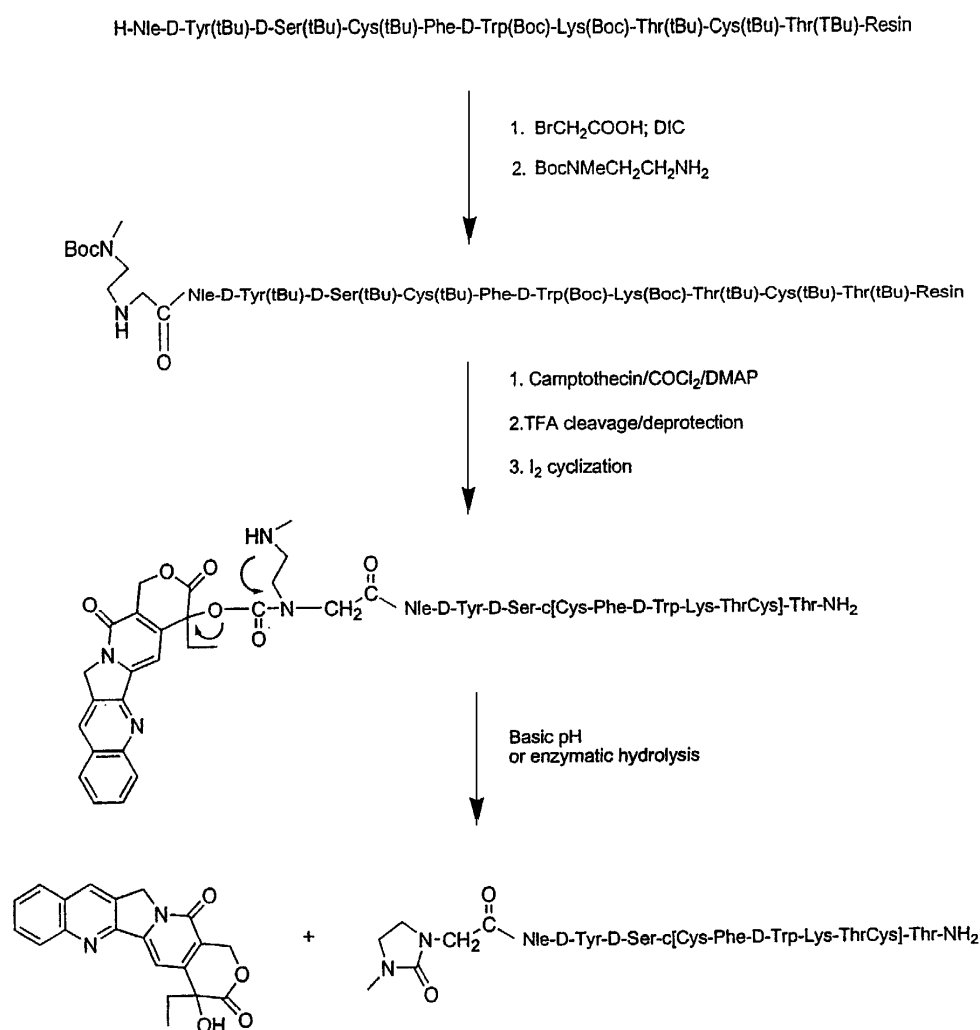
20

113. The use of claim 111, wherein said tumor of neuroendocrine origin is carcinoid syndrome.

114. The use of claim 111, wherein said blood vessels are in the eye.

25

Figure 1



56

SEQUENCE LISTING

<110> Administrators of the Tulane Educational Fund et al.

<120> Conjugates of Therapeutic or Cytotoxic
Agents and Biologically Active Peptides

<130> 07005/007W02

<150> US 60/360,831

<151> 2002-03-01

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Nle

<223> Synthetic

<400> 1

Ser Xaa Ser Ser

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

Ser Lys Ser Ser

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

Ser Lys Tyr Tyr

1

<210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 4
 Ser Lys Tyr Ser
 1

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 5
 Ser Ser Lys Ser
 1

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 2
 <223> Xaa= Nle

<223> Synthetic

<400> 6
 Ser Xaa Tyr Ser
 1

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 2
 <223> Xaa= pal

<223> Synthetic

57

<400> 7
Ser Xaa Tyr Ser
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 8
Ser Thr Tyr Ser
1

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 9
Lys Ser Ser
1

<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 10
Ser Lys Ser
1

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= NLE

<223> Synthetic

<400> 11
Xaa Tyr Ser

1

<210> 12
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 12
 Lys Tyr Ser
 1

<210> 13
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa-Pal

<223> Synthetic

<400> 13
 Xaa Lys Ser
 1

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<400> 14
 Thr Tyr Ser
 1

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa= Gln, Asn, Nle, or Nva.

<221> VARIANT
 <222> 3

<223> Xaa= Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva.

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa=BAla, 4Abu, Gly, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, or N-Me-D-Ala.

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa= Phe, Tyr, 4-Chloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva.

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa= Met, Phe, Tyr, 4-Chloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva.

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa= amide or N-alkylamide.

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa at position 9 is Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, or Nva.

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa at position 10 is Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, Nva, or a lower alkyl amide.

<223> Synthetic

<400> 15

Xaa Trp Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa at position 3 is Nle

<400> 16

Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<221> VARIANT
 <222> 3
 <223> Xaa at positon 3 is Nle

<221> MOD_RES
 <222> 6,11
 <223> Cys at positions 6 and 11 are circularized

<400> 17
 Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<221> MOD_RES
 <222> 8
 <223> Ala at position 8 is bAla

<221> VARIANT
 <222> 11
 <223> Xaa at position 11 is Nle

<400> 18
 Gly Ser Lys Gln Trp Ala Val Ala His Phe Xaa
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic

<221> MOD_RES
 <222> 8
 <223> Ala at position 8 is bAla

<221> VARIANT
 <222> 11
 <223> Xaa at position 11 is Nle

<400> 19

29

Gly Ser Tyr Gln Trp Ala Val Ala His Phe Xaa
1 5 10

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 20
His Leu Gln Ile Gln Pro Trp Tyr Pro Gln Ile Ser Gly Lys Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa at position 4 is Nle

<400> 21
Gly Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa at position 4 is Nle

<221> MOD_RES
<222> 7, 12
<223> Cys at positions 7 and 12 are circularized

<400> 22
Gly Ser Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa at position 5 is Nle

<400> 23

Gly	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys	Thr	Cys	Thr
1				5					10				

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa at position 6 is Nle

<400> 24

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys	Thr	Cys	Thr
1				5					10				15	

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa at position 7 is Nle

<400> 25

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys	Thr	Cys	Thr
1					5				10					15	

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 8

60

<223> Xaa at position 8 is Nle

<400> 26

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys	Thr	Cys
1						5				10					15	
Thr																

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa at position 9 is Nle

<400> 27

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys	Thr
1						5				10				15	
Cys	Thr														

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa at position 10 is Nle

<400> 28

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp	Lys
1						5				10				15	
Thr	Cys	Thr													

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 11

<223> Xaa at position 11 is Nle

<400> 29

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe	Trp
1				5					10					15	
Lys	Thr	Cys	Thr												
			20												

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa at position 12 is Nle

<400> 30

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys	Phe
1				5					10					15	
Trp	Lys	Thr	Cys	Thr											
			20												

<210> 31

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 13

<223> Xaa at position 13 is Nle

<400> 31

Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Cys
1				5					10					15	
Phe	Trp	Lys	Thr	Cys	Thr										
			20												

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 14

<223> Xaa at position 14 is Nle

<400> 32

61

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr Ser
 1 5 10 15
 Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
 20

<210> 33
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <221> VARIANT
 <222> 15
 <223> Xaa at position 15 is Nle

<400> 33
 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa Tyr
 1 5 10 15
 Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
 20

<210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <221> VARIANT
 <222> 16
 <223> Xaa at position 16 is Nle

<400> 34
 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
 20 25

<210> 35
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic
 <221> VARIANT
 <222> 17
 <223> Xaa at position 17 is Nle

<400> 35
 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser

1 **5** **10**

Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr

 20 25

```
<210> 36
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Synthetic

```
<221> VARIANT
<222> 18
<223> Xaa at position 18 is Nle
```

<400> 36
Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5 10 15
Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
20 25

```
<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Synthetic

<400> 37
Cys Phe Trp Lys Thr Cys
1 5

```
<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Synthetic

```
<221> MOD_RES
<222> 1, 6
<223> Cys at positions 1 and 6 are circularized
```

<400> 38
Cys Phe Trp Lys Thr Cys
1 5

```
<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

WO 03/074551

PCT/US03/06657

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa at position 3 is Nle

<400> 39

Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa at position 3 is Nle

<221> MOD_RES

<222> 6, 11

<223> Cys at positions 6 and 11 are circularized

<400> 40

Gly Ser Xaa Tyr Ser Cys Phe Trp Lys Thr Cys Thr
1 5 10

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 07005/007W02

Box No. I TITLE OF INVENTION

CONJUGATES OF THERAPEUTIC OR CYTOTOXIC AGENTS AND
BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND
1430 Tulane Avenue
New Orleans, Louisiana 70112
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

FUSELIER, Joseph A.
8220 Neron Place
New Orleans, Louisiana 70118
United States of America

This person is:

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (if this check-box
is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant
for the purposes of:☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent☐ common
representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CLARK, Paul T.
CLARK & ELBING LLP
101 Federal Street
Boston, Massachusetts 02110
United States of America

Telephone No.

(617) 428-0200

Facsimile No.

(617) 428-7045

Teleprinter No.

N/A

Agent's registration No. with the Office

30,162

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

6x

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S) <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) COY, David H. 1529 Fourth Street New Orleans, Louisiana 07130 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Box No. V DESIGNATION OF STATES

Mark the applicable check-boxes below; at least one must be marked.

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a):

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)
- ☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, BG Bulgaria, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, CZ Czech Republic, DE Germany, DK Denmark, EE Estonia, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, SI Slovenia, SK Slovakia, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|---|--|--|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ GM Gambia | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ AG Antigua and Barbuda | ☒ HR Croatia | ☒ OM Oman |
| ☒ AL Albania | ☒ HU Hungary | ☒ PH Philippines |
| ☒ AM Armenia | ☒ ID Indonesia | ☒ PL Poland |
| ☒ AT Austria | ☒ IL Israel | ☒ PT Portugal |
| ☒ AU Australia | ☒ IN India | ☒ RO Romania |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ IS Iceland | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ JP Japan | |
| ☒ BB Barbados | ☒ KE Kenya | ☒ SC Seychelles |
| ☒ BG Bulgaria | ☒ KG Kyrgyzstan | ☒ SD Sudan |
| ☒ BR Brazil | ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | ☒ SE Sweden |
| ☒ BY Belarus | ☒ KR Republic of Korea | ☒ SG Singapore |
| ☒ BZ Belize | ☒ KZ Kazakhstan | ☒ SK Slovakia |
| ☒ CA Canada | ☒ LC Saint Lucia | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ LK Sri Lanka | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ CN China | ☒ LR Liberia | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ CO Colombia | ☒ LS Lesotho | ☒ TN Tunisia |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ LT Lithuania | ☒ TR Turkey |
| ☒ CU Cuba | ☒ LU Luxembourg | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ LV Latvia | |
| ☒ DE Germany | ☒ MA Morocco | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ DK Denmark | ☒ MD Republic of Moldova | ☒ UA Ukraine |
| ☒ DM Dominica | ☒ MG Madagascar | ☒ UG Uganda |
| ☒ DZ Algeria | ☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | ☒ US United States of America (as a CIP) |
| ☒ EC Ecuador | ☒ MN Mongolia | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ EE Estonia | ☒ MW Malawi | ☒ VC Saint Vincent and the Grenadines |
| ☒ ES Spain | ☒ MX Mexico | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ FI Finland | ☒ MZ Mozambique | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ GB United Kingdom | ☒ NO Norway | ☒ ZA South Africa |
| ☒ GD Grenada | | ☒ ZM Zambia |
| ☒ GE Georgia | | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ GH Ghana | | |

Check-boxes below reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ☐ | ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ | ☐ |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(1) to (4) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No." (Indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) If, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificates of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
 - (vi) If, in Box No. VI, there are more than five earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

CONTINUATION OF BOX V:

continuation-in-part of USSN 60/360,831
filed 01 March 2002 (01.03.02)

See Notes to the request form

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING																																																							
This international application contains: (a) In paper form, the following number of sheets: <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">request (including declaration sheets)</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">6</td> </tr> <tr> <td>description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)</td> <td style="text-align: right;">58</td> </tr> <tr> <td>claims</td> <td style="text-align: right;">17</td> </tr> <tr> <td>abstract</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>drawings</td> <td style="text-align: right;">2</td> </tr> <tr> <td>Sub-total number of sheets</td> <td style="text-align: right;">84</td> </tr> <tr> <td>sequence listings</td> <td style="text-align: right;">13</td> </tr> <tr> <td>tables related thereto</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i></td> </tr> <tr> <td>Total number of sheets</td> <td style="text-align: right;">97</td> </tr> </table> (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto (c) ☒ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☒ sequence listings: diskette ☐ tables related thereto: <i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i>	request (including declaration sheets)	6	description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	58	claims	17	abstract	1	drawings	2	Sub-total number of sheets	84	sequence listings	13	tables related thereto		<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>		Total number of sheets	97	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">1. ☒ fee calculation sheet</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>2. ☐ original separate power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>7. ☐ translation of international application into (language):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>9. ☐ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>10. ☒ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> <tr> <td>11. ☒ other (specify): TMA, Ltr., Check, Return Postcard,</td> <td style="text-align: right;">:</td> </tr> </table>	1. ☒ fee calculation sheet	:	2. ☐ original separate power of attorney	:	3. ☐ original general power of attorney	:	4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	5. ☐ statement explaining lack of signature	:	6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	7. ☐ translation of international application into (language):	:	8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	9. ☐ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:	(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:	10. ☒ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:	(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:	(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:	(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	11. ☒ other (specify): TMA, Ltr., Check, Return Postcard,	:
request (including declaration sheets)	6																																																						
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	58																																																						
claims	17																																																						
abstract	1																																																						
drawings	2																																																						
Sub-total number of sheets	84																																																						
sequence listings	13																																																						
tables related thereto																																																							
<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i>																																																							
Total number of sheets	97																																																						
1. ☒ fee calculation sheet	:																																																						
2. ☐ original separate power of attorney	:																																																						
3. ☐ original general power of attorney	:																																																						
4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:																																																						
5. ☐ statement explaining lack of signature	:																																																						
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:																																																						
7. ☐ translation of international application into (language):	:																																																						
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:																																																						
9. ☐ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	:																																																						
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column	:																																																						
10. ☒ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers)	:																																																						
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:																																																						
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:																																																						
(iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:																																																						
11. ☒ other (specify): TMA, Ltr., Check, Return Postcard,	:																																																						
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	NONE	Language of filing of the international application:	ENGLISH																																																				
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i> for THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND et al. <u>Susan M. Muehlend</u> Paul T. Clark																																																							

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid
For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

69

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU SEP 06 2003

To:

CLARK & ELBING LLP

CLARK, Paul, T.
Clark & Elbing LLP
101 Federal Street
Boston, MA 02110
United States of AmericaDate of mailing (day/month/year)
10 September 2003 (10.09.03)Applicant's or agent's file reference
07005/007WO2

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US03/06657International filing date (day/month/year)
03 March 2003 (03.03.03)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

COY, David, H.
1529 Fourth Street
New Orleans, LA 70130
United States of AmericaState of Nationality
USState of Residence
US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

COY, David, H.
1529 Fourth Street
New Orleans, LA 70130
United States of AmericaState of Nationality
USState of Residence
US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.87.40

Authorized officer

N. Lindner

Telephone No. (41-22) 338 9720

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

RECEIVED

MAY 5 2003

CLARK, Paul, T.
Clark & Elbing LLP
101 Federal Street
Boston, MA 02110
United States of America

CLARK & ELBING LLP

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2003 (15.05.03)	
Applicant's or agent's file reference 07005/007WO2	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US03/06657	International filing date (day/month/year) 03 March 2003 (03.03.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 March 2002 (01.03.02)
Applicant THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
01 Marc 2002 (01.03.02)	60/360,831	US	05 May 2003 (05.05.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Maurice COVINO
Facsimile No. (41-22) 338.87.40	Telephone No. (41-22) 338 8455

PATENT COOPERATION TREATY

7/

MAY 10 2004

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

CLARK, Paul, T.
Clark & Elbing LLP
101 Federal Street
Boston, MA 02110
United States of America

Date of mailing (day/month/year)
29 April 2004 (29.04.2004)

Applicant's or agent's file reference
07005/007WO2

IMPORTANT INFORMATION

International application No.
PCT/US2003/006657

International filing date (day/month/year)
03 March 2003 (03.03.2003)

Priority date (day/month/year)
01 March 2002 (01.03.2002)

Applicant
THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,
SI,SK,TR
National : BG,CA,CN,DE,GB,IL,JP,KP,KR,MN,NO,PL,RO,RU,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BR,BY,BZ,CH,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,
EE,ES,FI,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,
MG,MK,MW,MX,MZ,NZ,OM,PH,PT,SC,SD,SE,SG,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,
VN,YU,ZA,ZM,ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 38(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 38(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.87.40

Authorized officer:

Sabine Przymusinski

Telephone No. (41-22) 338 9484

From the INTERNATIONAL BUREAU

72

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

CLARK, Paul, T.
Clark & Ebing LLP
101 Federal Street
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED

SEP 22 2003

CLARK & E. BING LLP

Date of mailing(day/month/year) 12 September 2003 (12.09.03)		
Applicant's or agent's file reference 07005/007WO2		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/US03/06657	International filing date(day/month/year) 03 March 2003 (03.03.03)	Priority date(day/month/year) 01 March 2002 (01.03.02)
Applicant THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DE, DZ, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 12 September 2003 (12.09.03) under No. 03/074551

4. **TIME LIMITS** for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Judith Zahra
Facsimile No.(41-22) 740.14.35	Telephone No.(41-22) 338.91.11

CONJUGADOS DE AGENTES TERAPÉUTICOS O CITOTÓXICOS Y
PÉPTIDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Campo de la Invención

La invención se relaciona con conjugados de agentes terapéuticos o citotóxicos y péptidos biológicamente activos y usos de éstos.

Antecedentes de la Invención

El uso de compuestos de carbamato como prodrogas es bien conocido. Los compuestos de carbamato son bien adecuados para diseño de prodroga en razón a que ellos pueden ser utilizados para regenerar la droga padre si el punto de conexión a una molécula vector es un grupo hidrófilo o una amina. Las prodrogas de carbamato basadas en ciclización intramolecular se han reportado desde finales de los 80. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 4,812,590 (la cual corresponde a EP 0 296 811) describe derivados de 4-hidroxianisol carbamato como prodrogas para el suministro y concentración de 4-hidroxianisol en melanomas. Vigroux et al., (J. Med. Chem. 38, 3983-3994, 1995) describe prodrogas de acetaminofén que incorporan N-(2-

hidroxifenil sustituido)- y N-(2-hidroxipropil sustituido) carbamatos.

Un diseño de prodroga óptimo es aquel en el cual la droga se conjuga con un vector biológicamente activo de tal forma que el conjugado es completamente estable en circulación, pero libera el agente terapéutico limpiamente cuando se internaliza en las células objetivo. Varios tipos de tecnología ligadora intentan lograr esta meta mediante diferentes medios químicos. Dos tipos de fenómeno de biodegradación, hidrólisis pasiva e hidrólisis enzimática, se consideran típicamente. La hidrólisis pasiva ocurre cuando la molécula se degrada por simple descomposición química; ésteres, carbonatos, amidas y uretanos y todas susceptibles a varios grados de hidrólisis con el siguiente orden de estabilidad en un pH básico: uretanos>amidas>carbonatos>ésteres. La hidrólisis enzimática ocurre en circulación de plasma así como también luego de internalización. Si el resultado deseado es transportar el conjugado a la célula objetivo, es deseable que el conjugado sea muy resistente a las enzimas de plasma que podrían degradar el complejo en ruta. Los derivados de éster comúnmente utilizados son particularmente de pobre escogencia de ligador en razón a

que el compuesto periféricamente circulante es rápidamente atacado por esterasas ubicuas.

Otra estrategia ligadora capitaliza las diferencias de pH existentes entre el interior y exterior de las células. Los lisosomas, que son responsables por degradar moléculas dentro de las células, tienen un pH de 4-6, aunque el plasma y el fluido extracelular tengan un pH de 7,4. Un ligador que se diseña para degradar a pH 5, pero es estable a pH 7, puede ser útil para suministrar el conjugado a las células, asumiendo que el conjugado no sufre de hidrólisis pasiva o enzimática en el plasma. Sin embargo, esta estrategia ligadora no es óptima para conjugados de péptido porque la mayoría del trabajo y purificación de los péptidos sintéticos se hace en medio ácido.

Aún otro intento de los ligadores químicos para capitalizar en las enzimas específicas se encuentra en los lisosomas. Por ejemplo, muchas secuencias de péptidos son estables en el plasma pero son específicamente clivadas por enzimas lisosomales.

Los efectos colaterales tóxicos de muchas de estas terapias, así como también los tratamientos estándar de enfermedad neoplásica, limitan efectivamente la cantidad de agente activo que se puede administrar a un paciente. Adicionalmente, muchos agentes activos originan toxicidades específicas del órgano, limitando además la dosis que puede ser suministrada al tejido objetivo. Por ejemplo, la cardiotoxicidad de muchos miembros de la familia antraciclina reduce la dosis terapéutica máxima disponible para este grupo de agentes quimioterapéuticos. El suministro de droga objetivo de varios agentes terapéuticos puede disminuir la toxicidad en tejido normal e incrementar la eficacia del tratamiento al permitir los efectos localizados concentrados en los tejidos específicos.

La somatostatina, bombesina, y otros análogos de péptido biológicamente activos se han utilizado para detectar las células tumorales que sobre expresan receptores específicos para estos péptidos (ver, por ejemplo, Denzler and Reubi, Cancer 85(1): 188-198, 1999). Más aún, la somatostatina, bombesina y muchos otros análogos agonistas de péptidos biológicamente activos son rápidamente internalizados después de unirse a sus

receptores (ver, por ejemplo, Lukinius et al., Acta Onc. 38: 383-387, 1999). Esta internalización de los análogos de péptido puede resultar en translocación a los núcleos de la célula (Chem et al., Am J. Physiol. Renal Physiol., 279: F440-F448, 2000).

Los análogos de somatostatina se unen a los subtipos receptores de somatostatina específicos que están presentes en la superficie de los tejidos normales o enfermos específicos, incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, y una variedad de tipos tumorales, así como también vasos sanguíneos que suplementan muchos tumores (Denzler and Reubi, Cancer 85: 4188-198, 1999). Similarmente, los receptores específicos para otros péptidos biológicamente activos, la Sustancia P, pueden ser sobre regulados en varias enfermedades.

Al menos cinco subtipos de receptores de somatostatina se han caracterizado, y los tumores pueden expresar varios subtipos de receptor. (Shaer, et al., Int. J. Cancer 70: 530-537, 1997). La somatostatina de ocurrencia natural y sus análogos exhiben unión diferencial a estos subtipos de receptor, permitiendo el apuntamiento preciso de un análogo de péptido a los tejidos específicos enfermos.

Las propiedades físicas y químicas de muchos agentes citotóxicos hacen la conjugación de la droga a péptidos biológicamente activos, tales como somatostatina y bombesina, problemáticos. Por ejemplo, la droga puede reducir la especificidad de la unión o la actividad biológica del análogo de péptido limitando su efectividad como un agente objetivo. Adicionalmente, los agentes terapéuticos y citotóxicos pueden tener propiedades químicas que promuevan la acumulación de análogos de péptido de droga en ciertos órganos, incrementando la toxicidad y reduciendo la eficacia. Los medios efectivos para ligar agentes citotóxicos a un agente objetivo tal como el péptido o un anticuerpo biológicamente activo, aunque reteniendo la actividad de cada componente son necesarios para maximizar los efectos terapéuticos, aunque minimizando la toxicidad.

Resumen de la Invención

Las características de la invención conjugan un agente terapéutico o un agente citotóxico y una porción objetivo. En particular, los conjugados característicos de la invención que tienen un ligador químico clivable

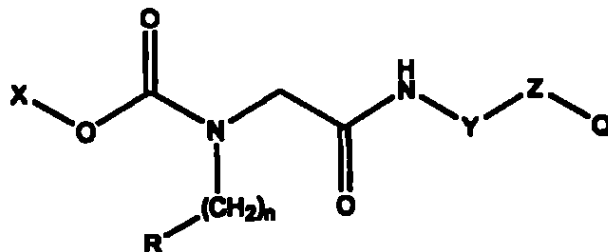
que reducen la liberación del agente citotóxico o terapéutico en circulación, hacen de esta manera el componente del agente activo del conjugado más fácilmente internalizado por una célula, y más fácilmente sujeto a control activo de índice de liberación dentro de la célula.

De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente invención caracteriza péptidos biológicamente activos conjugados con compuestos químicos a través de un enlace carbamato. Los conjugados de la presente invención suministran numerosas ventajas, tales como retención de la actividad biológica del péptido, estabilidad mejorada del conjugado en el plasma, y liberación intracelular del compuesto unido. Los péptidos preferidos para uso con los conjugados de la invención incluyen somatostatina, análogos de somatostatina, bombesina, análogos de bombesina, péptidos KiSS y análogos, péptidos de urotensina II y análogos, péptidos y análogos de Ngr. I y II, octreotide, depreotide, vapreotide, péptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistoquinina (CCK), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), péptidos que contienen RGD, péptido de hormona estimulante de melanocito (MSH), neurotensina, calcitonina, péptidos de

regiones que determinan complementariedad de un anticuerpo anti-tumoral, glutathiona, YIGSR (péptidos ávidos de leucocito, por ejemplo, P483H, que contiene la región de unión de heparina del factor-4 de plaqueta (PF-4) y una secuencia rica en lisina), péptido natriurético atrial (ANP), péptidos β -amiloides, antagonistas delta-opioide (por ejemplo, [^{125} I]ITIPP(psi)[H-Tyr(3'I)-Ticpsi[CH₂NH]Phe-Phe-OH]; ITIPP (psi)), anexin-V, endotelina, interleuking (IL)-1, IL-1ra, IL-2, y IL-8, leukotriena B₄ (LTB₄), péptidos quimiotácticos (por ejemplo, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina-lisina (fMLFK)), antagonistas receptores de GP IIb/IIIa (por ejemplo, DMP444), factor de crecimiento epidérmico, inhibidor de elastasa neutrófilo humano (por ejemplo, EPI-HNE-2 y EPI-HNE-4), inhibidor de plasmita, péptidos antimicrobiales, apticida (por ejemplo, P280 y P274), receptor de trombospondina (que incluye análogos tales como TP-1300), bitistatina, receptor tipo I de adenilil ciclase de pituitaria (PAC1), α -cadena de fibrina, y derivados y análogos de estos. También incluidos están péptidos derivados de una librería de despliegue de fago, y sustituciones conservadoras de estos, que son objetivos a una célula o tejido en el cuerpo de un mamífero (por

ejemplo, tejido enfermo, tal como un tumor o un vaso sanguíneo angiogénico proliferativo; ver, por ejemplo, Aina et al., Biopolymers 66: 184-199, 2002). Tales péptidos son útiles para agentes terapéuticos específicamente objetivo y agentes citotóxicos a una célula, tal como una célula cancerígena o un tejido en el cuerpo de un mamífero (por ejemplo, el suministro de drogas antiapoptósicas a tejido cardíaco o cerebral), o a células sanguíneas blancas selectivamente objetivo o tubérculos infectados con tuberculosis. Por ejemplo, cuando la somatostatina o la bombesina se utilizan como el péptido biológicamente activo en un conjugado de la invención, el agente terapéutico o citotóxico puede ser objetivo a una célula cancerígena que expresa un receptor de somatostatina o un receptor de bombesina. La invención también caracteriza anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un segmento de éste, que puede ser ligado al conjugado de la invención. Como se discutió anteriormente con respecto a los péptidos, cuando un anticuerpo se incorpora en un conjugado de la invención, el agente terapéutico o citotóxico puede ser objetivo de sitios de unión de anticuerpo específicos.

Los conjugados del primer aspecto de la invención tienen la siguiente fórmula general:



En donde

X es un agente citotóxico o terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde $(\text{CH}_2)_n$ está sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o heteroaromático;

R es $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$, OR_1 , o SR_1 donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior;

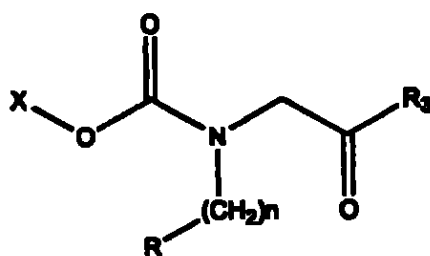
Y es una secuencia espaciadora hidrofílica, o se omite;

Z es un péptido ligador, o se omite; y

Q, cuando está presente, es una porción blanco.

En este y los otros aspectos de la invención, el grupo alquilo preferiblemente contiene 1-8 átomos de carbono; el grupo alquenilo preferiblemente contiene 1-X átomos de carbono, el grupo alquinilo contiene 1-X átomos de carbono; el grupo cíclico contiene...

Un segundo aspecto de la invención caracteriza un conjugado que tiene la fórmula:



En donde

X es un agente citotóxico o un agente terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde $(CH_2)_n$ está sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o heteroaromático;

84

R es $N(R_1R_2)$, OR_1 , o SR_1 donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior, en donde R_3 es un grupo $NH(CH_2)_mSH$ (donde $m=2$ a 6), una cisteína D o L, una benzofenona (por ejemplo, p-benzoil-fenilalanina), o un grupo OH. Un compuesto conjugado que tiene esta fórmula se puede utilizar para ligar a un péptido, proteína, o anticuerpo a través de un grupo tiol, carboxilato, o benzofenona fotoactiva que contiene R_3 . Además, un péptido o proteína puede ser fácilmente preparado al sintetizar el péptido o proteína directamente sobre el compuesto. Por ejemplo, el compuesto se puede suministrar de tal forma que el grupo R sea un grupo amino primario o secundario protegido tBoc, y se pueda agregar a la resina de peptidilo como se describió en los ejemplos suministrados adelante. Los péptidos, proteínas, y anticuerpos también se pueden unir al compuesto a través del uso de reacciones químicas reactivas con tiol conocidas cuando el grupo R_3 contiene un grupo tiol, o por una reacción fotoreactiva cuando R_3 contiene una porción benzofenona (ver, por ejemplo, Grez T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques" p. 146-152, 1996).

En las modalidades preferidas de todos los aspectos de la invención, X es un agente citotóxico seleccionado de camptotecina, homocamptotecina, colchicina, combretastatina, dolistatina, doxorubicina, metotrexato, podofilotoxina, rizoxina, rizoxina D, un taxol, paclitaxol, CC1065, o un maitansinoide y derivados y análogos de estos. Por ejemplo, el agente citotóxico camptotecina está ligado a través de su grupo hidrófilo libre simple a un ligador de carbamato. En estas modalidades de la invención, n es preferiblemente 2 y R es preferiblemente NH_2 .

Y es una secuencia espaciadora hidrofílica que puede ser, preferiblemente, un péptido que incrementa la distribución del conjugado o un polímero hidrofílico. Por ejemplo, Y puede ser una secuencia de péptido que incrementa la distribución hidrofílica del conjugado de péptido biológicamente activo. En una modalidad preferida, Y tiene la fórmula $\text{U}(\text{V}-\text{V})_n$, en donde U es D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosina, Lys, Orn, Dab, Dap, 4- NH_2 -Phe, o $(\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_m-\text{COOH})$, donde $m=2-10$, inclusive, o está suprimido; cada V es independientemente seleccionado del grupo que consiste de: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro o L-4

hidroxi-Pro; y $n=1-50$, inclusive. En otra modalidad preferida, cada V es independientemente D-Ser o L-Ser. En otra modalidad preferida, al menos un V es un aminoácido D.

Y puede ser un polímero hidrofílico. Por ejemplo, Y puede ser polietilenglicol, polivinil acetato, polivinil alcohol, HPMA (N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) o copolímeros HPMA, α,β -poli(N-hidroxietil)-DL-aspartamida (PHEA), o α,β -poli(N-hidroxipropil)-DL-aspartamida.

Z es un péptido ligador que preserva al menos 50% de la actividad biológica de Q, cuando Z está unido a Q a través de un grupo de terminal o de cadena lateral de Q. Generalmente, Z puede ser un péptido de 2, 3, 4, o 5 residuos. Z tiene la fórmula: A-B-C-E-F, donde A es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, o L-Ser, o está suprimido; B es D-Lys, D-Tyr, o está suprimido; C es Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, o 4) 3-piridilo-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, o está suprimido; E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-

Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; con la condición de que cuando A, B, C, y E son Tyr, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Lys; y cuando A, B, C, y E, son Lys, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys; y cuando A y B están suprimidos, y C y E son Lys y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys. En algunos péptidos, puede ser preferible que Z esté ausente.

En otras modalidades, Z tiene la fórmula (cuando A, B, y C están suprimidas): E-F donde E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln.

En modalidades preferidas, Z es un D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 1), D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 2), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr (ID de Sec. No.: 3), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 4), D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 5), D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (ID de Sec. No.: 5), D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 6), D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 7), D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 8), Lys-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 9), Ser-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 10), Ser-D-Lys-Ser (ID de Sec. No.: 10), Nle-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 11), Lys-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 12), Pal-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 13), Thr-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 14), D-Ser-D-Lys, D-Ser-D-Tyr, D-Lys-D-Lys, D-Lys-D-Tyr, o D-Tyr-D-Lys.

Q es una porción blanco, tal como un péptido biológicamente activo o péptidos derivados de fago. En las modalidades preferidas, Q es un péptido, tal como somatostatina, un análogo de somatostatina, bombesina, un análogo de bombesina, o un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal. El péptido biológicamente activo preferido o las porciones blanco son internalizadas mediante células seleccionadas por vía de un proceso de internalización activo, tal como cuando se une a un

receptor acoplado con proteína G o 2 receptores tipo somatostatina (SSTR2).

Otro aspecto de la invención caracteriza un método para el tratamiento de una enfermedad o modificación de una función biológica. El método incluye administrar a un animal de sangre caliente necesitado de este, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva o que modifica la función biológica de un conjugado de la invención. Un experto en la técnica reconocerá que el conjugado particular utilizado dependerá del estado de la enfermedad a ser tratada o del sistema biológico a ser modificado. En particular, un experto en la técnica será capaz de seleccionar una porción blanco particular y un agente citotóxico o terapéutico para preparar un conjugado de la invención que tenga especificidad para el tratamiento de la enfermedad o sea capaz de modificar la función biológica deseada. En las modalidades preferidas la enfermedad es un tumor del pulmón, pecho, cerebro, ojo, próstata o colón o un tumor de origen neuroendocrino (por ejemplo, síndrome carcinoide). La enfermedad también es una condición que resulta de o que causa proliferación de los vasos sanguíneos angiogénicos.

Por "administración" o "administrar" se significa un método para dar una dosis de una composición farmacéutica a un mamífero, donde el método es, por ejemplo, tópico, oral, intravenoso, intraperitoneal, o intramuscular. El método preferido de administración puede variar dependiendo de varios factores, por ejemplo, los componentes de la composición farmacéutica, el sitio de la enfermedad potencial o actual y la severidad de la enfermedad.

En las descripciones genéricas de los compuestos de esta invención, el número de átomos de un tipo particular en un grupo sustituyente es generalmente dado como un rango. Por ejemplo, un grupo alquilo que contiene 1 a 8 átomos de carbono o alquilo C₁₋₈. Referencia a tal rango pretende incluir referencias específicas a grupos que tienen cada uno de los números enteros de átomos dentro del rango especificado. Por ejemplo, un grupo alquilo de 1 a 8 átomos de carbono incluye cada uno de C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, y C₈. Un heteroalquilo C₁₋₈, por ejemplo, incluye de 1 a 8 átomos de carbono además de uno o más heteroátomos. Otros números de átomos y otros tipos de átomos también se pueden indicar de manera similar.

Como se utiliza aquí, "alquilo", pretende incluir un grupo hidrocarburo de cadena ramificada o recta alifática y combinaciones de estos. Un alquilo es opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes. Un grupo alquilo contiene 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 8 átomos de carbono. Ejemplo incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, hexilo, octilo y similares. Por "alquilo inferior" se significa un grupo alquilo de cadena ramificada o recta que tiene menos de 11 átomos de carbono, preferiblemente un alquilo C_1-C_8 . Por "alquilamida inferior" se significa un grupo alquilo inferior como se describió anteriormente sustituido con uno o más grupos que contienen amida. Como se utiliza aquí, los términos "alquilo" y el prefijo "alqu-" también se pueden referir a grupos cíclicos, es decir grupos cicloalquilo y cicloalquenilo. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos y policíclicos y preferiblemente tienen de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo, inclusive.

El término "alquenilo", sólo o en combinación, significa un hidrocarburo de cadena recta o ramificada que tiene uno o más dobles enlaces y contiene de 2 a 20 átomos de

carbono, preferiblemente de 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono. El término "alquinilo", sólo o en combinación, significa un hidrocarburo de cadena recta o ramificada que tiene uno o más triples enlaces y que contiene de 2 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 8 átomos de carbono.

Por "heteroalquilo" se significa un grupo ramificado o no ramificado en el cual uno o más metilenos ($-\text{CH}_2-$) son reemplazados por nitrógeno, oxígeno, azufre, carbonilo, tiocarbonilo, fosforilo, sulfonilo, o NR, donde R es un alquilo. Algunos ejemplos incluyen aminas terciarias, éteres, tioéteres, amidas, tioamidas, carbamatos, tiocarbamatos, fosforamidatos, sulfonamidas, y disulfuros. Un heteroalquilo puede opcionalmente incluir anillos monocíclicos, bicíclicos, o tricíclicos, en el cual cada anillo deseablemente tiene tres a seis miembros. El grupo heteroalquilo puede ser sustituido o no sustituido.

Por "análogo" se significa una molécula que difiere de, pero es estructuralmente, funcionalmente, y/o químicamente relacionado con la molécula de referencia. El análogo puede retener las propiedades esenciales,

funciones, o estructuras de la molécula de referencia. Más preferiblemente, el análogo retiene al menos una función biológica de la molécula de referencia. Generalmente, las diferencias están limitadas de tal forma que la estructura o secuencia de la molécula de referencia y el análogo son similares en total. Un análogo de péptido y su péptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácido por una o más sustituciones, adiciones, y/o supresiones, en cualquier combinación. Un residuo aminoácido sustituido o insertado puede o puede no ser uno codificado por código genético del análogo de péptido. Un análogo de un péptido o un polipéptido puede ser de ocurrencia natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no es conocida que ocurra naturalmente. Los análogos de ocurrencia no natural de los péptidos pueden ser hechos mediante síntesis directa, mediante modificación, o por técnicas de mutagénesis.

Por "péptido biológicamente activo" se significa cualquier péptido de ocurrencia natural, modificado, o sintético que esté involucrado en un proceso o función biológica. Ejemplos de péptidos biológicamente activos incluyen, pero no están limitados a: hormonas, factores

de crecimiento, neurotransmisores, antígenos, anticuerpos, o fragmentos de estos.

El término "péptido de bombesina" significa bombesina, o un análogo de ésta, que tiene al menos una actividad biológica de la bombesina nativa; preferiblemente esta actividad es la capacidad de unirse específicamente a uno o a todos los tres subtipos de receptor de bombesina conocidos en una célula que lleva un receptor de bombesina. Los análogos de bombesina incluyen, pero no están limitados a, péptidos seleccionados del grupo que contiene un octapéptido G-Trp-H-I-His-J-K-NHV (ID de Sec. No. 15), en donde G es GLN, Asn, Nle, o Nva; H es Ava, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, o Nva; I es β -Ala, ácido 4-aminobutírico, Gly, Ala, D-Ala, N-Me-Ala, o N-Me-D-Ala; J es Phe, Tyr, 4-Cloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, o Nva; K es Met, Phe, Tyr, 4-Cloro-Phe, 4-Fluoro-Phe, 4-Bromo-Phe, 4-NO₂-Phe, Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Nle, o Nva; y N representa una amida o una N-alquilamida y V es H o una alquilamida inferior.

Por "cíclico" se significa un grupo hidrocarburo que tiene 3 a 10 carbonos y más preferiblemente de 3 a 6 carbonos.

Por "agente citotóxico" se significa cualquier compuesto de ocurrencia natural, modificado, o sintético que sea tóxico a las células tumorales. Tales agentes son útiles en el tratamiento de neoplasmas, así como también en enfermedades inflamatorias, desordenes autoinmunes y en el tratamiento de otros síntomas o enfermedades caracterizadas por la proliferación de células o una población de células hiperactiva. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, inhibidores de tubulina, inhibidor de topoisomerasa I y II, agonistas o antagonistas hormonales, o inmunomoduladores. Los agentes citotóxicos pueden ser citotóxicos cuando se activan por luz o infrarroja (Photofrin, IR dyes; Nat. Biotechnol. 19(4): 327-331, 2001), pueden operar a través de otras sendas mecanísticas, o ser agentes potenciadores suplementarios.

Por "biodistribución hidrofílica" se significa la afinidad de los agentes péptidos de la invención para los

fluidos del cuerpo de un sujeto al que se le administra los agentes péptidos (por ejemplo, sangre, fluido cerebroespinal, orina, y otros fluidos del cuerpo), de tal forma que los agentes péptidos distribuidos a través del cuerpo del sujeto, pero que son rápidamente secretados en la orina por vía del riñón, aunque evitando la toma de órganos periféricos tales como los tumulos próximos al hígado, la vejiga, y el riñón.

Por "polímero hidrofílico" se significa un polímero soluble en agua de ocurrencia natural o sintético opcionalmente modificado que altera la biodistribución de un agente péptido de la invención. Ejemplos de tales polímeros incluyen, pero no están limitados a poli(etilenglicol) (PEG), poli(vinil alcohol) (PVA), polivinil acetato, dextrano, hidroxietil almidón, gelatina, PVP, PHPMA, α,β -poli[N(2-hidroxietil)-DL-aspartamida (PHEA), polisuccinamida (PSI), α,β -poli(N-hidroxipropil)-DL-aspartamida, etc. Estos polímeros se pueden modificar por, por ejemplo, succinilación (carga negativa), hidrólisis parcial de PSI (grupos carboxílicos), o reacción con compuestos para agregar grupos que contienen amino o carboxilo, etc. Tales

modificaciones opcionales pueden incrementar o cambiar la hidrofiliidad del polímero, o posibilitar el acoplamiento del agente péptido o citotóxico o terapéutico de la invención. Tales polímeros y modificaciones son conocidas en la técnica y son descritas en, por ejemplo, Yamoaka et al., J. Pharmacol. Sci. 83: 601-606, 1994; Rypacek et al., Pfluges Arch. 392: 211-217, 1982; Yamoaka et al., J. Pharm. Pharmacol. 47: 479-486, 1995; Francesco, Bioconjugate Chemistry 9 (4): 418-450, 1998; Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27 (4): 290-306, 1994; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Por "secuencia espaciadora hidrofílica" se significa cualquier péptido hidrofílico o polímero hidrofílico que incremente la distribución de un compuesto de la invención, tal como al inhibir la acumulación periférica y/o evacuación renal promotora. Ejemplos de secuencias espaciadoras hidrofílicas para uso con la presente invención se suministran aquí.

Por "péptido" se significa cualquier polipéptido, péptido (incluyendo péptidos cíclicos o ramificados), o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos uno al otro

por enlaces péptidos o enlaces péptidos modificados. Como se utilizan aquí, péptido se refiere a cadenas cortas, comúnmente denominadas como péptidos, oligopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, hasta de aproximadamente 100 residuos de longitud. Los péptidos pueden contener aminoácidos diferentes de los aminoácidos codificados con 20 genes, y enlaces diferentes de las uniones de péptido. Los péptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificados sea por procesos naturales, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en el arte. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo la estructura del péptido, y las cadenas laterales del aminoácido, y los terminales amino o carboxilo.

Las notaciones utilizadas aquí para los residuos de aminoácido de péptido son aquellas abreviaturas comúnmente utilizadas en el arte. Las abreviaturas menos comunes Abu, Ava, β -Ala, hSer, Nle, Nva, Pal, Dab, y Dap representan ácidos 2-amino-butírico, ácido amino valérico, ácido beta-aminopropiónico, homoserina, norleucina, norvalina, (2, 3, o 4) 3-piridil-Ala, ácido 1,4-diaminobutírico, y ácido 1,3-diaminopropiónico,

respectivamente. En todos los aspectos de la invención, se nota que cuando los aminoácidos no son designados como aminoácidos de D- o L-, el aminoácido es aminoácido L o puede ser aminoácido D- o L-, a menos que el contexto requiera un isómero particular.

Por "péptido de somatostatina" se significa una somatostatina, o un análogo de ésta, que tiene al menos una actividad biológica de somatostatina nativa; preferiblemente, esta actividad es la capacidad de unirse específicamente a un receptor de somatostatina en una célula que lleva un receptor de somatostatina. Muchos de tales análogos que tienen actividad biológica son conocidos y se han descrito, por ejemplo, en Hornik et al., U.S.P.N. 5,770,687; Coy et al., U.S.P.N. 5,708,135; Hoeger et al., U.S.P.N. 5,750,499; McBride et al., U.S.P.N. 5,620,675; Coy et al., U.S.P.N. 5,633,263; Coy et al., U.S.P.N. 5,597,894; Taylor et al., U.S.P.N. 5,073,541; Coy et al., U.S.P.N. 4,904,642; Dean, U.S.P.N. 6,017,509; Hoffman et al., WO 98/47524; y A.E. Bogden, U.S.P.N. 5,411,943, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Por "porción blanco" se significa cualquier molécula que una específicamente o que se asocia reactivamente a complejos con un receptor diferente de la porción receptora asociada con una población de célula objetivo dada. Esta molécula reactiva de célula, a la cual está ligado el reactivo de droga por vía del ligador en el conjugado, puede ser cualquier molécula que se una a, complejos con o reaccione con la población de células que se procura que sea terapéutica o de otra forma biológicamente modificada y, que posea un grupo amina reactivo libre y se pueda modificar para contener tal grupo amina. Las moléculas reactivas celulares actúan para suministrar el conjugado, y, así, el agente citotóxico o terapéutico a las poblaciones de célula objetivo particular con la reacciona el ligando. Tales moléculas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de peso molecular grande (generalmente mayores de 10000 daltons) tales como, por ejemplo, anticuerpos, proteínas de peso molecular más pequeño (generalmente menos de 10000 daltons), ligandos de polipéptido o péptido, y ligandos no peptídico.

Por "agente terapéutico" se significa cualquier compuesto que se utilice en la detección, diagnosis o tratamiento

de enfermedad humana. Tales compuestos pueden ser de ocurrencia natural, modificados, o sintéticos. Los agentes terapéuticos pueden promover o inhibir cualquier proceso biológico implicado en la senda de enfermedad humana. Los blancos de enfermedad preferidos incluyen, pero no están limitados a, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, apoptosis de células neoplásicas, tejidos cardíacos, o células aberrantemente proliferantes, . síndrome carcinoide, acromegalia, tuberculosis, y angiogénesis que origina la proliferación inapropiada de los vasos sanguíneos (por ejemplo, degeneración muscular que resulta de angiogénesis en exceso en el ojo). Un agente terapéutico puede ser, por ejemplo, antineoplásico, incluyendo citotóxico. Los agentes antineoplásicos pueden ser agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, agonistas o antagonistas hormonales, inhibidores de tubulina, inhibidores de topoisomerasa I y II, agentes anti- o pro-apoptóticos, o inmunomoduladores. Los agentes antineoplásicos pueden operar a través de otras sendas mecanísticas, o los agentes antineoplásicos pueden ser agentes potenciadores suplementarios.

Por "tratar" se significa administrar una composición farmacéutica para propósitos profilácticos y/o terapéuticos. Por "prevenir la enfermedad" se refiere a un tratamiento profiláctico de un paciente que todavía no está enfermo pero está susceptible a, o en riesgo de, una enfermedad particular. Por "tratar la enfermedad" o el uso de "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar un tratamiento a un paciente que ya sufre de la enfermedad para mejorar la enfermedad y mejorar la condición del paciente. Así, en las reivindicaciones y las modalidades, tratar es la administración a un mamífero para propósitos terapéuticos o profilácticos.

Breve Descripción De Los Dibujos

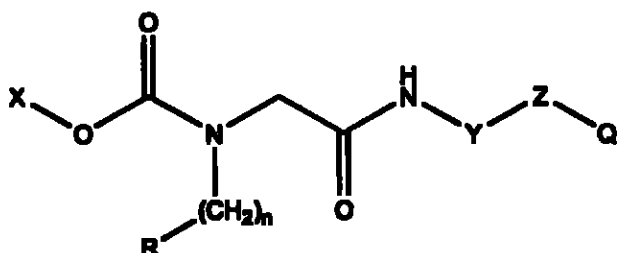
La fig. 1 es un diagrama que demuestra la síntesis en resina de un análogo de somatostatina que contiene un grupo BINAR y unir la camptotecina por vía de un grupo de enlace carbonato seguido por la remoción de una resina para dar compuesto 2. Las condiciones básicas o el ataque enzimático da como resultado la liberación ayudada por nucleófilo de la camptotecina libre.

La fig. 2 es una gráfica que demuestra la curva de respuesta de dosis para conjugados 1-6 y que muestra la capacidad de los conjugados 1-6 para matar las células IMR-32 positivas con subtipo 2 de receptor de somatostatina (SSTR2) después de la incubación durante 3 días utilizando un ensayo MTT de viabilidad celular.

Descripción Detallada De La Invención

La presente invención caracteriza conjugados de agentes citotóxicos o terapéuticos y péptidos biológicos. Estos conjugados suministran muchas ventajas para la administración de tales agentes citotóxicos o terapéuticos. Los conjugados de la invención pueden estar dirigidos a sitios blanco o células específicas, que resultan en la internalización efectiva del agente citotóxico o terapéutico. Además, los conjugados de la invención exhiben liberación reducida del agente citotóxico o terapéutico en circulación. Los conjugados de la invención pueden ser modificados según se desee para ajustar la liberación del agente citotóxico o terapéutico.

Los conjugados de la invención tienen la siguiente fórmula general:



En donde X es un agente citotóxico o un agente terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde $(\text{CH}_2)_n$ es un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o heteroaromático de cadena recta o ramificada, sustituido o no sustituido;

R es $\text{N}(\text{R}_1\text{R}_2)$, OR_1 , o SR_1 donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior;

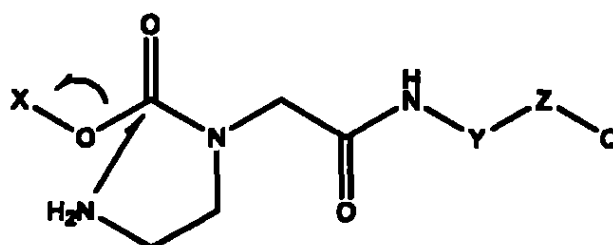
Y es una secuencia espaciadora hidrofílica, o se omite;

Z es un péptido ligante, o se omite;

Q es una porción blanco.

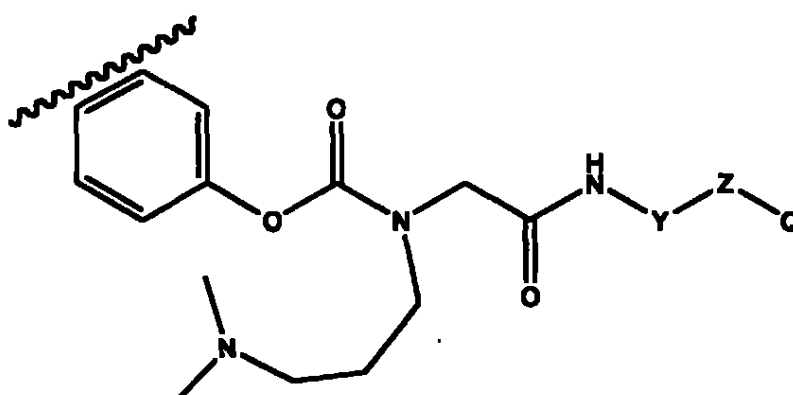
105

De acuerdo a la presente invención, el índice de liberación del agente citotóxico puede ser controlado al modificar la estructura química del conjugado. Por ejemplo, cuando R es NH_2 y $n=2$, puede ocurrir la siguiente reacción de desplazamiento:



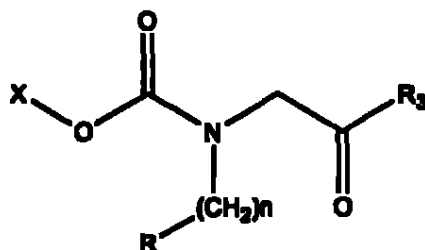
Sin desear estar unido a ninguna teoría, en el mecanismo anterior, el grupo nucleofílico ayuda en la liberación intracelular del agente citotóxico o terapéutico (como "X-OH") en forma ajustable dependiente de n . La reactividad del nucleófilo se puede incrementar o disminuir de acuerdo con la longitud de la cadena lateral de hidrocarburo, es decir, de acuerdo con el valor de n , o al cambiar R a NCH_3 , OH , o $\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Por ejemplo, $n=2$ es preferible cuando el grupo citotóxico está unido al enlace carbamato a través de un grupo alquil-OH, por ejemplo, camptotecina, homocamptotecina, colchicina, combretastatina, dolistatina, doxorubicina, metotrexato,

podofilotoxina, rizoxina, rizixina D, rocaglamida, anguidina, un taxol, pactlitoxol, CC1065, o maitansinoide. Sin embargo, cuando el grupo citotóxico está unido a través de un grupo aril-OH (por ejemplo, combretastatina o rocaglamida) R es $N(CH_3)_2$ y $n=3$ es preferible:



Así, es evidente de las enseñanzas de aquí que los conjugados de la invención se pueden diseñar para controlar la liberación del agente citotóxico o terapéutico.

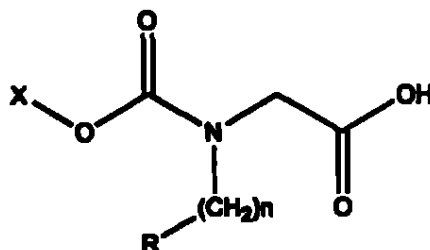
La invención también caracteriza un compuesto que tiene la fórmula:



En donde X es un agente citotóxico o un agente terapéutico;

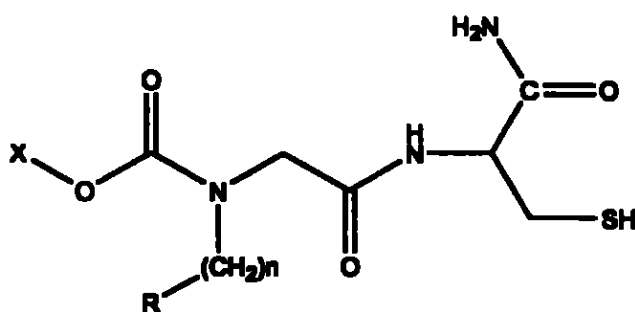
n es un entero de 0 a 6, en donde $(CH_2)_n$ es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o heteroaromático de cadena recta o ramificada, sustituido o no sustituido;

R es $N(R_1R_2)$, OR_1 , o SR_1 donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior; y en donde R_3 es un grupo $(CH_2)SH$ o un grupo OH. Por ejemplo, un compuesto que tiene la fórmula:



Se puede utilizar para ligar el compuesto a un péptido, proteína, o anticuerpo. Además, un péptido o proteína pueden ser directamente sintetizados sobre este conjugado, suministrando de esta manera medios fáciles de preparar compuestos de conjugado que contienen un péptido o proteína. El compuesto se puede suministrar de tal forma que el grupo R es un grupo amino primario o secundario protegido tBoc, y un péptido o proteína pueden ser agregados al compuesto como se describió en los ejemplos suministrados adelante.

Los péptidos, proteínas, y anticuerpos también se pueden unir a un compuesto que tiene la fórmula:



Este derivado R no protegido se puede utilizar para ligar péptidos, proteínas, y anticuerpos que utilizan reacciones químicas tiol-reactivas conocidas que se unen

a la porción tiol en la posición R₃ (ver, por ejemplo, Greg T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques" p. 146-152, 1996, y el EJEMPLO 21 adelante).

En todos los conjugados de la invención, X es preferiblemente seleccionado de agentes citotóxicos y agentes terapéuticos que contienen un grupo hidróxilo primario, secundario, terciario, benzílico o fenólico. Un experto en la técnica reconocerá, que para aquellos agentes citotóxicos o terapéuticos a los que les falte el grupo hidróxilo, un derivado que contiene tal grupo hidróxilo se puede preparar utilizando los procedimientos conocidos en el arte.

Los agentes citotóxicos preferidos son aquellos utilizados para terapia de cáncer, tal como, en general, agentes alquilantes, agentes anti-proliferativos, agentes que se unen a tubulina y similares. Las clases preferidas de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, la familia antraciclina de drogas, las drogas vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia pteridina de drogas, diinenos, y las podofilotoxinas. Los miembros particularmente útiles de aquella clase incluyen, por ejemplo, adriamicinaa,

carminomicina, daunorubicina, aminopterina, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, mitomicina C, porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, citosina arabinosida, podofilotoxina, o derivados de podofilotoxina tales como etoposida o fosfato de etoposida, melfalan, vinblastina, vincristina, leurosina, vindesina, leurosina y similares. Como se anotó previamente, el experto en la técnica puede hacer modificaciones químicas a los compuestos deseados con el fin de hacer reacciones de aquellos compuestos más convenientes para los propósitos de preparar los conjugados de la invención. En las modalidades preferidas, X es un agente citotóxico seleccionado de camptotecina, homocamptotecina, colchicina, combretastatina, dolistatina, doxorubicina, metotrexato, podofilotixina, rizoxina, rizoxina D, un taxol, paclitaxol, CC1065, or un maitansinoide, y derivados y análogos de éstos. Por ejemplo, la camptotecina agente citotóxico está ligada a través de un grupo hidróxilo libre simple a un ligador de carbamato y la tiocolchicina se puede derivar de tal forma que esta contenga un grupo hidroxilo adecuado para uso de la estrategia de grupo enlazante descrita. En esta modalidad de la invención, n es preferiblemente 2 y R es preferiblemente NH_2 .

J/A

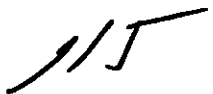
En los conjugados de la presente invención, X puede ser cualquier porción citotóxica o terapéutica, por ejemplo, agentes antineoplásicos tales como: Acivicina; aclarubicina; Acodazole Clorhidrato; Acronina; Adozelesina; Adriamicina; Aldesleukina; Altretamina; Ambomicina; A. metantrona Acetato; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozole; Antramicina; Asparaginasa; Asperlina; azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastato; Benzodepa; Bicalutamida; Bisantreno Clorhidrato; Bisnafida Dimesilato; Bizelesina; Bleomicina Sulfato; Brequinar Sodio; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Camptotecina; Caracemida; Carbetimera; Carboplatina; Carmustina; Carubicina Clorhidrato; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; cisplatina; Cladribina; Colchicina; Combretestatina A-4; Crisnatol Mesilato; Ciclofosfamida; Citarabina ; Dacarbazina; DACA (N-[2-(Dimetil-amino)etil]acridina-4-carboxamida); Dactinomicina; Daunorubicina Clorhidrato; Daunomicina; Decitabina; Dexormaplatina; Dezaguanina; Dezaguanina Mesilato; Diaziquona; Docetaxel; Dolasatinas; Doxorubicina; Clorhidrato Doxorubicina; Droloxifeno; Droloxifeno Citrato; Dromostanolona Propionato; Duazomicina;

Edatrexato; Clorhidrato Eflornitina; Elipticina;
 Elsamitrucina; Enloplatina; Enpromato; Epiropidina;
 Clorhidrato Epirubicina; Erbulozole; Clorhidrato
 Esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato Sodio;
 Etanidazole; Aceite Etiodizado I 131; Etoposida; Fosfato
 Etoposida; Etoprina; Clorhidrato Fadrozole; Fazarabina;
 Fenretinida; Floxuridina; Fosfato Fludarabina;
 Fluorouracilo; 5-FdUMP; Flurocitabina; Fosquidona;
 Fostriecina Sodio; Gemcitabina; Clorhidrato Gemcitabina;
 Oro Au 198; Homocamptotecina; Hidroxiurea; Clorhidrato
 Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferona Alfa-2a;
 Interferona Alfa-2b; Interferona Alfa-n1; Interferona
 Alfa-n3; Interferona Beta-I a; Interferona Gamma-I b;
 Iproplatina; Clorhidrato Irinotecan; Lanreotida Acetato;
 Letrozole; Leuprolida Acetato; Clorhidrato Liarozole;
 Lometrexol Sodio; Lomustina; Clorhidrato Losoxantrona;
 Masoprocol; Maitansina; Clorhidrato Mecloretamina;
 Megestrol Acetato; Melengestrol Acetato; Melfalan;
 Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato
 Sodio; Metoprina; Meturedapa; Mitindomida; Mitocarcina;
 Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina;
 Mitospero; Mitotano; Mitoxantrona Clorhidrato; Ácido
 Micofenólico; Nocodazole; Nogalamicina; Ormaplatina;
 Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina;

Pentamustina; PeploicinaSulfato; Perfosfamida;
 Pipobroman; Piposulfan; Clorhidrato Piroxantrona X;
 Plicamicina; Plomestano; Porfímero Sodio; Porfiromicina;
 Prednimustina; Clorhidrato Procarbazina; Puromicina;
 Clorhidrato Puromicina; Pirazofurina; Rizoxina; Rizoxina
 D; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Safingol
 Clorhidrato; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sodio;
 Esparsomicina; Clorhidrato Espirogermanio; Espiromustina;
 Espiroplatina; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro
 de Estroncio Sr 89; Sulofenuro; Talisomicina; Taxano;
 Taxoide; Tecogalan Sodio; Tegafur; Teloxantrona
 Clorhidrato; Temoporfina; Teniposida; Teroxirona;
 Testolactona; Tiocolchicina; Tiamiprina; Tioguanina;
 Tiotepa; Timitaq; Tiazofurina; Tirapazamina; Tomudex;
 TOP53; Clorhidrato Topotecan; Citrato Toremifeno;
 Trestolona Acetato; Fosfato Triciribina; Trimetrexato;
 Trimetrexato Glucuronato; Tryptorelina; Tubulozole
 Clorhidrato; Mostaza Uracilo; Uredipa; Vapreotida;
 Verteporfina; Vinblastina; Sulfato Vinblastina;
 Vincristina; Sulfato Vincristina; Vindesina; Sulfato
 Vindesina; Sulfato Vinepidina; Sulfato Vinglicinato;
 Sulfato Vinleurosina; Vinorelbina Tartrato; Vinrosidina
 Sulfato; Sulfato Vinzolidina; Vorozole; Zeniplatina;
 Zinostatina; Clorhidrato Zorubicina; 2-

114

Clorodeoxiadenosina; 2' Deoxiformicina; 9-aminocamptotecina; Raltitrexed; Ácido N-propargil-5,8-dideazafólico; 2cloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxiadenosina; 2-cloro-2'-deoxiadenosina; anisomicina; Tricostatina A; hPRL-G129R; CEP-751; linomida; mostaza sulfuro; mostaza nitrógeno (meclor etamina); ciclofosfamida; melfalan; clorambucilo; ifosfamida; busulfan; N-Metil-Nnitrosourea (MNU); N,N'-Bis(2-Cloroetil)-N-Nitrosourea (BCNU); N-(2-Cloroetil)-N'-Ciclohexil-N-Nitrosourea (CCNU); N-(2-cloroetil)-N'-(Trans-4-Metilciclohexil-Nnitrosourea (MeCCNU); N-(2-cloroetil)-N'-(dietil) Etilfosfonato-N-Nitrosourea (Fotemustina); Estreptozotocina; diacarbazina (DTIC); mitozolomida; temozolomida; tiotepa; mitomicina C; AZQ; adozelesina; Cisplatina; Carboplatina; Ormaplatina; Oxaliplatina; C1-973; DWA 2114R; JM216; JM335; Bis (platino); tomudex; azacitidina; citarabina; Gemcitabina; 6-Mercaptopurina; 6-Tioguanina; Hipoxantina; teniposida 9-amino camptotecina; Topotecan; CPT-11; Doxorubicina; Daunomicina; Epirubicina; darubicina; mitoxantrona; losoxantrona; Dactinomicina (Actinomicina D); amsacrina; pirazoloacridina; todos los trans aptal; 14-Hidroxi-Retro-Retinol; todos los trans de ácido retinoico; N-(4-Hidroxifenil) retinamida; 13-cis ácido retinoico; 3-Metil



TTNEB; 9-cis ácido retinoico; fludarabina (2-F-ara-AMP);
o 2-clorodeoxiadenosina (2-Cda).

Otros compuestos antineoplásicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, 20-pi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleukina; todos los antagonistas de tirosina quinasa; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido Aminolevulínico; Amrubicina; amsacrina; anagrelida; Anastrozole; andrografolida; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-dorzalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos anti-sentido; afidicolin glicinato; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginino de aminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastato; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactam; beta-aletina; betaclamicina B; inhibidor de factor de crecimiento de fibroblasto básico (BFGF); bicalutamida;

1/6

bisantreno; bisaziridinilspermina; bisnafida; bistrateno
 A; bizelesina; breflato; bleomicina A2; bleomicina B2;
 bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina;
 calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina
 (por ejemplo, 10-hidroxi-camptotecina); canaripox IL-2;
 capecitabina; carboxamida-amino-triazole;
 carboxiamidotriazole; CaRest M3; CARN 700; inhibidor
 derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de
 quinasa caseína (ICOS); castanospermina; cecropina B;
 cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida;
 cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de
 clomifeno; clotrimazole; colismicina A; colismicina B;
 combretastatina A4; análogo de combretastatina;
 conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8;
 derivados de criptoficina A; curacina A;
 ciclopentantraquinones; cicloplatam; cipemicina;
 citarabina ocfosfato; factor citolítico; citostatina;
 dacliximab; Decitabina; dehidrodidemnina B;
 2'deoxicoformicina (DCF); deslorelina; dexifosfamida;
 dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnina B;
 didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina;
 dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina;
 discodermolida; docosanol; dolasetron; doxifluridina;
 droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen;

117

ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina;
 elemeno; emitefur; epirubicina; epotilones (A, R = H; B,
 R = Me); epitilones; epristerida; análogo de
 estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de
 estrógeno; etanidazole; etoposida; etoposida 4'-fosfato
 (etopofos); exemestano; fadrozole; fazarabina;
 fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol;
 flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato
 fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecina;
 fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio;
 galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa;
 gemcitabina; inhibidores de glutatona; hepsulfam;
 heregulina; hexametileno bisacetamida; homoharringtonina
 (HHT); hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina;
 idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastato;
 imidazoacridones; imiquimod; péptidos immunoestimulantes;
 inhibidor receptor 1 de insulina como factor de
 crecimiento; agonistas de interferona; interferonas;
 interleukinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol,
 4-; irinotecan; iroplacto; irsogladina; isobengazole;
 isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida;
 kahalalida F; triacetato lamelarin-N; lanreotida;
 leinamicina; lenograstim; sulfato lentinan;
 leptolstatina; letrozole; factor inhibidor de leucemia;

interferona alfa leucocito; leuprolida + estrógeno +
 progesterona; leuprorelina; levamisole; liarozole;
 análogo de poliamina lineal; péptido disaccarida
 lipofílico; compuestos de platino lipofílico;
 lissoclinamida 7; lobaplatina; lombricina; lometrexol;
 lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina;
 lurtotecan; lutetio texafirina; lisofilina; péptidos
 líticos; maitansina; manostatina A; marimastato;
 masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina;
 inhibidores de metaloproteínasa matrix; menogaril;
 rnerbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida;
 inhibidor MIF; ifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN
 de 'doble hebra no casado; mitracina; mitoguazona;
 mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de
 crecimiento de fibroblasto mitotoxina-saporina;
 mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; gonadotropina
 coriónica de anticuerpo monoclonal humano; pared de
 célula sk miobacterium + lípido monofosforil A;
 mopidamol; inhibidor de gen de resistencia a drogas
 múltiple; terapia basada en supresor de tumor múltiple 1;
 mostaza de agente anti-cancerígeno; micaperoxida B;
 extracto de pared celular microbacterial; miriaporona; N-
 acetildinalina; N-benzamidas sustituidas; nafarelina;
 nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina;

nartograstim; nedaplatina; nemorubicina; ácido
neridrónico; endopeptidasa neutral; nilutamida;
nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitróxido
antioxidante; nitrulina; 06-benzilguanina; octreotida;
oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron;
ondansetron; oracina; inductor de citoquina oral;
ormaplatina; osaterona; oxaliplatina; oxaunomicina;
análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel;
palauamina; palmitoilrhizoxina; ácido pamidrónico;
panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina;
pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato sodio;
pentostatina; pentrozole; perflubron; perfosfamida;
alcohol perililo; fenazinomina; fenilacetato;
inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de
pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A;
placetina B; inhibidor activador plasminógeno; complejo
de platino; compuestos de platino; complejo de platino-
triamina; podofilotoxina; porfímero sodio; porfiromicina;
propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de
proteasome; modulador inmune basado en proteína A;
inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína
quinasa C, microalgal; inhibidores de proteína tirosina
fosfatasa; inhibidores de purina nucleosida fosforilasa;
purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilatado de

hemoglobina polioxietileno; antagonistas raf;
raltitrexedo; ramosetron; inhibidores de transferasa de
proteína farnesil ras; inhibidores ras; inhibidor ras-
GAP; reteliptina demetilada; etidronato de renio Re
186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida;
rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1;
ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A;
sargramostim; miméticos Sdi 1; semustina; inhibidor
derivado de senescencia 1; oligonucleótidos de sentido;
inhibidores de transducción de señal; moduladores de
transducción de señal; proteína de enlace de antígeno de
cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de
sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de
enlace somatomedina; sonermina; ácido esparfósico;
espícamicina D; espiromustina; esplenopentina;
espongistatina 1; esqualamina; inhibidor celular stem;
inhibidores de división celular stem; estipiámina;
inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de
péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista;
suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos;
talimustina; tamoxifen metiodida; tauromustina;
tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilio;
inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida;
teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina;

121

taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoietina; trombopoietina mimética; timalfasina; agonista receptor de timopoietina; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; etiopurpurina etil estaño; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topotecan; topsentina; toremifene; factor celular stem totipotente; inhibidores de translación; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de quinasa tirosina; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibitorio de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas receptores de uroquinasa; vaporeotida; variolina B; sistema de vector, terapia de genes eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozole; zanoterona; zeniplatina; zilascorb; y zinostatina estimalamero.

X también puede ser un agente anti-proliferativo, por ejemplo piritrexima isotionato. Alternativamente, X puede ser un agente hipertrofia anti-prostático tal como, por ejemplo, sitoglusida, un agente de terapia de hiperplasia prostática benigna tal como, por ejemplo, clorhidrato de tamsulosina, un inhibidor de crecimiento de próstata tal como, por ejemplo, pentomona.

X también puede ser un agente radioactivo, que incluye, pero no está limitado a: Fibrinogen ^{125}I ; Fludeoxiglucosa ^{18}F ; Fluorodopa ^{18}F ; Insulina ^{125}I ; Insulina ^{131}I ; Lobenguane ^{123}I ; Iodipamida Sodio ^{131}I ; Iodoantipirina ^{131}I ; Iodocolesterol ^{131}I ; Iodohipurato Sodio ^{123}I ; Iodohipurato Sodio ^{125}I ; Iodohipurato Sodio ^{131}I ; Iodopiraceto ^{125}I ; Iodopiraceto ^{131}I ; Iofetamina Clorhidrato ^{123}I ; Iometina ^{125}I ; Iometina ^{131}I ; Iotalamato Sodio ^{125}I ; Iotalamato Sodio ^{131}I ; Tirosina ^{131}I ; Liotironina ^{125}I ; Liotironina ^{131}I ; Merisoprol Acetato ^{197}Hg ; Merisoprol Acetato ^{203}Hg ; Merisoprol ^{197}Hg ; Selenometionina ^{75}Se ; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Antimonio Trisulfida Coloide; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Bicisato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Disofenina; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Etidronato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Exametazima; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Furifosmina; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Gluceptato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Lidofenina; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Mebrofenina; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Medronato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Medronato Disodio; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Mertiatida; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Oxidronato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Pentetato; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Pentetato Calcio Trisodio; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Sestamibi; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Siboroxima; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$; Succimero; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Sulfuro Coloide; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Teboroxima; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Tetrafosmina; Tecnetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Tiatida; Tiroxina ^{125}I ; Tiroxina ^{131}I ; Tolpovidona ^{131}I ; Trioleina ^{125}I ; o Trioleina ^{131}I .

Otros agentes terapéuticos o citotóxicos adecuados utilizados en el conjugado de la invención incluye, por ejemplo, Agentes Potenciadores Suplementarios anti-cáncer, que incluyen, pero no están limitados a: drogas anti-depresivas tricíclicas (por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); drogas antidepresivas no tricíclicas (por ejemplo, sertralina, trazodona y citalopram); antagonistas Ca^{++} (por ejemplo, verapamilo, nifedipina, nitrendipina y caroverina); inhibidores de Calmodulina (por ejemplo, prenilamina, trifluoroperazina y clomipramina); Anfotericina B; análogos de Triparanol (por ejemplo, tamoxifeno); drogas antiaritmicas (por ejemplo, quinidina); drogas antihipertensivas (por ejemplo, reserpina); vaciadores de Tiol (por ejemplo, butionina y sulfoximina) y agentes reductores de Resistencia de Droga Múltiple tales como Cremafor EL.

Los conjugados de la invención también se pueden administrar con citoquinas tales como factor estimulante

de colonia de granulocito. Los agentes anti-cancerígenos preferidos utilizados en cócteles anti-cáncer (por ejemplo, en combinación con agentes de la invención) incluyen (algunos con sus MTD mostrados en paréntesis); gemcitabina (1000 mg/m²); metotrexato (15 gm/m² i.v.+ leuco. <500 mg/m² i.v. w/o leuco); 5-FU (500 mg/m²/día x 5 días); FUDR (100 mg/kg x 5 en ratones, 0.6 mg/kg/día en humanos i.a.); FdUMP; Hidroxiúrea (35 mg/kg/d en hombres); Docetaxel (60-100 mg/m²); discodermolide; epotilonas; vincristina (1,4 mg/m²); vinblastina (escalando: 3,3-11,1 mg/m², o raramente a 18,5 mg/m²); vinorelbina (30 mg/m²/semana); meta-pac; irinotecan (50-150 mg/m², 1 x/semana dependiendo de la respuesta del paciente); SN-38 (-100 veces más potente que el Irinotecan); 10-OH campto; topotecan (1,5 mg/m²/día en humanos, 1 x iv LdlO mice=75 mg/m²); etoposida (100 mg/m² en hombres); adriamicina; flavopiridol; Cis-Pt (100 mg/m² en hombres); carbo-Pt (360 mg/m² en hombres); bleomicina (20 mg/m²); mitomicina C (20 mg/m²); mitramicina (30 sug/kg); capecitabina (2,5 g/m² oralmente); citarabina (100 mg/m²/día); 2-Cl-2'-deoxiadenosina; Fludarabina-P04 (25 mg/m²/día, x 5 días); mitoxantrona (12-14 mg/m²); mitozolomida (>400 mg/m²); Pentostatina; y Tomudex.

X puede preferiblemente ser un agente anti-metabólico, tal como metotrexato. Los anti-metabolitos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes compuestos y sus derivados: azatioprina, cladribina, citarabina, dacarbazina, fludarabina fosfato, fluorouracilo, gencitabina clorhidrato, mercaptopurina, metotrexato, mitobronitol, mitotano, clorhidrato de proguanilo, pirimetamina, raltitrexado, trimetrexato glucuronato, uretano, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, etc. Más preferiblemente X puede ser un anti-metabolito tipo ácido fólico, una clase de agentes que incluye, por ejemplo, metotrexato, clorhidrato de proguanilo, pirimetamina, trimetoprima, o trimetrexato glucuronato, o derivados de estos compuestos.

En otra modalidad, X también puede ser un miembro de la familia antraciclina de agentes neoplásicos, que incluyen pero no están limitados a aclarubicina clorhidrato, daunorubicina clorhidrato, doxorubicina clorhidrato, epirubicina clorhidrato, idarubicina clorhidrato, pirarubicina, o zorubicina clorhidrato. Adicionalmente, X puede ser una camptotecina, o sus derivados compuestos relacionados tales como 10,11 metilenodioxycamptotecina. X también puede ser seleccionada de una familia

maitansinoide de compuestos, que incluye una variedad de compuestos estructuralmente relacionados. Por ejemplo, ansamitocina P3, maitansina, 2'-N-demetilmaitanbutina, o maitanbiciclinol son maitansinoides.

Y es una secuencia espaciadora hidrofílica que puede ser, preferiblemente, un péptido que incremente la biodistribución del conjugado, o un polímero hidrofílico. Por ejemplo, Y puede ser una secuencia de péptido que incremente la biodistribución hidrofílica del conjugado de péptido biológicamente activo. En una modalidad preferida, Y tiene la fórmula $U(V-V)_n$, en donde U es D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosina, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, o $(NH_2-(CH_2)_m-COOH)$, donde m=2-10, inclusive, o está suprimido; cada vez independientemente seleccionado del grupo que consiste de: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, o L-4 hidroxipro; y n=1-50, inclusive. En otra modalidad preferida, cada V es independientemente D-Ser o L-Ser. En otra modalidad preferida, al menos un V es un aminoácido D-.

Luego de estas enseñanzas, Y se puede seleccionar para facilitar la biodistribución del conjugado de la

invención. Y puede ser un péptido o un polímero tal como PEG o PVA. Si Y es un péptido hidrofílico, Y puede preferiblemente tener 1 a 50 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente 3 a 15 residuos de longitud. Por ejemplo, Y puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aminoácido de longitud. Cuando es un péptido, Y puede contener aminoácidos cargados o no polares, sus análogos o derivados que sean de ocurrencia natural sintética o modificada.

Y también puede ser un polímero hidrofílico. Por ejemplo, Y puede ser polietilen glicol (PEG), polivinil acetato, polivinil alcohol (PVA), N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) o copolímeros de HPMA, α,β -poli (N-hidroxietil)-DL-aspartamida (PHEA), o α,β -poli (N-hidroxipropil)-DL-aspartamida. Los grupos PEG, PHEA, y PVA utilizados en conjugados de la invención también son conocidos por ser excelentes promotores de rápida secreción renal que está correlacionada generalmente con toxicidades de droga potencialmente inferiores (ver, por ejemplo, Yamoaka et al., J. Pharmacol. Sci., 83: 601-606, 1994; Rypacek et al., Pflugers Arch., 392: 211-217, 1982;

Yamoaka et al., J. Pharm. Pharmacol., 47: 479-486, 1995). Estos grupos también pueden promover la toxicidad disminuida que emana de los conjugados biodisponibles, no internalizados.

Z es un péptido ligante que preserva al menos 50% de la actividad biológica de Q, cuando Z está unido a Q a través de el grupo amino terminal o cadena lateral de Q. Generalmente, Z puede ser un péptido de 2, 3, 4, o 5 residuos. Z tiene la fórmula: A-B-C-E-F, en donde A es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, o L-Ser, o está suprimido; B es D-Lys, D-Tyr, o está suprimido; C es Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, o 4) 3-piridilo-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, o está suprimido; E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; con la condición de que cuando A, B, C, y E son Tyr, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Lys; y cuando A, B, C, y E,

son Lys, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys; y cuando A y B están suprimidos, y C y E son Lys y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys.

En otras modalidades, Z tiene la fórmula (cuando A, B, y C están suprimidas): E-F donde E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln.

En modalidades preferidas, Z es un D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 1), D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 2), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr (ID de Sec. No.: 3), D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 4), D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 5), D-Ser-Ser-D-Lys-Ser (ID de Sec. No.: 5), D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 6), D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 7), D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 8), Lys-D-Ser-D-Ser (ID de Sec. No.: 9), Ser-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 10), Ser-

D-Lys-Ser (ID de Sec. No.: 10), Nle-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 11), Lys-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 12), Pal-D-Lys-D-Ser (ID de Sec. No.: 13), Thr-D-Tyr-D-Ser (ID de Sec. No.: 14), D-Ser-D-Lys, D-Ser-D-Tyr, D-Lys-D-Lys, D-Lys-D-Tyr, o D-Tyr-D-Lys.

Q es una porción blanco, tal como un péptido biológicamente activo. El polipéptido de proteína no inmunoreactiva o ligandos de péptido que se pueden utilizar para formar los conjugados de esta invención incluyen, pero no están limitados a, transferían, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido de liberación de gastrina, facto de crecimiento derivado de plaqueta, IL-2, IL-6, factores de crecimiento de tumor ("TGF"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina o factores de crecimiento similares a insulina I y II. Ligandos no peptidilos pueden incluir, por ejemplo, esteroides, carbohidratos, vitaminas y lectinas.

En las modalidades preferidas, Q es un péptido, tal como somatostatina, un análogo de somatostatina, bombesina, un análogo de bombesina, o un anticuerpo, tal como un

anticuerpo monoclonal. El péptido biológicamente activo preferido o las porciones blanco son internalizadas mediante células seleccionadas por vía de un proceso de internalización activo, tal como cuando se une a un receptor acoplado con proteína G o a receptores tipo 2 de somatostatina (SSTR2).

Los conjugados de la invención inhiben la acumulación de péptidos tóxicos en tejidos a través de la inclusión del grupo Z (o péptido ligador (es decir, extensión terminal de péptido)), que contiene residuos hidrofílicos, y la inclusión opcional de una secuencia espaciadora hidrofílica. Estos componentes promueven la rápida eliminación de los péptidos no unidos intactos a través de los riñones.

Los conjugados de la invención están diseñados para preservar la potencia biológica completa de los péptidos biológicamente activos cuando son conjugados a un agente citotóxico. Un análogo de péptido de la invención tiene una potencia biológica que es preferiblemente mayor que o igual al análogo de péptido padre del cual se deriva, con una especificidad que es mayor, menor, o equivalente a la especificidad blanco del péptido padre. Por ejemplo, un

análogo de somatostatina puede unirse a más subtipos de receptor de somatostatina que la somatostatina de ocurrencia natural, o se puede unir a un subtipo receptor particular. Algunos análogos de la invención contienen D-isómeros de aminoácidos, de análogos de éste, que facilitan el acoplamiento estable de agentes citotóxicos aunque reteniendo una alta afinidad de receptor y potencia biológica del análogo de péptido.

Los conjugados citotóxicos o terapéuticos de la invención pueden emplear cualquiera de un gran número de análogos conocidos de somatostatina que reconocen el receptor de somatostatina, tales como aquellos descritos anteriormente. Preferiblemente, la porción análoga de somatostatina del conjugado contiene entre 10 y 18 aminoácidos, e incluye una secuencia núcleo: ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys] (ID de Sec. No.: 37 y ID de Sec. No.: 38). Preferiblemente, el terminal C del análogo es: Thr-NH₂. Los análogos de bombesina, como se describen aquí, también se pueden conjugar a agentes citotóxicos o terapéuticos en los agentes péptidos de la invención.

El blanco específico de los agentes terapéuticos o citotóxicos permite la destrucción selectiva de un tumor

que expresa un receptor específico para un péptido biológicamente activo. Por ejemplo, un tumor que expresa un receptor de somatostatina incluye un neoplasma del pulmón, mama, próstata, colon, cerebro, tracto gastrointestinal, eje neuroendocrino, hígado, riñon, etc. Ver Schaer et al., Int. J. Cancer, 70: 530-537, 1997; Chave et al., Br. J. Cancer 82(1):124-130, 2000; Evans et al., Br. J. Cancer 75(6): 798-803, 1997).

Los péptidos para uso en conjugados de la invención incluyen péptidos KiSS y análogos, péptidos de urotensina II y análogos, péptidos y análogos de Ngr. I y II, octreotide, depreotide, vapreotide, péptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistoquinina (CCK), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), péptidos que contienen RGD, péptido de hormona estimulante de melanocito (MSH), neurotensina, calcitonina, péptidos de regiones que determinan complementariedad de un anticuerpo anti-tumoral, glutathione, YIGSR (péptidos ávidos de leucocito, por ejemplo, P483H, que contiene la región de unión de heparina del factor-4 de plaqueta (PF-4) y una secuencia rica en lisina), péptido natriurético atrial (ANP), péptidos β -amiloides, antagonistas delta-

opioide (tal como ITIPP (psi)), anexin-V, endotelina, interleuking (IL)-1, IL-1ra, IL-2, y IL-8, leukotriena B₄ (LTB₄), péptidos quimiotácticos (por ejemplo, N-formil-metionil-leucil-fenilalanina-lisina (fMLFK)), antagonistas receptores de GP IIb/IIIa (por ejemplo, DMP444), factor de crecimiento epidérmico, inhibidor de elastasa neutrófilo humano (por ejemplo, EPI-HNE-2 y EPI-HNE-4), inhibidor de plasmita, péptidos antimicrobiales, apticida (por ejemplo, P280 y P274), receptor de trombospondina (que incluye análogos tales como TP-1300), bitistatina, receptor tipo I de adenilil ciclase de pituitaria (PAC1), α -cadena de fibrina, péptidos derivados de una librería de despliegue de fago, y sustituciones conservadoras de estos, que son objetivos a una célula o tejido en el cuerpo de un mamífero (por ejemplo, tejido enfermo, tal como un tumor o un vaso sanguíneo angiogénico proliferativo; ver, por ejemplo, Aina et al., Biopolymers 66: 184-199, 2002), y derivados y análogos de éstos. Ver, por ejemplo Signore et al., Eur. J. Nucl. Med. 28(10): 1555-65, 2001.

Los análogos de péptido de somatostatina citotóxicos también pueden ser específicos para vasculaturas

tumorales, o vasos sanguíneos angiogénicos, tales como aquellos que sobre expresan receptores de somatostatina (ver Denzler y Reubi, Cancer 85: 188-198, 1999; Gulec et al., J. Surg. Res. 97(2): 131-137, 2001; Woltering et al., J. Surg. Res. 50: 245, 1991). Adicionalmente, en razón a que los análogos de somatostatina preferidos de la invención son variadamente hidrofílicos, ellos son solubles en agua, así, tienen uso mejorado comparado con los análogos hidrofobos previos. Los análogos hidrofílicos descritos aquí son solubles en sangre, fluido cerebro espinal, y otros fluidos corporales, así como también orina, facilitando la excreción de los riñones. Este carácter hidrofílico facilita el suministro de los análogos de la invención a casi cada área del cuerpo. La invención también describe elementos hidrofílicos específicos para la incorporación en los análogos de péptido, permitiendo la modulación de la hidrofiliidad de los análogos para ajustar a la naturaleza química y estructural de los varios agentes citotóxicos conjugados.

Los análogos agonistas de somatostatina son rápidamente internalizados después de unirse a sus receptores (ver, por ejemplo, Lukiniuis et al., Acta Onc., 38:383-387,

1999) y pueden así ser utilizados como vectores para apuntar a varios agentes terapéuticos -tales como los agentes citotóxicos tumorales tradicionales. Es posible que la especificidad de tales agentes anti-tumorales pueda ser drásticamente mejorada en razón a que muchos tipos de tumor sobre expresan fuertemente receptores tipo 2 de somatostatina. De esta manera, nosotros proponemos que los efectos colaterales tóxicos asociados con todos los agentes citotóxicos conjugables puedan ser útilmente disminuidos en tanto una molécula híbrida potente se pueda diseñar para que retenga muy alta afinidad para los receptores de somatostatina.

Los ligandos inmunoreactivos para uso como una porción blanco en la invención incluyen una inmunoglobulina que reconoce antígeno (también denominada como "anticuerpo"), o un fragmento que reconoce antígeno de ésta. Las inmunoglobulinas particularmente preferidas son aquellas que pueden reconocer un antígeno asociado a tumor. Como se utiliza aquí, "inmunoglobulina" se refiere a cualquier clase reconocida o subclase de inmunoglobulina tales como IgG, IgA, IgM, IgD, o IgE. Preferidas son aquellas inmunoglobulinas que caen dentro de la clase IgG de inmunoglobulinas. La inmunoglobulina se puede derivar de

cualquier especie. Preferiblemente, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, de murino, o de conejo. Además, la inmunoglobulina puede ser policlonal o monoclonal, pero es preferiblemente monoclonal.

Los conjugados de la invención pueden incluir un fragmento de inmunoglobulina que reconoce antígeno. Tales fragmentos de inmunoglobulina pueden incluir, por ejemplo, el Fab', F(ab')₂, F_v o fragmentos Fab, u otros fragmentos de inmunoglobulina que reconocen antígeno. Tales fragmento de inmunoglobulina se pueden preparar, por ejemplo, mediante digestión proteolítica de enzima, por ejemplo, por digestión de pepsina o papaina, alquilación reductiva, o técnicas recombinantes. Los materiales y métodos para preparar tales fragmentos de inmunoglobulina son bien conocidos por aquellos expertos en el arte. Ver Parham, J. Immunology, 131, 2895, 1983; Lamoyi et al., J. Immunological Methods, 56, 235, 1983.

La inmunoglobulina usada en los conjugados de la invención puede ser un "anticuerpo quimérico" como aquel término es reconocido en el arte. También, la inmunoglobulina puede ser un anticuerpo "bifuncional" o "híbrido", esto es, un anticuerpo que puede tener un

brazo que tiene una especificidad para un sitio antigénico, tal como un antígeno asociado a tumor aunque el otro brazo reconoce un blanco diferente, por ejemplo, un hapteno que es, o al cual está unido, un agente letal a la célula de tumor que lleva antígeno. Alternativamente, el anticuerpo bifuncional puede ser uno en el cual cada brazo tiene especificidad para un epitopo diferente de un antígeno asociado a tumor de la célula a ser terapéutica o biológicamente modificada. Los anticuerpos híbridos tienen así una especificidad dual, preferiblemente con uno o más sitios de unión específicos para el hapteno de escogencia o uno o más sitios de unión específicos para un antígeno blanco, por ejemplo, un antígeno asociado con un tumor, un organismo infeccioso, u otro estado de enfermedad.

Los anticuerpos bifuncionales biológicos son descritos, por ejemplo, en la publicación de Patente Europea, EPA 0 105 360, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Tales anticuerpos híbridos o bifuncionales se pueden derivar biológicamente, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, tal como con agentes reticulantes o reactivos formadores de puente disulfuro, y pueden estar comprendidos de anticuerpos completos y/o

fragmentos de estos. Los métodos para obtener tales anticuerpos híbridos son descritos, por ejemplo, en la solicitud PCT WO83/03679, publicada en Octubre 27, 1983, y la Solicitud Europea publicada EPA 0 217 577, publicada en Abril 8, 1987, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos bifuncionales particularmente preferidos son aquellos biológicamente preparados de un "polidoma" o "cuadroma" o que son sintéticamente preparados con agentes reticulantes tales como bis-(maleimido)-metil eter("BMME"), o con otros agentes reticulantes familiares para aquellos expertos en la técnica.

Además, la inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de cadena simple ("SCA"). Un SCA puede consistir de fragmentos Fv de cadena simple ("scFv") en los cuales los dominios de la variable ligera ("V_L") y la variable pesada ("V_H") están ligados a un puente de péptido o a una unión disulfuro. También, la inmunoglobulina puede consistir de dominios V_H sencillo (dAbs) que poseen actividad unida a antígeno. Ver G. Winter y C. Milstein, Nature 349: 295, 1991; R. Glockshuber et al., Biochemistry 29: 1362, 1990; y, E.S. Ward et al., Nature 341: 544, 1989.

Especialmente preferidos para uso de la presente invención son los anticuerpos monoclonales quiméricos; preferiblemente aquellos anticuerpos quiméricos que tienen especificidad hacia un antígeno asociado a tumor. Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, de una fuente de especies y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente diferente de especies, usualmente preparada mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que tienen una región variable de murino y una región constante humana son especialmente preferidos en ciertas aplicaciones de la invención, particularmente en terapia humana, en razón a que tales anticuerpos son fácilmente preparados y pueden ser menos inmunogénicos que los anticuerpos monoclonales puramente murinos. Tales anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina de murino y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de anticuerpos quiméricos para uso en conjugados de la

invención son aquellas en las cuales la clase o subclase se ha modificado o cambiado de aquella del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" también son denominados como "anticuerpos conmutados de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos involucran técnicas de transferencia de ADN y de gen recombinantes convencionales ahora bien conocidas en el arte. Ver Morrison, S. L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 81: 6851. 1984.

El término "anticuerpo quimérico" también incluye un "anticuerpo humanizado", a saber, aquellos anticuerpos en los cuales una estructura o "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR") se han modificado para incluir el CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad, comparada con aquella de la inmunoglobulina padre. En una modalidad preferida, un CDR de murino es injertado en una región de estructura de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, L. Riechmann et al., Nature 332: 323, 1998; M.S. Neuberger et al., Nature 314: 268, 1985. Los CDR particularmente preferidos corresponden a aquellos que representan secuencias que reconocen los antígenos anotados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y

bifuncionales. Ver, por ejemplo, EPA 0 239 400 (publicada en Sep. 30, 1987), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Un experto en la técnica reconocerá que un anticuerpo quimérico bifuncional se puede preparar el cual tendría los beneficios de inmunogenicidad inferior del anticuerpo quimérico o humanizado, así como también la flexibilidad, especialmente para el tratamiento terapéutico, de los anticuerpos bifuncionales descritos anteriormente. Tales anticuerpos quiméricos bifuncionales pueden ser sintetizados, por ejemplo, mediante síntesis química utilizando agentes reticulantes y/o métodos recombinantes del tipo descrito anteriormente. La presente invención no debe ser considerada como limitada en alcance por ningún método en particular de producción de un anticuerpo sea bifuncional, quimérico, bifuncional-quimérico, humanizado, o un fragmento que reconoce antígeno o derivados de estos.

Los conjugados de la invención también pueden incluir inmunoglobulinas (como se definió anteriormente) o fragmentos de inmunoglobulina a los cuales están fusionadas las proteínas activas, por ejemplo, una enzima

del tipo descrita en Neuberger, et el., solicitud PCT WO86/01533, publicada en Marzo 13, 1986, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Como se utiliza aquí, las construcciones de anticuerpo "bifuncional", "fusionado", "quimérico" (incluyendo humanizado), y "quimérico-bifuncional" (que incluye humanizado) también incluyen, dentro de sus contextos individuales, construcciones que incluyen fragmentos que reconocen antígeno. Como un experto en la técnica reconocerá, tales fragmentos se pueden preparar mediante clivaje enzimático tradicional o anticuerpos bifuncionales, quiméricos, humanizados, o bifuncionale-quiméricos. En el evento de que anticuerpos intactos no sean susceptibles a tal clivaje, por ejemplo, en razón de la naturaleza de la construcción involucrada, las construcciones anotadas se pueden preparar con fragmentos de inmunoglobulina utilizadas como materiales de partida; o, si son utilizadas técnicas recombinantes, las secuencias de ADN en sí mismas pueden ser ajustadas para codificar el "fragmento" deseado el cual, cuando se expresa, se puede combinar *in vivo* o *in vitro*, mediante medios químicos o biológicos, para preparar el "fragmento" de inmunoglobulina intacto deseado final. Es

en este contexto que el término "fragmento" se utiliza aquí.

La inmunoglobulina (anticuerpo), o fragmento de ésta, utilizado en los conjugados de la presente invención puede ser de naturaleza policlonal o monoclonal. Los anticuerpos monoclonales son las inmunoglobulinas preferidas. La preparación de los anticuerpos policlonales o monoclonales es bien conocida por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, G. Kohler y C. Milstein, Nature 256: 495, 1975. Además, los hibridomas y/o los anticuerpos monoclonales que son producidos mediante tales hibridomas y que son útiles en la práctica de la presente invención están públicamente disponibles.

En una modalidad adicional, la invención caracteriza un método para el tratamiento de una enfermedad o modificación de una función biológica. El método incluye administrar a un animal de sangre caliente necesitado de éste, una cantidad terapéuticamente efectiva o que modifica la función biológica de un conjugado de la invención. Un experto en la técnica reconocerá que el conjugado particular utilizado dependerá del estado de la enfermedad a ser tratada o del sistema biológico a ser

modificado. En particular, un experto en la técnica será capaz de seleccionar una porción blanco particular y un agente citotóxico o terapéutico para preparar un conjugado de la invención que tenga especificidad para el tratamiento de la enfermedad o sea capaz de modificar la función biológica deseada. Se prevee que varias enfermedades son tratables utilizando los conjugados de la invención, incluyendo, por ejemplo, tumores del pulmón, seno, cerebro, ojo, próstata o colon; tumores de origen neuroendocrino (por ejemplo, síndrome carcinoide); y vasos sanguíneos angiogénicos proliferativos (en por ejemplo el ojo), tales como aquellos asociados con tumores, degeneración macular retinal, o retinopatía diabética.

Los conjugados de la invención se pueden administrar a un sujeto mamífero, tal como un humano, directamente o en combinación con cualquier portador farmacéuticamente aceptable o sal conocida en el arte. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales de adición ácida no tóxicas o complejos de metal que son comúnmente utilizadas en la industria farmacéutica. Ejemplos de sales de adición ácida incluyen ácidos orgánicos tales como ácido acético, láctico, pamoico,

maleico, cítrico, málico, ascorbico, succínico, benzoico, palmítico, subérico, salisílico, tartárico, metanosulfónico, toluenosulfónico, o trifluoroacético o similares, ácidos poliméricos tales como ácido tánico, carboximetil celulosa, o similares; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, o similares. Los complejos de metal incluyen zinc, hierro, y similares. Una portadora farmacéuticamente aceptable de ejemplo es una solución salina fisiológica. Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones son conocidas por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Las formulaciones farmacéuticas de una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la invención, o la sal farmacéuticamente aceptable de ésta, se puede administrar oralmente, parenteralmente, (por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, u ocular, inhalación, intradermalmente, gotas ópticas, o implantes), nasalmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o

147

tópicamente, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable adaptado para la ruta de administración.

Los métodos de bien conocidos en el arte para la elaboración de formulaciones se encuentra, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA. Las composiciones pretendidas para uso oral se pueden preparar en formas líquidas y sólidas de acuerdo a cualquier método conocido en el arte para la elaboración de composiciones farmacéuticas. Las composiciones pueden opcionalmente contener endulzantes, saborizantes, colorantes, perfumantes, y/o agentes preservantes con el fin de suministrar una preparación más masticable. Las formas de dosis sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, gránulos. En tales formas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un portador de excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos pueden incluir, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, sucrosa, almidón, fosfato de calcio, fosfato de sodio, o caolina. Los agentes de unión, agentes amortiguantes, y/o agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio) también se pueden

148

utilizar. Las tabletas y las píldoras pueden ser adicionalmente preparadas con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosis líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, melasas y cápsulas de gelatina farmacéuticamente aceptables. Estas formas contienen diluyentes comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua o medio de aceite. Además de tales diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes, y agentes de suspensión.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles, suspensiones, o emulsiones. Ejemplo de vehículos adecuados incluyen propilen glicol, polietilen glicol, aceites vegetales, gelatina, nafalenos hidrogenados, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. Tales formulaciones también pueden contener adyuvantes, tales como preservantes, humectantes, emulsificantes, y agentes dispersantes. El polímero de lacturo biodegradable, biocompatible, el copolímero de lacturo/glicolido, o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno se pueden

utilizar para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de suministro parenteral potencialmente útiles para los polipéptidos de la invención incluyen partículas de copolímero de etileno-vinil acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas.

Las formulaciones líquidas pueden ser esterilizadas mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro que retiene bacterias, al incorporar agentes esterilizantes en la composiciones, o mediante la irradiación o calentamiento de las composiciones. Alternativamente, las formulaciones se pueden elaborar en la forma de composiciones estériles, sólidas que se pueden disolver en agua estéril o algunos otros medios inyectables estériles inmediatamente antes de uso.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de sustancias activas, excipientes tales como manteca de cacao o una cera de supositorio. Las composiciones para administración nasal o sublingual también se preparan con excipientes estándar conocidos en la técnica. Las formulaciones para inhalación pueden

contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril eter, glicocolato y deoxicolato, o pueden ser soluciones aceitosas para administración en la forma de gotas nasales o rocío, o como un gel.

La cantidad de ingrediente activo en las composiciones de la invención puede ser variada. Un experto en la técnica apreciará que las dosis individuales exactas pueden ser ajustadas un poco dependiendo de una variedad de factores, incluyendo el polipéptido que es administrado, el tiempo de administración, la ruta de administración, la naturaleza de la formulación, el índice de excreción, la naturaleza de la condición del sujeto, y la edad, peso, salud, y género del paciente. Además, la severidad de la condición blanco del péptido biológicamente activo tal como somatostatina o bombesina también tendrá un impacto en el nivel de dosis. Generalmente, los niveles de dosis de entre 0,1 µg/kg a 100 mg/kg de peso del cuerpo son administrados diariamente como una dosis sencilla o dividida en dosis múltiples. Preferiblemente, el rango de dosis general está entre 250 µg/kg a 5,0 mg/kg de peso de cuerpo por día. Amplias variaciones de

la dosis necesaria deben ser esperadas en vista de las diferentes eficiencias de las varias rutas de administración. Por ejemplo, la administración oral generalmente se esperaría que requiriera unos mayores niveles de dosis que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosis se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas estándar para optimización que son bien conocidas en la técnica. En general, la dosis terapéuticamente efectiva precisa se determinará por el médico de atención en consideración a los factores anteriormente identificados.

Los conjugados de la invención pueden administrarse en forma de una composición de liberación continuada, tal como los descritos en, por ejemplo, la patente norteamericana Nos. 5.672.659 y 5.595.760. El uso de composiciones de liberación continuada o inmediata depende del tipo de condición que esté siendo tratada. Si la condición se refiere a un desorden agudo o sobre agudo, un tratamiento con una forma de liberación inmediata se preferirá a una composición de liberación continuada. Alternativamente, para tratamientos prolongados o preventivos, generalmente se preferirán las composiciones de liberación continuada.

Los polipéptidos usados en la presente invención pueden prepararse en cualquier forma que sea apropiada. Los polipéptidos pueden aislarse a partir de sus fuentes naturales, pueden ser producidos en forma recombinante, o en forma sintética, o pueden ser producidos por combinación de estos métodos. La síntesis de péptidos pequeños es bien conocida en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Stewart et al., Solid Phase Peptide Síntesis (Pierce Chemical Co., segunda edición, 1984). Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos estándar de síntesis de péptidos conocidos en el estado de la técnica.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención. Estos no están encaminados a limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Preparación del cloroformato de camptotecina

Se suspendieron camptotecina (250 mg) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 50 mg) en 3 mL de piridina

anhidra y 50 mL de cloruro de metileno anhidro. Se añadió Fosgeno (750 µL de una solución al 20% en tolueno) a la suspensión y se mezcló durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de fosgeno y de cloruro de metileno se evaporaron en una cabina extractora de humos, y el cloroformato de camptotecina se disolvió en DCM.

EJEMPLO 2

Preparación de Resina de Camptotecin-carbonil-N-aminoetil-glicina-D-tert-butyl-Ser-Nle-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amida (SEQ ID No.16).

Se añadió resina de Rink amida [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido-norleucyl-metilbenzhydrylamina (0,063 mmol), malla 100-200 (Novabiochem, San Diego, CA) al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en dimetilformamida (DMF) aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló (2 minutos). La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y

157

se mezcló (20 minutos) para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Thr(tBut) (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada durante 1 hora, seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-L-treonina, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lisina, N^α-Fmoc-N¹ⁿ-Boc-D-triptófano, Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-D-serina, Fmoc-O-t-butil-D-tirosina, N^α-Fmoc-Norleucina, Fmoc-O-t-butil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptídica (3 eq), se añadió N-Boc-etilendiamina en N-metil- α -pirrolidinona (NMP) y se mezcló (2 horas) y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el

155

cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 3

Preparación de camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amida (SEQ ID No.:17)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 2 (0,063 mmol) fue colocada en un balón fondo redondo al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas) y se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL). Se añadió gota a gota una solución concentrada de yodo en metanol con agitación vigorosa hasta que se formó una coloración permanente de color café después de

lo cual se removió el exceso de yodo por adición de una pequeña cantidad de ácido ascórbico.

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como fueron identificadas por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 4

Preparación de cloroformato de paclitaxel

El paclitaxel (0,6 mmol) se disolvió en 30 mL de DCM anhidro en un balón de fondo redondo (RB por sus siglas en inglés) de 100 mL. A esta solución se le añadió diisopropiletilamina (DIEA; 3 mmol) disuelta en 20 mL de DCM anhidro por encima de 20 minutos a 0°C bajo atmósfera seca de nitrógeno. Se añadió fosgeno (3 mmol) a la suspensión y se mezcló durante 30 minutos a 0°C y por 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de fosgeno y de cloruro de metileno fueron evaporados y el cloroformato de paclitaxel se disolvió en cloruro de metileno.

EJEMPLO 5

Preparación de Resina de Paclitaxel-carbonil-N-(2-hidroxietil)-glicina-D-tritol-Ser-Norleucina-D-tritol-Tyr-D-tritol-Ser-S-tritol-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-mtt-Lys-tritol-Thr-S-tritol-Cys-tritol-Thr-Amino-xanten-MBHA (SEQ ID No.: 16)

Se añadió la resina de poliestireno FMOC-Amino-Xanten-MBHA(Clorhidrato de 4-Metilbenzhidrilamina) (0,063 mmol) [Bachem, catálogo # D-2040, Lote # 0541173] al vaso de reacción del sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Thr(tritil) (0,188 mmol), diisopropilcarbodi-imina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguida por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la

cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-tritil-L-treonina, N^α-Fmoc-N^ε-mtt-L-lisina, N^α-Fmoc-D-triptófano, Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-tritil-D-serina, Fmoc-O-tritil-D-tirosina, N^α-Fmoc-Norleucina, Fmoc-O-tritil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptidílica, se añadió etanolamina (3 eq) en NMP y se mezcló durante 2 horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el cloroformato de paclitaxel del EJEMPLO 4 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 6

Preparación de Paclitaxel-carbonil-N-(2-hidroxietil)-glicina-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amida (SEQ ID No.: 17)

La resina del péptido paclitaxel preparada en el EJEMPLO 5 (0,063 mmol) fue colocada en un balón RB al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético

(2%) en cloruro de metileno. La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con cloruro de metileno. El cloruro de metileno se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo blanco que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL). Se añadió gota a gota una solución concentrada de yodo en metanol con agitación vigorosa hasta que se formó una coloración permanente de color café después de lo cual se removió el exceso de yodo por adición de una pequeña cantidad de ácido ascórbico.

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de paclitaxel se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como se evidenció por HPLC analítica, fueron reunidas,

concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo blanco esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por el análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 7

Preparación de Resina de Camptotencin-carbonil-N-aminoetil-glicina-D-tert-butil-Ser-D-epsilon-tert-butiloxycarbonil-Lys-Gln-Trp-Ala-Val-beta-Ala-tritil-His-Phe-Nle-Rink-amida (SEQ ID No.: 18)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida (0,063 mmol) [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido-norleucyl-metilbenzhydrylamina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos.

La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Norleucina (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-Nⁱⁿ-tritol-L-histidina, Fmoc-βAla, Fmoc-Valina, Fmoc-alanina, Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-L-triptófano, Fmoc-glutamina, Fmoc-O-t-butil-D-Tyr, Fmoc-O-t-butil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptidílica (3 eq), se añadió N-Boc-etilendiamina en NMP y se mezcló durante dos horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM.

Se añadió el cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 8

Preparación de Camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-D-Ser-D-Lys-Gln-Trp-Ala-Val- β -Ala-His-Phe-Nle-amida (SEQ ID No.:18)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 7 (0,063 mmol) fue colocada en un balón fondo redondo al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL).

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina

se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como se evidenció por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 9

Preparación de Resina de Camptotencin-carbonil-N-aminoetil-glicina-D-tert-butil-Ser-D-tert-butil-Tyr-Gln-

Trp-Ala-Val-β-Ala-tritil-His-Phe-Nle-Rink-amida (SEQ ID No.: 19)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida (0,063 mmol) [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido-norleucyl-metilbenzhydrylamina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Norleucina (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-Nⁱⁿ-tritol-L-histidina, Fmoc-βAla, Fmoc-Valina, Fmoc-alanina, Fmoc-Nⁱⁿ-Boc-L-triptófano, Fmoc-glutamina, Fmoc-N^ε-Boc-D-lisina, Fmoc-O-t-butil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptidílica (3 eq), se añadió N-Boc-etilendiamina en NMP y se mezcló durante dos horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 10

Preparación de Camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-D-Ser-D-Tyr-Gln-Trp-Ala-Val-β-Ala-His-Phe-Nle-amida (SEQ ID No.:19)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 9 (0,063 mmol) fue colocada en un balón RB al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas) y se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL).

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elución por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como fueron identificadas por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El

péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 11

Preparación de Resina de Combretastatin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-D-tert-butyl-Ser-Norleucina-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amida (SEQ ID No.: 39)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida MBHA (0,063 mmol) [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido -norleucyl-metilbenzhydridamina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un

exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Norleucina (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-L-treonina, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lisina, N^α-Fmoc-N^{1α}-Boc-D-triptofano, Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-D-serina, Fmoc-O-t-butil-D-tirosina, N^α-Fmoc-Norleucina, Fmoc-O-t-butil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina

peptidílica (3 eq), se añadió N-Boc-etilendiamina en NMP y se mezcló durante dos horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el cloroformato de combretastatina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 12

Preparación de combretastatin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amida (SEQ ID No.:40)

La resina del péptido combretastatina preparada en el EJEMPLO 11 (0,063 mmol) fue colocada en un balón fondo redondo al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL). Se añadió gota a gota una solución concentrada de yodo en

metanol con agitación vigorosa hasta que se formó una coloración permanente de color café después de lo cual se removió el exceso de yodo por adición de una pequeña cantidad de ácido ascórbico.

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como fueron identificadas por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo blanco esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una

matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 13

Preparación de Resina de Camptotecin-carbonil-N-(N-metil-2-aminoetil)-glicina-D-tert-butyl-Ser-Norleucina-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amida (SEQ ID No.: 39)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida MBHA (0,063 mmol) [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido -norleucyl-metilbenzhydrylamina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la

resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Thr(tBut) (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-L-treonina, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lisina, N^α-Fmoc-N^{1α}-Boc-D-triptofano, Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-D-serina, Fmoc-O-t-butil-D-tirosina, N^α-Fmoc-Norleucina, Fmoc-O-t-butil-D-serina, ácido bromoacético. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptidílica (3 eq), se añadió N-Boc-N-metiletilendiamina en NMP y se mezcló durante dos horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes

cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 14

Preparación de Camptotecin-carbonil-N-(N-metil-2-aminoetil)-glicina-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amida (SEQ ID No.:40)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 13 (0,063 mmol) fue colocada en un balón RB al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL). Se añadió gota a gota una solución concentrada de yodo en metanol con agitación vigorosa hasta que se formó una coloración permanente de color café después de lo cual se removió el exceso de yodo por adición de una pequeña cantidad de ácido ascórbico.

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como se evidenció por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 15

Resina di-tert-butiloxycarbonil-His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-tert-butiloxycarbonil-Trp-tert-butil-Tyr-Pro-Gln-Ile-tert-butil-Ser-N-e-camptotecin-carbonil-N-(N-2-aminoetil)-glicin-Lys-tert-butil-Ser-Rink-amida (SEQ ID No.: 20)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida MBHA (0,063 mmol) resina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2 minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Serina(tBut) (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la

resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-N-e-1(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)3-3metil-butil-L-Lisina, Fmoc-O-t-butil-L-Serina, N^α-Fmoc--L-Isoleucina, N-Fmoc-L-Glutamina, N-Fmoc-L-Prolina, N-Fmoc-O-Tritil-L-Tirosina, N^α-Fmoc-N¹ⁿ-Boc-L-triptofano, N-Fmoc-L-Prolina, N-Fmoc-L-Glutamina, N^α-Fmoc--L-Isoleucina, N-Fmoc-L-Glutamina, N^α-Fmoc-Leucina, Boc-O-t-butil-L-Histidina.

La resina protegida del péptido fue tratada entonces tres veces (3 minutos cada vez) con una solución al 2% de hidrato de hidracina en DMF con objeto de remover al grupo N-e-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)3-metil-butil (ivDde) sobre el residuo de lisina. El grupo e-amino libre fue entonces acoplado con al ácido bromoacético seguido por la adición de N-Boc-N-etilendiamina (3 eq, 12 h) en NMP. Se añadió el cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y

se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 16

Preparación del Derivado de Camptotecina del Péptido Fago p147:

His-Leu-Gln-Ile-Gln-Pro-Trp-Tyr-Pro-Gln-Ile-Ser-N-e-camptotecin-carbonil-N-(N-2-aminoetil)-glicina-Lys-Ser-NH₂ (SEQ ID No.: 20)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 15 (0,063 mmol) fue colocada en un balón RB al cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. La suspensión se agitó (5 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue purificado por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en

fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 μ m). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm. Las fracciones que contenían el producto puro, como se evidenció por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 17

Preparación de N-carboxianhídrido de O-t-butil-D,L-serina

La O-t-butil-D-serina (0,0062 mol) y la O-t-butil-L-serina (0,0062 mol) se suspendieron en 55 mL de tetrahidrofurano anhidro (THF) bajo atmósfera de

nitrógeno. Se añadió fosgeno (0,025 mol) a la suspensión y ésta fue puesta a reflujo durante 15 minutos. El solvente y el exceso de fosgeno fueron evaporados y el aceite resultante fue disuelto en 10 mL de THF y luego añadido a 600 mL de Hexanos y cristalizado a -20°C.

EJEMPLO 18

Preparación de Resina de Camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-[D o L O-tert-butyl-Ser]-₁₅-D-tert-butyl-Ser-Norleucina-D-tert-butyl-Tyr-D-tert-butyl-Ser-S-trityl-Cys-Phe-D-Trp-epsilon-tert-butylloxycarbonyl-Lys-tert-butyl-Thr-S-trityl-Cys-tert-butyl-Thr-Rink-amida (SEQ ID No.:21 y SEQ ID No.:23-SEQ ID No.:36)

Se añadió resina de poliestireno de Rink amida MBHA (0,063 mmol) [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmco-(aminometil)fenoxiacetamido -norleucyl-metilbenzhydrylamina, malla 100-200, Novabiochem, San Diego, CA] al vaso de reacción de un sintetizador automático de péptidos CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se la hinchó en DMF aproximadamente durante 1 hora. La resina se filtró y se le añadió un exceso de piperidina al 20% en DMF y se mezcló durante 2

minutos. La resina se filtró y nuevamente se le añadió una cantidad en exceso de piperidina al 20% y se mezcló durante 20 minutos para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc de la resina. Después de la desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF, y luego el primer amino ácido protegido, Fmoc-Thr(tBut) (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimina (DIC) (0,188 mmol), y el monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol), se disolvieron todos juntos en DMF y se añadieron a la resina, la cual fue mezclada (1 hora), seguido por un lavado 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc fue removido nuevamente por tratamiento con solución de piperidina al 20% / DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, los siguientes amino ácidos reaccionaron sucesivamente con la cadena del péptido en crecimiento: Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-L-treonina, N^α-Fmoc-N^ε-Boc-L-lisina, N^α-Fmoc-N¹ⁿ-Boc-D-triptofano, Fmoc-L-fenilalanina, Fmoc-S-tritil-L-cisteína, Fmoc-O-t-butil-D-serina, Fmoc-O-t-butil-D-tirosina, N^α-Fmoc-Norleucina, Fmoc-O-t-butil-D-serina. En este punto el grupo Fmoc N-terminal fue removido, la resina lavada varias veces con DMF, y luego la resina fue transferida a un balón RB de 100 mL. Se

disolvió O-tert-butil-Serina NCA (1,5g) en DMF anhidro y se le añadió a la resina peptidílica, y la resina suspendida fue agitada durante la noche a 40°C. La resina fue filtrada y lavada varias veces con DMF y luego vuelta a colocar sobre el sintetizador CS Bio. El ácido bromoacético fue acoplado entonces a la serina N-terminal en DCM/DIC. Después de que se completó el acoplamiento del ácido bromoacético a la resina peptidílica, se añadió N-Boc-etilendiamina (3 eq) en NMP y se mezcló durante dos horas y luego se lavó 3 veces con DMF, y 3 veces con DCM. Se añadió el cloroformato de camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante la noche, se lavó con grandes cantidades de DMF seguido por metanol. Después de una filtración final, la resina derivatizada se secó al aire durante la noche.

EJEMPLO 19

Preparación de Camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicina-[Poli-D,L-Ser]-D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser-ciclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-amida (SEQ ID No.:22)

La resina del péptido camptotecina preparada en el EJEMPLO 18 (0,063 mmol) fue colocada en un balón RB al

cual se añadieron 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contenía agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 horas), se filtró y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó al vacío, y se añadió éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que fue luego disuelto en ácido acético al 60% (250 mL). Se añadió gota a gota una solución concentrada de yodo en metanol con agitación vigorosa hasta que se formó una coloración permanente de color café después de lo cual se removió el exceso de yodo por adición de una pequeña cantidad de ácido ascórbico.

La solución se redujo por medio de vacío hasta un volumen de alrededor de 10 mL y el péptido crudo de camptotecina se purificó por medio de cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 enlazado con sílica (Dynamax 300, 8 µm). Se empleó un sistema de elusión por gradiente lineal a una tasa de flujo de 20 mL/min: la solución amortiguadora A consistió en TFA al 0,1%, y la solución amortiguadora B, TFA al 0,1% en MeCN al 80%; se incrementó B del 20% hasta el 50% a razón de 1% por minuto. La separación fue monitoreada a 280 nm.

Las fracciones que contenían el producto puro, como se evidenció por HPLC analítica, fueron reunidas, concentradas al vacío, y sometidas a liofilización. El péptido fue obtenido como un polvo amarillo esponjoso de peso constante, por liofilización a partir de ácido acético acuoso. La composición correcta se demostró por análisis de aminoácidos de un ácido hidrolizado y una matriz asistida de espectrometría por desorción láser de masas.

EJEMPLO 20

Uso de los Compuestos Conjugados de Carbamato In Vivo e In Vitro

Los compuestos conjugados con un enlazador de carbamato fueron probados *in vitro* e *in vivo* para conocer la tasa de liberación del agente citotóxico. Se escogió un enlazador de carbamato porque es razonablemente estable en el plasma comparado, por ejemplo, con los enlazadores tipo éster comúnmente usados. También probamos los compuestos carbamato que contienen una mitad cíclica intramolecular, que permite el ajuste de la tasa de liberación del componente alcohólico del carbamato, que

7

culmina en la liberación de un derivado alcohólico enlazado y en la formación de una urea cíclica, la cual puede ser utilizada para controlar las tasas de liberación de las citotoxinas adecuadas (Figura 1). Se sabe que el valor de pKa del alcohol saliente de un carbamato, es importante para la estabilidad de la prodroga, y por lo tanto, escogimos dos agentes citotóxicos químicamente adecuados, cada uno conteniendo un grupo hidroxilo con valores de pKa significativamente diferentes. Un agente citotóxico fue el inhibidor topoisomerasa I, camptotecina, la cual soporta un grupo hidroxilo terciario en la posición 20 del anillo (Figura 1) con un pKa aproximadamente de 18. El otro agente citotóxico fue el agente tubular de enlazamiento, combretastatina, el cual tiene un grupo hidroxil fenólico enlazado a un anillo aromático, exhibiendo así un valor de pKa mucho más bajo de aproximadamente 10,3.

Todos los conjugados de péptido mostrados en la Tabla 1 fueron sintetizados totalmente sobre un soporte de resina de Rink amida, usando la estrategia de protección/desprotección del estándar FMOC (9-fluorenilmetoxycarbonil), empleando acoplamientos simples DIC y activación HBTU como una segunda etapa, solamente

si una prueba de Kaiser fue positiva (como se describió antes). Una vez que la porción de péptido del conjugado estaba completa, se acopló el ácido bromoacético al N-terminal usando DIC/DCM. Después de lavar la resina, se añadió un exceso de N-BOC-etilendiamina 5 M (o la diamina protectora adecuada) en NMP, y se mezcló durante 1 hora. En forma separada se mezclaron camptotecina (200 mg; Aldrich) y DMAP (400 mg) en DCM anhidro (40 mL) y se enfriaron a 0°C. A esta suspensión se le añadió fosgeno al 20% en tolueno (600 mL), y se permitió a la mezcla reaccionar aproximadamente durante 45 minutos. Después de la evaporación del solvente, el polvo se suspendió en DCM (40 mL) y se añadió a la resina peptidílica que soporta a la amina secundaria libre y se los permitió reaccionar durante la noche seguido por varios lavados con DMF, DCM y metanol. El péptido fue entonces escindido de la resina por tratamiento durante dos horas usando la mezcla ácida estándar TFA:H₂O:EDT:TIS, en proporción 95:2:2:1. Después de la escisión, el conjugado fue precipitado 4 veces en etil éter, disuelto en HOAC al 60%, y ciclizado con yodo en metanol. Luego fue sometido a cromatografía preparativa y caracterizado por MS y análisis de aminoácidos. Todos los péptidos se obtuvieron con al menos una pureza superior al 90% y el rendimiento teórico

fue alrededor del 35%. Se demostró que la retención completa de los agonistas conjugados se potencia debido a la somatostatina por si misma, debido a la habilidad de estos para inhibir la liberación de la hormona gonadotropina (GNRH por sus siglas en inglés), que estimuló la liberación de la GH de cultivos en monocapa de células pituitarias de rata, un sistema de ensayo que ha mostrado que se correlaciona bien con la afinidad de enlazamiento del receptor de somatostatina humana del tipo 2 (ver, por ejemplo, Raynor et al., Mol.Pharmacol. 43:838, 1993). El potencial inhibitorio (IC50's) de los conjugados mostrados en la Tabla 2 están en el rango entre 0,26 a 0,49 nM, comparado con los 0,63 nM de la somatostatina-14 por si misma. Esta retención de afinidad completa es debida al empleo de la extensión del tripéptido Nle-d-Tyr-d-Ser N-terminal de la porción de somatostatina cíclica del conjugado que hemos encontrado que generalmente permite enlazar a grandes grupos con poca o ninguna perdida de afinidad.

Tabla 1: Estructuras conjugadas de camptotecina y de combretastatina que contienen diferentes grupos BINAR enlazados.

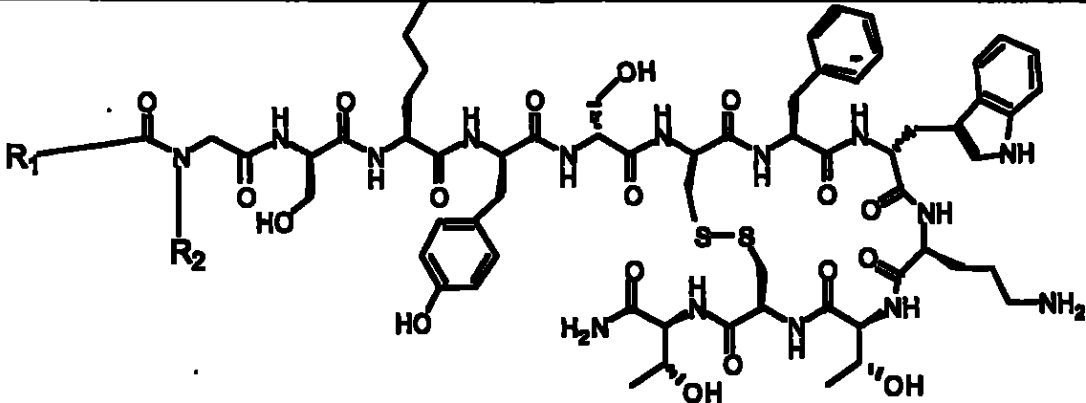
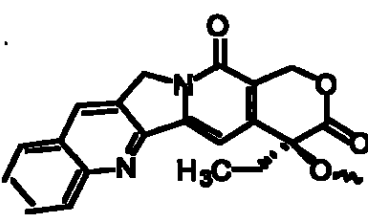
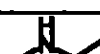
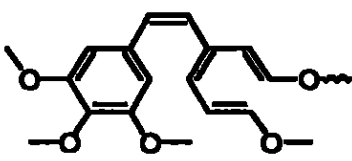
		
R ₁	R ₂	Compuesto
		1
		2
		3
		4
		5
		6

Tabla 2: Actividad agonista, citotoxicidad, y vida media de los compuestos 1-6 en solución amortiguadora y en suero, y compuestos de control

Compuestos	Citotoxicidad IC ₅₀ , nM ^a CélulasIMR-32	Vida Media en la Solución Amortiguadora de Fosfato (Horas)	Vida Media en Suero de Rata (Horas)	Inhibición de la Hormona de Crecimiento IC ₅₀ , nM ^a
1	374+/-18	Estable ^a	106	0,32+/-0,02
2	54,2+/-6	123	18	0,27+/-0,02
3	571+/-48	Estable	59	0,30+/-0,04
4	>1000	Estable	72	0,26+/-0,03
5	>1000	na	na	0,49+/-0,1
6	2,79+/-0,33	31	4	0,31+/-0,1
Camptotecina	2,21+/-0,44	na	na	na
Combretastatina	4,36	na	na	na
SRIF (1-14)	na ^b	na	2-5 minutos	0,63+/-0,029

^a Experimento llevado a cabo durante 50 horas.

^b Los análogos de somatostatina no fueron tóxicos para las células IMR32 hasta en concentraciones de 10⁻⁵ M.

Cada péptido conjugado fue sometido a estudios de estabilidad en una solución amortiguadora de fosfato y de

suero de rata. Los análogos fueron incubados o en solución amortiguadora de fosfato 0,1M o en suero fresco de rata a 37°C, y se tomaron alícuotas en diferentes momentos y se examinaron por HPLC. Los compuestos 1, 3 y 4 mostraron estabilidad completa en la solución amortiguadora durante el transcurso del experimento (50 horas, Tabla 2). El compuesto 2 fue menos estable en solución amortiguadora con una vida media de alrededor de 120 horas, mientras que el compuesto 6 fue el menos estable con una vida media de tan solo 30 horas en la solución amortiguadora. En suero de rata, esta misma tendencia fue evidente, excepto por que hubo claramente un efecto catabólico del suero sobre la estabilidad de los compuestos. Los compuestos 1, 3 y 4 fueron nuevamente los más estables, mientras que la vida media del compuesto 2 fue de 18 horas y el compuesto 6 de combretastatina, que contiene al hidroxilo fenólico, fue el menos estable con una vida media de 4 horas.

La actividad citotóxica de estos conjugados fue medida usando un juego de ensayo MTT estándar (Promega Corporation, Madison, WI). Cada compuesto fue incubado durante tres días con células de neuroblastoma humano IMR32 (sobrexpresión del receptor de somatostatina) a

diferentes concentraciones por cuadruplicado, y los IC50 fueron generados a partir de las curvas de respuesta a las dosis (Figura 2). Aunque el compuesto 6 BINAR de combretastatina-etilendiamina fue el más citotóxico, después de revisar los datos de estabilidad en la solución amortiguadora, es evidente que el 50% de este conjugado está libre de citotoxina después de 3 días, y quizás más, ya que el medio celular suele contener algunas enzimas. El conjugado 2 de N-Me-etilendiamina camptotecina fue el segundo más potente. Después de 3 días, más del 80% de este conjugado aún estaba intacto. El siguiente más potente fue el compuesto 1 de etilendiamina. Este análogo demostró completa estabilidad en solución amortiguadora de fosfato, pero fue siete veces menos potente que el compuesto 2 y ligeramente más activo que el compuesto 3 aunque fue más estable en suero. Esta propiedad es probablemente debida a la capacidad del compuesto 1 para formar una urea cíclica, mientras que el compuesto 3 es incapaz de formar estas mismas especies.

En estudios preliminares sobre el padecimiento de un tumor en animales, los compuestos 1 y 2 parecen ser igualmente efectivos induciendo un efecto citotóxico en

el tumor después de una administración intraperitoneal repetida. Los compuestos basados en los grupos BINAR N,N-dimetiletilendiamina, diaminopropil, y 2-hidroxietilamina (Figura 2; Tabla 2) fueron esencialmente inactivos, presumiblemente debido a la falta de liberación de cualquiera de los agentes citotóxicos libres en forma intra o extra celular. El conjugado 2 de la camptotecina líder fue capaz de estabilizar en forma significativa el crecimiento de pequeñas células transplantadas NCI-H69 de carcinomas de pulmón (expresión de SSTR2) en ratones desnudos con dosis muy por debajo del máximo tolerado, equivalente a dosis de camptotecina solamente. Los datos sugieren no solamente a un componente químico para la tasa de liberación del alcohol, sino también algunos componentes enzimáticos.

El valor de la estrategia de enlazamiento BINAR radica tanto en su capacidad de ser ajustada para acomodar una tasa ideal de liberación para los diferentes tipos de alcohol contenidos en los grupos, y su facilidad de incorporación dentro del grupo amino libre de un péptido por simple química de fase sólida. La química para introducir los grupos es muy adecuada para síntesis en fase sólida y fácilmente adaptable para muchos péptidos

diferentes, agentes terapéuticos, y citotoxinas. Aunque esta estrategia es fácilmente aplicada a los N-terminales, también puede aplicarse al costado de la cadena protegido ortogonalmente, así como también debería ser necesaria para la preservación de la afinidad de enlazamiento del péptido. Con los presentes conjugados de camptotecina, se logró una alta citotoxicidad con los compuestos 1 y 2 (Figura 2; Tabla 2), aunque ellos fueron muy estables en las condiciones de incubación del medio celular. Las altas concentraciones del conjugado intacto del péptido estarán específicamente enlazadas a las células del tumor después de lo cual tendría lugar la internalización. Además, los conjugados son altamente solubles y las tasas de despeje del tejido y de las rutas, pueden ser además fácilmente ajustadas alterando la hidrofiliicidad del componente del péptido, como se describió antes. Si el conjugado del péptido permanece razonablemente intacto durante el despeje, se reducirán mucho entonces los efectos tóxicos secundarios.

EJEMPLO 21

Preparación de resina Camptotecin-carbonil-N-aminoetil-glicina-S-tritil-Cys-Rink-amida

Resina amida Rink [4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-(aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-metilbenzhidrilamina (0,063 mmoles), malla 100-200 (Novabiochem, San Diego, CA) se agregó al frasco de reacción de un sintetizador péptido automático CS136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se hinchó en dimetilformamida (DMF) durante aproximadamente 1 h. La resina se filtró y se agregó y se mezcló un exceso de 20% de piperidina en DMF (2 min). La resina se filtró y de nuevo un exceso en la cantidad de 20% de piperidina se agregó y se mezcló (20 min) para asegurar la remoción completa del grupo de resina Fmoc. Después de desprotection, la resina se lavó 4 veces con DMF y luego el primer aminoácido protegido, Fmoc-S-tritil-L-cisteína (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimida (DIC) (0,188 mmol), y monohidrato N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol) todos se disolvieron en DMF/DCM y se agregó a la resina, que se mezcló durante 1 h, seguido por lavado 4 veces con DMF.

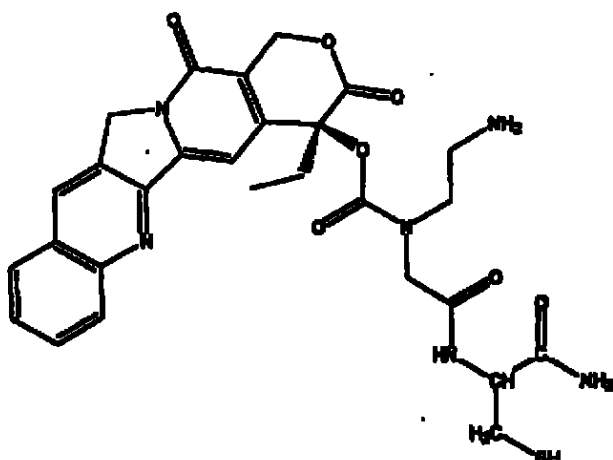
El grupo Fmoc se removió de nuevo mediante tratamiento con 20% de solución de piperidina/DMF y, siguiendo los mismos procedimientos generales de acoplamiento, se agregó Fmoc-N-(2-BOC-aminoetil)glicina (Neosystem). El grupo Fmoc se removió y la resina de peptidilo se lavó varias veces con DCM. Se agregó cloroformato de Camptotecina del EJEMPLO 1 a la resina y se mezcló durante toda la noche, luego se lavó con cantidades copiosas de DMF seguidas por metanol. Después de una filtración final la resina derivada se secó al aire durante la noche.

Preparación de camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-glicine-Cis-amida

La resina de camptotecin-péptido preparada en el EJEMPLO 21 (0,063 mmol) se colocó en un frasco de fondo redondo al que se le agregó 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contiene agua (2,5%), 1,2-etaneditiol (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó (2 h), se filtró, y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó en vacío y se agregó éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que luego se disolvió en ácido acético 60% (15 mL).

El péptido de camptotecina crudo se purificó mediante cromatografía líquida de alta presión de fase reversa preparativa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 unido a sílice (Dynamax 300,8 μ m). Se empleó un sistema de elusión de gradiente lineal en un índice de flujo de 20 mL/min: el amortiguador A consistió de 0,1 % de TFA y amortiguador B, 0,1 % de TFA en 80% MeCN; 20% B a 50% B se incrementó en 1% por min. La separación se monitoreó en 280 nm. Las fracciones que contienen el producto crudo, como se identificó mediante HPLC analítico, se reunieron, se concentraron en vacío, y se sometieron a liofilización. El péptido se obtuvo como un polvo amarillo lanilloso de peso constante mediante liofilización del ácido acético acuoso. La composición correcta, como se mostró adelante, se demostró mediante espectrometría de masa de desorción láser de matriz asistida.

187



EJEMPLO 23

Preparación de Camptotecin-carbonil-N-aminoetil-glicina-Phe (benzofenona)-amida-resina

Resina Rink amida [4-(2',4'-dimetoxifenil-FMOC-(aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-metilbenzhidrilaamina (0,063 mmoles), malla 100-200 (Novabiochem, San Diego, CA) se agregó al vaso de reacción de un sintetizador de péptido automático CS 136 (CS Bio, Inc., San Carlos, CA) y se hinchó en dimetilformamida (DMF) durante aproximadamente 1 h. La resina se filtró y se agregó un exceso de 20% de piperidina en DMF y se mezcló (2 min). La resina se filtró y se agregó de nuevo una cantidad de exceso de 20%

198

piperidina y se mezcló (20 min) para asegurar la remoción completa del grupo Fmoc. Después de desprotección, la resina se lavó 4 veces con DMF y luego el primer aminoácido protegido, Fmoc-L-p-benzoil-fenilalanina (0,188 mmol), diisopropilcarbodiimida (DIC) (0,188 mmol), y monohidrato de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,188 mmol) todos se disolvieron en DMF/DCM y se agregaron a la resina, que se mezcló durante una hora, luego de lavar 4 veces con DMF.

El grupo Fmoc se removió de nuevo mediante tratamiento con 20% de solución de piperidina/DMF y, siguiendo los mismos procedimientos de acople general, se agregó, Fmoc-N-(2-Boc-aminoetil)glicina (Neosystem). El grupo Fmoc se removió y la resina de peptidilo se lavó con varias veces con DCM. El cloroformato de Camptotecina del EJEMPLO 1 se agregó a la resina y se mezcló durante la noche, luego se lavó con cantidades copiosas de DMF seguidas por metanol. Después de una filtración final la resina derivada se secó al aire durante toda la noche.

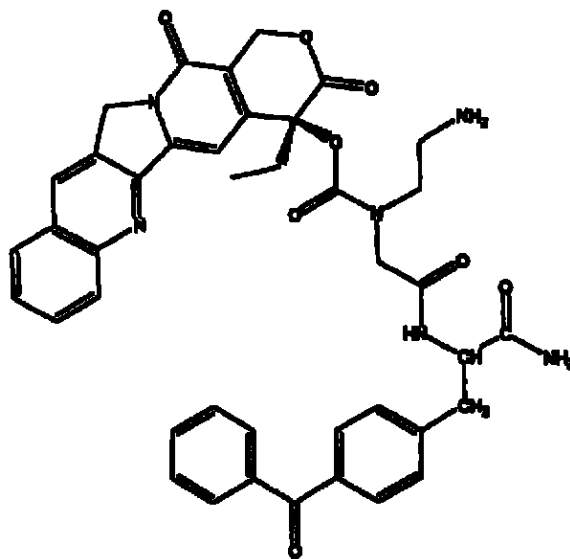
EJEMPLO 24

*Preparación de camptotecin-carbonil-N-(2-aminoetil)-
glicina-p-Benzoil-phenilalanina-amida*

La resina de péptido de camptotecina preparada en el EJEMPLO 23 (0,063 mmol) fue colocada en un frasco de fondo redondo al cual se agregó 15 mL de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) que contiene agua (2,5%), y triisopropilsilano (1%). La suspensión se agitó durante 2 h, se filtró, y se lavó varias veces con TFA. El TFA se evaporó in vacuo y se agregó éter al aceite resultante para dar un polvo amarillo que luego se disolvió en ácido acético 60% (15 ML).

El péptido de camptotecina crudo se purificó mediante cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (RP-HPLC) sobre una columna (21,4 x 250 mm) de C-18 unida a sílice (Dynamax 300, 8 µm). Se empleó un sistema de gradiente de elusión lineal en un índice de flujo de 20 mL/min: el amortiguador A consistió de 0,1% TFA y el amortiguador B, 0,1% TFA en 80% MeCN; 20% B a 50% B se incrementó en 1% por min. La separación se monitoreó a

280 nm. Las fracciones que contienen el producto puro, como se identificó mediante HPLC analítico, se reunió, se concentró en vacío, y se sometió a liofilización. Se obtuvo el péptido como un polvo amarillo lanoso de peso constante mediante liofilización de ácido acético acuoso. La composición correcta, como se muestra adelante, se demostró mediante espectrometría de masa de desorción láser de matriz asistida.



Otras Modalidades

Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a las modalidades preferidas, un experto en la

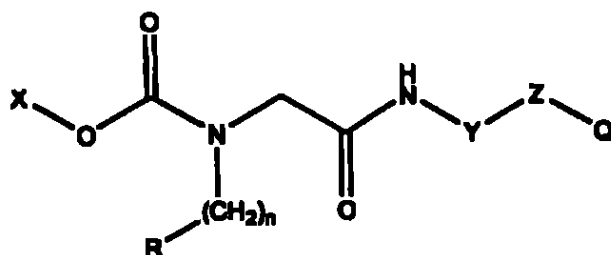
técnica puede comprobar fácilmente sus características esenciales sin apartarse del espíritu y alcance de esta, puede hacer varios usos y modificaciones de la invención para adaptarlo a varios usos y condiciones. Aquellos expertos en la técnica reconocerán o podrán comprobar, utilizando solo la experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas de la invención descritas aquí. Se pretende que tales equivalencias se abarquen dentro del alcance de la presente invención.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia con el mismo alcance como si cada publicación independiente o solicitud de patente fuera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada como referencia.

Lo que se reivindica es:

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado representado por la siguiente fórmula:



En donde:

X es un agente citotóxico

n es un entero de 0 a 6, en donde $(\text{CH}_2)_n$ es sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un grupo alquilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático o heteroaromático;

R es $\text{N}(\text{R}_1, \text{R}_2)$, OR_1 , o SR_1 , en donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior;

Y es una secuencia espaciadora hidrofílica, o se omite;

Z es un péptido ligador que, cuando se une a Q en terminal N o en un grupo amino de cadena lateral compatible de Q, preserva al menos 50% de la actividad biológica de Q, Z que tiene la fórmula:

-

A-B-C-E-F, en donde:

A es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, o L-Ser, o es suprimido;

B es D-Lys o D-Tyr, o es suprimido;

C es Lys, Ser, HSER, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, o 4) 3-piridil-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, o es suprimido;

E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y

F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5

astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-TYR, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln;

Con la condición que cuando A, B, C, y E son Tyr, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Lys; y cuando A, B, C, y E son Lys, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, E no es Tyr o Lys; y cuando A y B están suprimidos, y C y E son Lys y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys; y Q es una porción objetivo, o es omitida.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde X es un agente citotóxico.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde dicho agente citotóxico es un agente de alquilación, un antibiótico, un antimetabolito, un inhibidor de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa I o II, un agonista hormonal o antagonistas, un agente apoptótico, o un inmunomodulador.

4. El compuesto de la reivindicación 2, en donde dicho agente citotóxico es camptotecina, homocamptotecina, colchicina, combretastatina, dolistatina, doxorubicina, metotrexato, podofilotoxina, rizoxina, rizoxina D, un

taxol, paclitaxol, CC1065, un maitansinoide, o derivados o análogos de esta.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de espaciador hidrofílica es un I péptido que incrementa la biodistribución hidrofílica de dicho compuesto.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde dicho péptido tiene la fórmula $U(V-V)_N$, en donde U es D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosina, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-PHE, o $(NH_2-(CH_2)_m-COOH)$, donde $m=2-10$, inclusive, o es suprimido; cada V es independientemente seleccionado del grupo que consiste de: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Gln, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, o L-4 hidroxipro; y $N=1-50$, inclusive.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en donde V es independientemente D-Ser o L-Ser.

8. El compuesto de la reivindicación 6, en donde al menos un V es un aminoácido D.

9. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de espaciador hidrofílica es un polímero hidrofílico.

10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde dicho polímero hidrofílico es polietilenglicol, acetato de polivinilo, polivinil alcohol, HPMA (N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) o copolímeros HPMA, α, β -poli(N-hidroxietil)-DL-aspartamida (PHEA), o α, β -poli(N-hidroxipropil) -DL-aspartamida.

11. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha porción objetivo es un péptido biológicamente activo.

12. El compuesto de la reivindicación 11, en donde dicho péptido biológicamente activo es somatostatina, bombesina, un péptido KiSS, un péptido de urotensina II, péptidos I y II de hormona de liberación de gonadotropina (GNRH), octreotida, depreotida, vapreotida, péptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistoquinina (CCK), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), péptidos que contienen RGD, péptido de hormona que estimula el melanocito (MSH), neurotensina, calcitonina, un péptido

que comprende la región que determina la complementariedad de un anticuerpo de antitumor, glutathiona, un péptido ávido de leucocito que comprende la secuencia de aminoácido YIGSR, la región de unión de heparina de platelet factor-4 (PF-4), y una secuencia rica en lisina, péptido natriurético atrial (ANP), un péptido P-amiloide, un antagonista opioide delta, annexin-V, endotelina, interleuquina (IL)-1, IL-1ra, IL-2, IL-8, leucotrieno B4 (LTB4), un péptido quimotáctico, un antagonista receptor GP IIb/IIIa, factor de crecimiento epidermal, un inhibidor de elastasa de neutrófilo humano, inhibidor plasmin, un péptido antimicrobial, apticida P280, apticida P274, un receptor de trombospondina, bitistatina, receptor tipo I ciclase adenilil pituitaria (PAC1), cadena α fibrin, o derivados o análogos de esta.

13. El compuesto de la reivindicación 11, en donde dicho péptido biológicamente activo es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

14. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho leukocyte-avid péptido es P483H.

15. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho antagonista opioide delta es ITIPP (psi).

16. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho péptido quimotáctico es N-formil-metionil-leucil-fenilalanina-lisina (fMLFK).

17. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho antagonista receptor GP IIb/IIIa es DMP444.

18. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho inhibidor de elastasa neutrófilo humano es EPI-HNE-2 o EPI-HNE-4.

19. El compuesto de la reivindicación 12, en donde dicho receptor de trombospondina es TP-1300.

20. El compuesto de la reivindicación 11, en donde dicho péptido biológicamente activo objetiva dicho compuesto a una célula o tejido en el cuerpo de un mamífero.

21. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicha porción objetivo es un péptido derivado de una librería

de muestras de fago, o substituciones moderadas de esta, que objetiva dicho compuesto a la célula o tejido en el cuerpo de un mamífero.

22. El compuesto de la reivindicación 20 o 21, en donde dicha célula o tejido comprende una célula de cáncer, un glóbulo blanco, tejido cardíaco, tejido cerebral, o un tubérculo infectado con la tuberculosis

23. El compuesto de la reivindicación 20 o 21, en donde dicho tejido es un tumor o un vaso sanguíneo angiogénico proliferativo.

24. El compuesto de la reivindicación 23, en donde dicho vaso sanguíneo está en el ojo.

25. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Q es un péptido de somatostatina.

26. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Q es un péptido de bombesina.

27. El compuesto de la reivindicación 13, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este.

28. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser.

29. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Lys-D-Ser-D-Ser.

30. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr.

31. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser.

32. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser.

33. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Ser-D-Lys-Ser.

34. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser.

35. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser.

36. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser.

37. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Lys-D-Ser-D-Ser.

38. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Ser-D-Lys-D-Ser.

39. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Ser-D-Lys-Ser.

40. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Nle-D-Tyr-D-Ser.

41. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Lys-D-Tyr-D-Ser.

42. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Pal-D-Lys-D-Ser.

43. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es Thr-D-Tyr-D-Ser.

44. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-D-Lys.

45. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Ser-D-Tyr.

46. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Lys-D-Lys.

47. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Lys-D-Tyr.

48. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z es D-Tyr-D-Lys.

49. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z tiene la fórmula: E-F, en donde: E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5

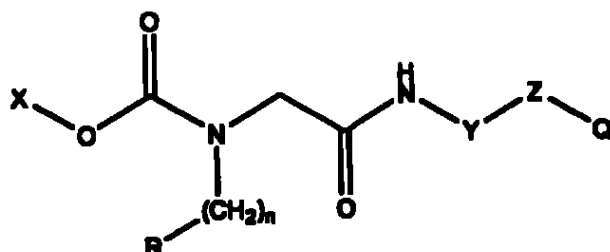
dibromo-D- Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Gln, o L-Gln; y

F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln.

50. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R comprende 1 a 20 átomos de carbono.

51. El compuesto de la reivindicación 51, en donde R comprende 1 a 8 átomos de carbono.

52. Un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un sujeto que sufre de dicha enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la fórmula:



en donde:

X es un agente citotóxico o agente terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde $(CH_2)_n$ es sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un alquilo, alquenilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o un grupo heteroaromático;

R es $N(R_1R_2)$, OR_1 , o SR_1 , en donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior;

Y es a secuencia de espaciador hidrofílica, o es omitida;

Z es un péptido de unión que, cuando se une a Q en el terminal N o en un grupo amino de cadena lateral compatible de Q, preserva al menos el 50% de la actividad biológica de Q, Z que tiene la fórmula:

A-B-C-E-F, en donde:

A es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, o L-Ser, o es suprimido;

B es D-Lys o D-Tyr, o es suprimido;

C es Lys, Ser, HSER, Thr, Nle, Abu, Nva, (2, 3, o 4) 3-piridil-Ala(Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-Phe, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, o es suprimido;

E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y

F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-GLN, o L-Gln;

Dado que cuando A, B, C, y E son Tyr, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Lys; y cuando A, B, C, y E son Lys, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, E no es Tyr o Lys; y cuando A y B son eliminados, y C y E son Lys y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys, y

Q es a targeting moiety, o es omitted.

53. El método de la reivindicación 52, en donde X es un agente citotóxico.

54. El método de la reivindicación 53, en donde dicho agente citotóxico es camptotecina, homocamptotecina, colchicina, combretastatina, dolistatina, doxorubicina, metotrexato, podofilotoxina, rizoxina, rizoxina D, un taxol, paclitaxol, CC1065, un maitansinoide, o derivados o análogos de esta.

55. El método de la reivindicación 52, en donde dicha secuencia de espaciador hidrofílica es un péptido que incrementa la biodistribución hidrofílica de dicho compuesto.

56. El método de la reivindicación 55, en donde dicho péptido tiene la fórmula $U(V-V)_n$, en donde U es D-Pro, L-Pro, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, Sarcosina, Lys, Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-PHE, o (NH₂-(CH₂)_m-COOH), donde m=2-10, inclusive, o es suprimido; cada V es independientemente seleccionado del grupo que consiste de: D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-GLN, L-Gln, D-Asn, L-Asn, D-4-OH-Pro, o L-4 hidroxil-Pro; y n=1-50, inclusive.

57. El método de la reivindicación 56, en donde V es independientemente D-Ser o L-Ser.

58. El método de la reivindicación 56, en donde al menos un V es un aminoácido D.

59. El método de la reivindicación 52, en donde dicha secuencia de espaciador hidrofílica es un polímero hidrofílico.

60. El método de la reivindicación 59, en donde dicho polímero hidrofílico es polietilenglicol, acetato de polivinilo, o polivinil alcohol.

61. El método de la reivindicación 52, en donde dicha porción objetivo es un péptido biológicamente activo.

62. El método de la reivindicación 61, en donde dicho péptido biológicamente activo es somatostatina, bombesina, un péptido KiSS, un péptido de urotensina II, péptidos de hormona de liberación de gonadotropina (GNRH) I y II, octreotida, depreotida, vapreotida, péptido intestinal vasoactivo (VIP), colecistoquinina (CCK), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), péptidos

que contienen RGD, péptido de hormona que estimula el melanocito (MSH), neurotensina, calcitonina, un péptido que comprende la región que determina la complementariedad de un anticuerpo antitumor, glutatona, un péptido ávido de leucocito que comprende la secuencia de aminoácido YIGSR, la región de unión de heparina de factor 4 platelet (PF-4), y una secuencia rica en lisina, péptido natriurético atrial (ANP), un péptido P-amiloide, un antagonista opioide delta, annexin-V, endotelina, interleuquina(IL)-1, IL-1ra, IL-2, IL-8, leucotrieno B4 (LTB4), un péptido quemotáctico, un antagonista receptor GP IIb/IIIa, factor de crecimiento epidermal, un inhibidor de elastasa de neutrófilo humano, inhibidor plasmin, un péptido antimicrobial, apticida P280, apticida P274, un receptor de trombospondina, bitistatina, receptor tipo I de ciclase adenilil pituitaria (PAC1), cadena A de fibrina, o derivados o análogos de esta.

63. El método de la reivindicación 61, en donde dicho péptido biológicamente activo es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

64. El método de la reivindicación 62, en donde dicho leukocyte-avid péptido es P483H.

65. El método de la reivindicación 62, en donde dicho antagonista opioide delta es ITIPP (psi).

66. El método de la reivindicación 62, en donde dicho péptido quimotáctico es N-formil-metionil-leucil-fenilalanina-lisina (fMLFK).

67. El método de la reivindicación 62, en donde dicho GP IIb/IIIa receptor antagonist es DMP444.

68. El método de la reivindicación 62, en donde dicho inhibidor de elastasa neutrófilo humano es EPI-HNE-2 o EPI-HNE-4.

69. El método de la reivindicación 62, en donde dicho receptor trombospondina es TP-1300.

70. El método de la reivindicación 61, en donde dicho péptido biológicamente activo objetica dicho compuesto a una célula o tejido en el cuerpo de un mamífero.

71. El método de la reivindicación 52, en donde dicha porción objetivo es un péptido derivado de una librería de exhibición de fago, o un derivado o un análogo de este, que objetiva dicho compuesto a una célula o tejido en el cuerpo de un mamífero.

72. El método de la reivindicación 70 o 71, en donde dicha célula o tejido comprende una célula de cáncer, un glóbulo blanco, tejido cardíaco, tejido cerebral, o un tubérculo infectado con tuberculosis.

73. El método de la reivindicación 70 o 71, en donde dicho tejido es un tumor o un vaso sanguíneo angiogénico proliferativo.

74. El método de la reivindicación 73, en donde dicho vaso sanguíneo está en el ojo.

75. El método de la reivindicación 50, en donde Q es somatostatina o un análogo de este, bombesina o un análogo de este, o un anticuerpo.

76. El método de la reivindicación 52, en donde Q es un péptido de somatostatina.

77. El método de la reivindicación 52, en donde Q es un péptido de bombesina.

78. El método de la reivindicación 63, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

79. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Nle-D-Ser-D-Ser.

80. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-LYS-D-Ser-D-Ser.

81. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Tyr.

82. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Lys-D-Tyr-D-Ser.

83. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Ser-D-Lys-D-Ser.

84. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Ser-D-Lys-Ser.

85. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Nle-D-Tyr-D-Ser.

86. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Pal-D-Tyr-D-Ser.

87. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-Thr-D-Tyr-D-Ser.

88. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Lys-D-Ser-D-Ser.

89. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Ser-D-Lys-D-Ser.

90. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Ser-D-Lys-Ser.

91. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Nle-D-Tyr-D-Ser.

92. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Lys-D-Tyr-D-Ser.

93. El método de la reivindicación 52, en donde Z es Pal-D-Lys-D-Ser.

94. El método de la reivindicación 52, en donde Z es THR-D-TYR-D-Ser.

95. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-D-Lys.

96. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Ser-D-Tyr.

97. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Lys-D-Lys.

98. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Lys-D-Tyr.

99. El método de la reivindicación 52, en donde Z es D-Tyr-D-Lys.

100. El método de la reivindicación 52, en donde Z tiene la fórmula:

E-F, en donde:

E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Gln, o L-Gln; y

F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatine-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln.

101. El método de la reivindicación 52, en donde dicha enfermedad es enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, acromegalia, tuberculosis, un tumor de pulmón, pecho, cerebro, ojo, próstat o colon; un tumor de origen endocrino; o angiogénesis que causa proliferación inapropiada de los vasos sanguíneos.

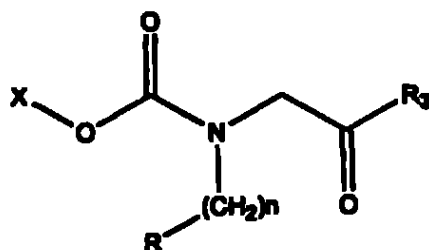
102. El método de la reivindicación 101, en donde dicho tumor de origen endocrino es síndrome carcinoide.

103. El método de la reivindicación 101, en donde dichos vasos sanguíneos están en el ojo.

104. El método de la reivindicación 52, en donde comprende 1 a 20 átomos de carbono.

105. El método de la reivindicación 104, en donde R comprende 1 a 8 átomos de carbono.

106. Un compuesto representado por la siguiente fórmula:



en donde:

X es un agente citotóxico o agente terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde (CH2)_n es sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un

alquilo, alqueno, alquino, cíclico, heterocíclico, aromático, o grupo heteroaromático;

R es N (R₁R₂), OR₁, o SR₁, en donde R₁ y R₂ son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior, y en donde R₃ es un grupo NH(CH₂)_mSH y m = 2 a 6, D o L cisteína, una benzofenona, o un grupo OH.

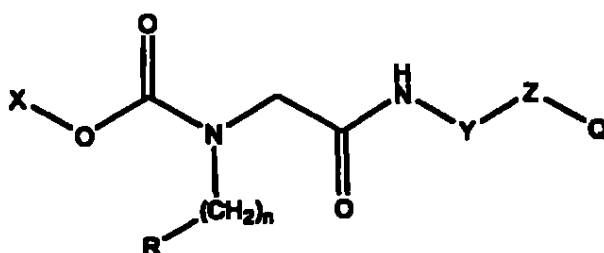
107. El compuesto de la reivindicación 106, en donde el grupo R₃ puede ser usado para unir un péptido, proteína, o anticuerpo a dicho compuesto.

108. El compuesto de la reivindicación 106, en donde R₃ es NH(CH₂)_mSH y m = 2 a 6, y en donde dicho péptido, proteína, o anticuerpo se adhiere a dicho compuesto mediante una reacción tiol.

109. El compuesto de la reivindicación 106, en donde R₃ es una benzofenona y dicho péptido, proteína, o anticuerpo se adhiere a dicho compuesto mediante una reacción fotoquímica.

110. El compuesto de la reivindicación 109, en donde dicha benzofenona es p-benzoil-fenilalanina.

111. Uso de un compuesto conjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, dicho compuesto tiene la fórmula:



en donde:

X es un agente citotóxico o agente terapéutico;

n es un entero de 0 a 6, en donde $(\text{CH}_2)_n$ es sustituido o no sustituido, una cadena recta o ramificada, o es un alquilo, alquenilo, alquinilo, cíclico, heterocíclico, aromático, o grupo heteroaromático;

R es N (R_1R_2) , OR_1 , o SR_1 , en donde R_1 y R_2 son, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo inferior;

Y es una secuencia de espaciador hidrofílica, o es omitido;

Z es a péptido ligador que, cuando se une a Q en terminal N o en un grupo amino de cadena lateral compatible de Q, preserva al menos 50% de actividad biológica de Q, Z que tiene la fórmula:

A-B-C-E-F, en donde:

A es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, o L-Ser, o es suprimido;

B es D-Lys o D-Tyr, o es suprimido;

C es Lys, Ser, hSer, Thr, Nle, Abu, Nva, (2,3, o 4) 3-piridil-Ala (Pal), Orn, Dab, Dap, 4-NH₂-PHE, D-4-OH-Pro, o L-4-OH-Pro, o es suprimido;

E es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatina-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln; y

F es D-Lys, D-Tyr, D-Ser, L-Ser, D-4-OH-Pro, L-4-OH-Pro, 3-yodo-D-Tyr, 3-5 diyodo-D-Tyr, 3-astatine-D-Tyr, 3-5 astatina-D-Tyr, 3-bromo-D-Tyr, 3-5 dibromo-D-Tyr, D-Asn, L-Asn, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Gln, o L-Gln;

Dado que cuando A, B, C, y E son Tyr, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, F no es Lys; y cuando A, B, C, y E son Lys, Tyr, Lys, y Tyr, respectivamente, E no es Tyr o Lys; y cuando A y B son suprimidos, y C y E son Lys y Tyr, respectivamente, F no es Tyr o Lys, y Q es una porción objetivo, o es omitida.

112. El uso de la reivindicación 111, en donde dicha enfermedad es enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, acromegalia, tuberculosis, un tumor del pulmón, pecho, cerebro, ojo, próstata o colon; un tumor de origen neuroendocrino; o angiogenesis que causa proliferación inapropiada de los vasos sanguíneos.

113. El uso de la reivindicación 111, en donde dicho tumor de origen endocrino es síndrome carcinoide.

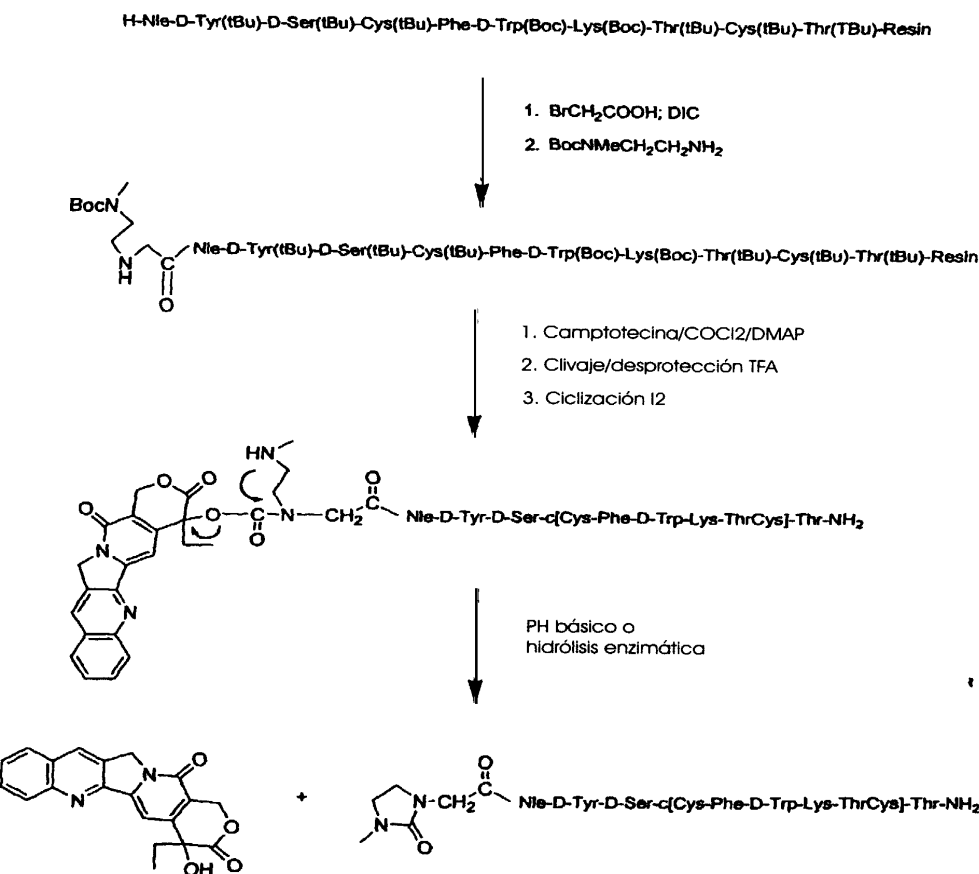
114. El uso de la reivindicación 111, en donde dichos vasos sanguíneos están en el ojo.

**CONJUGADOS DE AGENTES CITOTÓXICOS O TERAPÉUTICOS Y
PÉPTIDOS ACTIVOS BIOLÓGICAMENTE**

Resumen

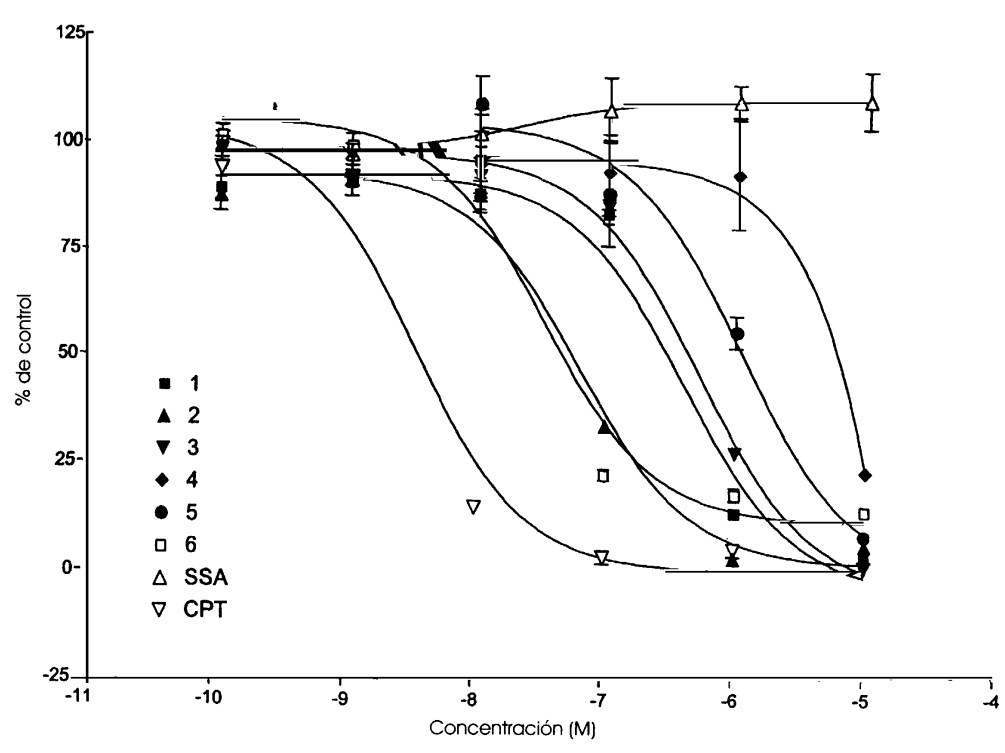
La invención caracteriza conjugados de agentes citotóxicos o terapéuticos y péptidos activos biológicamente y métodos de uso de éstos.

Figura 1



42

Figura 2



233

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04097209 00000000 Folios: 233
Fecha (GND): 2004-09-29 17:27:38
Tramite : 011 PCT-PATENT 279 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 74,332
FECHA : SEPTIEMBRE 20 DE 2004

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32758683	20/09/2004	22,553,000.00

C O N C E P T O

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Ado 11876-841-002-9

234

~~234~~

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de serios pertinentes.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Fecha

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04097209 00000000

Folios: 233

Fecha (AMD): 2004-09-29 17:27:38

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

235

235

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO

Oficio N° 00341

Apoderado(a)
THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND.

ASUNTO:

Radicación N°	04-97209
Solicitud internacional	PCT/US03/06657
Fecha inicio fase nacional	01/10/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
08 OCT. 2004

202044

Sede Central: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

~~1000~~

