

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a nuevos métodos para sintetizar derivados de amanitina que tienen un grupo hidroxilo unido al resto de triptófano central. La invención se refiere además a nuevos derivados de amanitina que tienen un grupo hidroxilo unido a la posición 4', 5' o 7 del resto de triptófano central,
10 a nuevos conjugados de tales derivados de amanitina, y a composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos de 8 aminoácidos que se encuentran en la seta *Amanita phalloides* (véase la **Figura 1**). Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN polimerasa II dependiente de ADN de las células de mamíferos y, por lo tanto, también la transcripción y la
20 biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque no está covalentemente unido, el complejo entre amanitina y ARN-polimerasa II es muy estrecho ($K_D = 3 \text{ nM}$). La disociación de
25 amanitina de la enzima es un proceso muy lento, haciendo que la recuperación de una célula afectada sea poco probable. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado, la célula sufrirá muerte celular programada (apoptosis).

30 El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para la terapia tumoral ya se había explorado en 1981 mediante el

acoplamiento de un anticuerpo anti-Thy 1.2 a la α -amanitina utilizando un enlazador unido al anillo indol de Trp (aminoácido 4; véase la **Figura 1**) mediante diazotación (Davis y Preston, Science 213 (1981) 1385-1388). Davis y Preston
5 identificaron el sitio de unión como la posición 7'. Morris y Venton también demostraron que la sustitución en la posición 7' da como resultado un derivado, que conserva la actividad citotóxica (Morris y Venton, Int. J. Peptide Protein Res. 21 (1983) 419-430).

10

La solicitud de patente EP 1 859 811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describe conjugados, en los que el átomo de C y del aminoácido 1 de amatoxina de la β -amanitina se acopló directamente, es decir, sin una estructura de enlazador,
15 a la albúmina o al anticuerpo monoclonal HEA125, OKT3 o PA-1. Además, se demostró el efecto inhibidor de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7), células de linfoma de Burkitt (Raji) y células de linfoma T (Jurkat). Se sugirió el uso de enlazadores, incluidos
20 enlazadores que comprenden elementos tales como amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos hidrocarbonados y similares, pero realmente no se mostraron tales construcciones, y no proporcionaron más detalles, tales como los sitios de unión en las amatoxinas.

25

Las solicitudes de patente WO 2010/115629 y WO 2010/115630 (ambas publicadas el 14 de octubre de 2010) describen conjugados, en donde los anticuerpos, tales como los anticuerpos anti-EpCAM como el anticuerpo humanizado
30 huFIEA125, están acoplados a las amatoxinas a través de (i) el átomo de C y y del aminoácido de amatoxina 1, (ii) el átomo de

C 6' del aminoácido 4 de amatoxina, o (iii) a través del átomo de C 5 del aminoácido 3 de amatoxina, en cada caso, ya sea directamente o mediante un enlazador entre el anticuerpo y las amatoxinas. Los enlazadores sugeridos comprenden elementos como amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos hidrocarbonados y similares. Además, se demostraron los efectos inhibidores de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (línea celular MCF-7), carcinoma pancreático (línea celular Capan-1), cáncer de colon (línea celular Colo205) y colangiocarcinoma (línea celular OZ).

La solicitud de patente WO 2012/119787 describe que los restos de unión a la diana se pueden unir a las amatoxinas a través de enlazadores en sitios de unión adicionales en el aminoácido triptófano 4, a saber, en las posiciones 1'-N, sin interferencia con la interacción de tales amatoxinas con su diana, la ARN polimerasa II dependiente de ADN de células de mamíferos.

La solicitud de patente WO 2014/009025 describe la síntesis total de derivados de amanitina usando un nuevo sintetizador para γ,δ -dihidroxiisoleucina como uno de los materiales de partida. Además, la solicitud de patente PCT/EP2016/078984 [publicada como el documento WO 2017/089607] describe la síntesis total de derivados de γ -amanitina y ϵ -amanitina usando (2S, 3R, 4S) -L-4-hidroxiisoleucina fácilmente disponible como uno de los materiales de partida. Sin embargo, estos enfoques, y todos los demás enfoques sintéticos total o parcialmente seguidos hasta ahora, están incorporando el resto de triptófano central en el núcleo de la amatoxina utilizando el método según Savige-Fontana. En este

método, se incorpora cis-2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol ("Hpi") en una estructura precursora lineal de amanitina. En una reacción de acoplamiento de Hpi-cisteína catalizada por ácido, se forma el sistema de
5 anillos de amanitina con el resto triptófano central.

Hpi, sin embargo, no posee ningún resto funcional unido al anillo de fenilo del resto de indol de Hpi. Por consiguiente, los productos de amanitina resultantes del método según Savige-
10 Fontana contienen un resto de triptófano central sin ningún sustituyente adicional. La α -amanitina, β -amanitina y γ -amanitina de origen natural, sin embargo, contienen un resto central 6'-hidroxitriptófano, y ese grupo 6'-hidroxilo se ha utilizado con éxito como grupo funcional para la
15 funcionalización de amanitinas, por ejemplo, mediante la unión de restos de direccionamiento, ya sea directamente o mediante enlazadores (véase, por ejemplo, los documentos WO 2010/115629, WO 2010/115630 y WO 2012/041504). Por consiguiente, en el caso de las amanitinas sintéticas, la funcionalización tenía que
20 hacerse a través de (i) el átomo de C γ del aminoácido 1 de amatoxina, o (ii) a través del átomo de C δ del aminoácido 3 de amatoxina, tal como se describió anteriormente, o mediante el átomo de nitrógeno del resto de triptófano, tal como se describe en el documento WO 2012/119787.

25

Se puede obtener Hpi haciendo reaccionar triptófano con ácido peracético o por vía fotoquímica con oxígeno singlete. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito derivados con sustituyentes unidos al anillo de fenilo del resto indol de
30 Hpi.

Si bien el uso de rutas completamente sintéticas para las amatoxinas puede ofrecer una opción para el suministro de grandes cantidades de amatoxinas requeridas para usos terapéuticos, y puede ofrecer la construcción de una variedad de nuevas variantes de amatoxinas mediante el uso de materiales de partida apropiados como bloques de construcción, los enfoques perseguidos en el pasado habían estado limitados por el hecho de que la estructura natural de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, y/o ϵ -amanitina aún no se pudo obtener, dado que el resto 6'-hidroxilo unido al resto de triptófano central en estas amanitinas no pudo incorporarse. Por consiguiente, las opciones para funcionalizar amanitinas sintéticas han estado bastante limitadas hasta ahora. Además, sería muy deseable ampliar la gama de opciones disponibles para la funcionalización, dado que los factores tales como el impedimento estérico y la reactividad pueden tener un fuerte impacto en la reactividad, en la actividad biológica y/o en la estabilidad de las amanitinas sintéticas y de sus conjugados. Sin embargo, la estabilidad y la eficacia de los conjugados que comprenden amanitinas altamente tóxicas son de suma importancia para el uso previsto como moléculas terapéuticas para la administración a seres humanos.

OBJETO DE LA INVENCION

Por consiguiente, todavía existía una gran necesidad de una forma rentable y consistente de sintetizar amatoxinas con un grupo hidroxilo unido al anillo de fenilo del resto de triptófano central. En particular, existe una gran necesidad de identificar los materiales de partida que se podrían usar en la reacción establecida de Savige-Fontana y que se

configuran de manera que puedan provocar la incorporación de tales grupos hidroxilo.

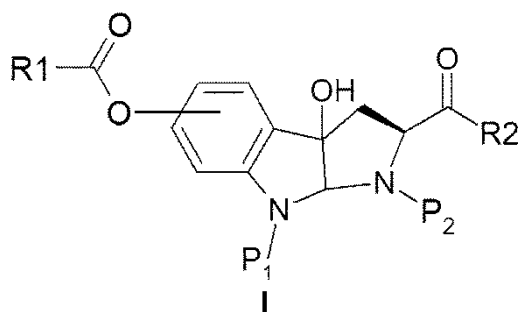
SUMARIO DE LA INVENCION

5

La presente invención se basa en la observación inesperada de que pueden sintetizarse variantes de Hpi que permiten la introducción de grupos hidroxilo durante la síntesis de derivados de amanitina.

10

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un derivado sustituido con hidroxilo de 2-carboxi-3a-hidroxio-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol de acuerdo con la Fórmula I



15

en donde R1 se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido; P1 es hidrógeno o un grupo protector, particularmente un grupo grupo protector seleccionado entre Boc, PhCH₂OCO-, CH₂=CHCH₂O-CO- y tritilo;

20

P2 es hidrógeno o un grupo protector, particularmente un grupo protector, particularmente un grupo grupo protector seleccionado entre Boc, PhCH₂OCO-, CH₂=CHCH₂O-CO- y tritilo; y R2 se selecciona entre OH, OR1 y una cadena de polipéptido que consiste en 1-7 residuos de aminoácidos.

25

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a

un método para la síntesis de un precursor lineal que comprende ocho residuos de aminoácidos de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende la etapa de usar un derivado sustituido con hidroxilo de 2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de cualquiera de la presente invención en la síntesis peptídica de dicho precursor.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la síntesis de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende las etapas de.

(i) provocar o permitir la formación de un enlace entre el residuo de cisteína y el resto triptófano del precursor lineal de la presente invención; y

(ii) provocar o permitir la formación de dicho derivado de amanitina haciendo reaccionar el extremo N del precursor lineal de la presente invención con el extremo C de dicho precursor.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que se selecciona entre (i) S-desoxi-4'-hidroxiamanina, 4'-hidroxiamanina, S-desoxi-5'-hidroxiamanina, 5'-hidroxiamanina, S-desoxi-7'-hidroxiamanina, 7'-hidroxiamanina, (ii) S-desoxi-4'-hidroxiamaninamida, 4'-hidroxiamaninamida, S-desoxi-5'-hidroxiamaninamida, 5'-hidroxiamaninamida, S-desoxi-7'-hidroxiamaninamida y 7'-hidroxiamaninamida, (iii) un derivado de amanitina de acuerdo con (i), en donde el resto de ácido carboxílico libre del aminoácido 1 se convierte en un éster carboxílico ácido carboxílico -C(=O)OR₁ o en un resto -C(=O)NH-OR₁, en donde R₁

se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un
5 conjugado que comprende (a) un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado de la presente invención; (b) un resto de unión a la diana; y (c) opcionalmente un enlazador que une dicho derivado de amanitina y dicho resto de unión a la diana.

10

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la amanitina de la presente invención o el conjugado de la presente invención.

15

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un derivado de amanitina de la presente invención, al conjugado de la presente invención, o a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular, en el que el cáncer se selecciona
20 entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

25

En un octavo aspecto, la invención se refiere a una construcción que comprende (a) un derivado de amanitina de la presente invención; y (b) un resto enlazador que lleva un grupo reactivo Y para unir dicho derivado de amanitina a un resto de
30 unión a la diana.

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

La **Fig. 2** muestra la estructura del compuesto S-desoxi- α -amanitina (HDP 30,0735) y de la α -amanitina.

La **Fig. 3** muestra que Hpi (HDP 30,0079) se genera en una síntesis de una etapa a partir de Boc-L-triptófano.

La **Fig. 4** muestra que el compuesto S-desoxi- α -amanitina (HDP 30,0735) se genera mediante síntesis de péptidos en fase sólida que incorpora el derivado Hpi HDP 30,2555.

La **Fig. 5** muestra la citotoxicidad de S-desoxi- α -amanitina (HDP 30,0735) y S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida HDP 30,2548 en células HEK293 y en células HEK293 OATP1B3.

La **Fig. 6** muestra una construcción basada en S-desoxi- α -amanitina (HDP 30,0735) con un enlazador escindible unido al grupo 6'-hidroxilo y un grupo maleimida terminal como ejemplo de un grupo reactivo Y para unir dicha construcción a un resto de unión a la diana.

La **Fig. 7** muestra una construcción alternativa basada en la S-desoxi- α -amanitina (HDP 30,0735) con un enlazador

escindible unido al grupo carboxilo del resto de aminoácido 1 y un grupo maleimida terminal como ejemplo de un grupo reactivo Y para unir dicha construcción a un resto de unión a la diana.

5 La **Fig. 8** muestra que el derivado Hpi hidroxilado HDP 30,2536 se genera en una síntesis de múltiples etapas a partir de 5'-hidroxi-L-triptófano.

10 La **Fig. 9** muestra que el compuesto precursor de amanitina HDP 30,2544 se genera mediante síntesis de péptidos en fase sólida que incorpora el derivado Hpi HDP 30,2536.

15 La **Fig. 10** muestra que el compuesto derivado de amanitina HDP 30,2546 se genera mediante el cierre del anillo del precursor de amanitina HDP 30,2544.

20 La **Fig. 11** muestra que el derivado de amanitina HDP 30,2548 (S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida) se genera mediante la eliminación de grupos protectores del derivado de amanitina HDP 30,2546.

25 La **Fig. 12** muestra una construcción basada en el derivado de amanitina HDP 30,2548 (S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida) con un enlazador escindible unido al grupo 5'-hidroxilo y un grupo maleimida terminal como ejemplo de un grupo reactivo Y para unir dicha construcción a un resto de unión a la diana.

30 La **Fig. 13** muestra la citotoxicidad de los CAF HDP 30,2347, HDC 30.2371 y HDP 30,2602 dirigidos a A) HER-2/neu en células SKBR-3 (HER-2/neu +++) y células JIMT-1 (HER-2/neu+), B) células PSMAon LnCap (PSMA+++) y células 22rv1 (PSMA ++)

C) CD19 en células Raji (CD19 +++) y células Nalm-6 (CD19 ++) en comparación con el CAF HDC 30.1699 (que contiene el mismo enlazador escindible que HDP 30,2347, HDP 30,2371 y HDP 30,2602, pero alfa-amanitina en lugar de los derivados de amanitina descritos anteriormente)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención con detalle a continuación, debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, a lo protocolos y a los reactivos descritos en el presente documento, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia.

En particular, los términos utilizados en el presente documento se definen tal como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, el término "comprenden" y sus variantes tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que

implica la inclusión de un elemento, composición o etapa o grupo de elementos o etapas establecido, mientras que cualquier elemento, composición o etapa o grupo de elementos, composiciones o etapas adicional también puede estar presente de manera opcional, incluyendo realizaciones, en las que no está presente un elemento, composición o etapa o grupo de enteros, composiciones o etapas adicional. En tales últimas realizaciones, el término "que comprende" se usa junto a "que consiste en".

10

Se citan varios documentos a lo largo del texto de la presente memoria descriptiva. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones e instrucciones del fabricante, presentación de secuencia con número de registro e GenBank, etc.), ya sea citados anteriormente o a continuación, se incorporan a modo de referencia en su totalidad en la medida de lo posible según la respectiva ley de patentes. No debe interpretarse que nada en el presente documento sea un reconocimiento de que la invención no tenga derecho a antedatar tal divulgación en virtud de una invención anterior.

15

20

25

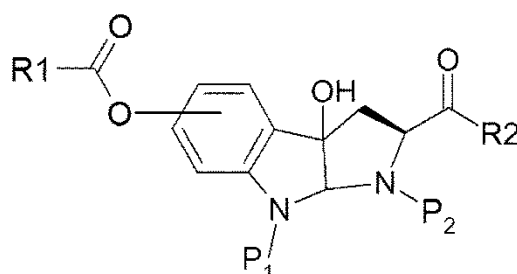
30

La presente invención se describirá en detalle a continuación. En los siguientes párrafos se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La presente invención se basa en la observación inesperada de que pueden sintetizarse variantes de Hpi que permiten la introducción de grupos hidroxilo durante la síntesis de derivados de amanitina.

5

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un derivado sustituido con hidroxilo de 2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol de acuerdo con la Fórmula I



I

10

en donde R1 se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido; P₁ es hidrógeno o un grupo protector;

P₂ es hidrógeno o un grupo protector; y

15

R2 se selecciona entre OH, OR1 y una cadena de polipéptido que consiste en 1-7 residuos de aminoácidos.

En el contexto de la presente invención, el término "grupo protector" se refiere a un grupo que está unido a un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 u 8 del resto hexahidropirrolo[2,3-b]indol central para bloquear la reacción del átomo de nitrógeno con otros reactivos usados para sintetizar y/o para funcionalizar adicionalmente los compuestos de acuerdo con la Fórmula I. Un experto en la materia está bien familiarizado con los diferentes grupos protectores que están disponibles en la técnica y que pueden unirse al

20

25

átomo de nitrógeno correspondiente cuando sea necesario para proteger el átomo de nitrógeno y que se puede escindir posteriormente, cuando ya no se necesita N-protección. En realizaciones particulares, la protección con N usa un reactivo N-acilante. Por lo tanto, en tales realizaciones, P1 y/o P2 son grupos acilo. En otras realizaciones particulares, la protección con N usa un reactivo N-alquilante. Por lo tanto, en tales realizaciones, P1 y/o P2 es un grupo alquilo.

10 En realizaciones particulares, el grupo protector P1 o P2, cuando está presente, se selecciona independientemente entre Boc, $\text{PhCH}_2\text{OCO}-$, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}-\text{CO}-$ y tritilo.

En una realización particular, el grupo hidroxilo en la posición 3a y el átomo de hidrógeno en la posición 8a están en configuración *cis* con respecto al grupo funcional unido a la posición 2. En otra realización particular, el grupo hidroxilo en posición 3a y el átomo de hidrógeno en la posición 8a están en configuración *trans* con respecto al grupo funcional unido a la posición 2. En una realización particular, el derivado sustituido con amino de acuerdo con la presente invención es una mezcla de compuestos con configuración *cis* y *trans*.

En una realización particular, el sustituyente R1-C(=O)-O- se une a la posición 4 en la Fórmula I.

En una realización particular, el sustituyente R1-C(=O)-O- se une a la posición 5 en la Fórmula I.

30 En una realización particular, el sustituyente R1-C(=O)-O- se une a la posición 6 en la Fórmula I.

En una realización particular, el sustituyente R1-C(=O)-O- se une a la posición 7 en la Fórmula I.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de un precursor lineal que comprende ocho residuos de aminoácidos de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende la etapa de usar un derivado sustituido con hidroxilo de 2-carboxi-3a-hidroxil-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol de la presente invención en la síntesis de péptidos de dicho precursor.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para la síntesis de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende las etapas de.

- (i) provocar o permitir la formación de un enlace entre el residuo de cisteína y el resto triptófano del precursor lineal de la presente invención; y
- (ii) provocar o permitir la formación de dicho derivado de amanitina haciendo reaccionar el extremo N del precursor lineal de la presente invención con el extremo C de dicho precursor.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a precursores individuales de amanitina sintetizados como se muestra en los ejemplos, en particular los compuestos HDP 30,2569, HDP 30,2572 y los intermediarios basados en fase sólida sintetizados de acuerdo con [00145].

En una realización particular, el método de la presente

invención comprende además la oxidación del átomo de azufre del resto cisteína para formar un sulfóxido o una sulfona, particularmente un sulfóxido.

5 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que se selecciona entre (i) S-desoxi-4'-hidroxi-amanina, 4'-hidroxi-amanina, S-desoxi-5'-hidroxi-amanina, 5'-hidroxi-amanina, S-desoxi-7'-hidroxi-amanina, 7'-hidroxi-amanina, (ii) S-desoxi-4'-hidroxi-amaninamida, 4'-hidroxi-amaninamida, S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida, 5'-hidroxi-amaninamida, S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida y 7'-hidroxiamaninamida, (iii) un derivado de amanitina de acuerdo con (i), en donde el resto de ácido carboxílico libre del
10 aminoácido 1 se convierte en un éster carboxílico -C(=O)OR₁ o en un resto -C(=O)NH-OR₁, en donde R₁ se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido.
15

20 En una realización particular, el derivado de amanitina de la presente invención se selecciona entre S-desoxi-5'-hidroxi-amanina, 5'-hidroxi-amanina, S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida y 5'-hidroxi-amaninamida.

25 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende (a) un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado de la presente invención; (b) un resto de unión a la diana; y (c) opcionalmente un enlazador que une dicho derivado de amanitina y dicho resto
30 de unión a la diana.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la amanitina de la presente invención o el conjugado de la presente invención.

5 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un derivado de amanitina de la presente invención, al conjugado de la presente invención, o a la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular, en el que el cáncer se selecciona
10 entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

15

En un octavo aspecto, la invención se refiere a una construcción que comprende (a) un derivado de amanitina de la presente invención; y (b) un resto enlazador que lleva un grupo reactivo Y para unir dicho derivado de amanitina a un resto de
20 unión a la diana.

En el contexto de la presente invención, el término "amanitina" se refiere a un grupo particular de amatoxinas. En el contexto de la presente invención, el término "amatoxina"
25 incluye todos los péptidos cíclicos compuestos de 8 aminoácidos aislados del género Amanita y descritos en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., CRC Crit Rev Biochem. 5 (1978) 185-260). En el contexto de la presente invención, el término "amanitinas" se refiere a la estructura bicíclica que
30 se basa en un ácido aspártico o en un resto de asparagina en la posición 1, un resto de prolina, particularmente un resto

de hidroxiprolina en la posición 2, una isoleucina, hidroxiisoleucina o dihidroxiisoleucina en la posición 3, un resto de hidroxitriptófano en la posición 4, restos de glicina en las posiciones 5 y 7, un resto de isoleucina en la posición 6 y un resto de cisteína en la posición 8, en particular, un derivado de cisteína que se oxida a un derivado de sulfóxido o sulfona (para la numeración y ejemplos representativos de amanitinas, véase la Figura 1), y además incluye todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos contruidos a partir de bloques de construcción de acuerdo con la estructura maestra de los compuestos naturales (cíclica, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en lugar de los aminoácidos hidroxilados (siempre que haya al menos un grupo hidroxilo presente en el anillo de fenilo del resto de triptófano), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos, en cada caso en el que cualquiera de estos derivados o análogos es funcionalmente activo inhibiendo la ARN polimerasa II de mamífero.

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, la expresión "ocho restos de aminoácidos de un derivado de amanitina" se refiere a los aminoácidos específicos que forman la estructura del polipéptido de amanitina bicíclica.

Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben la ARN polimerasa II de mamíferos. Las amatoxinas preferidas son aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico o un derivado de ácido

carboxílico tal como una carboxamida o ácido hidroxámico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo de captura de tiol) que se puede hacer reaccionar con moléculas enlazadoras o restos de unión a diana como se definió
5 anteriormente. Las amatoxinas que son particularmente adecuadas para los conjugados de la presente invención son variantes di-desoxi de α -amanitina, β -amanitina, γ -amanitina, ϵ -amanitina, amanulina, o ácido amanulínico, o variantes mono-desoxi de amanina, amaninamida, γ -amanina o γ -amaninamida como
10 se muestra en la Fig. 1, así como sales, derivados químicos, análogos semisintéticos y análogos sintéticos de los mismos.

En una realización particular, el derivado sustituido con hidroxilo, el derivado de amanitina que comprende un resto de
15 triptófano hidroxilado y/o el conjugado de la presente invención tienen/tiene una pureza superior al 90 %, en particular superior al 95 %, más en particular superior al 98 %, o incluso más del 99 %.

20 En el contexto de la presente invención, el término "pureza" se refiere a la cantidad total de, por ejemplo, los conjugados que están presentes. Una pureza superior al 90 %, por ejemplo, significa que en 1 mg de una composición que comprende un conjugado de la presente invención, hay más del
25 90 %, es decir, más de 900 μ g, de dicho conjugado. La parte restante, es decir, las impurezas pueden incluir material de partida sin reaccionar y otros reactivos, disolventes, productos de escisión y/o productos secundarios.

30 En una realización particular, una composición que comprende el derivado sustituido con hidroxilo, el derivado de

amanitina que comprende un resto de triptófano hidroxilado, y/o el conjugado de la presente invención comprende más de 100 mg, en particular más de 500 mg, y más particularmente más de 1 g de dicho derivado sustituido con hidroxilo, derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado y/o conjugado. Por consiguiente, se excluye explícitamente la cantidad traza de, por ejemplo, un conjugado de la presente invención que posiblemente pueda estar presente en preparaciones complejas de conjugados de la técnica anterior.

10

La expresión "resto de unión a diana", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que puede unirse específicamente a una molécula diana o epítipo diana. Los restos de unión a diana preferidos en el contexto de la presente solicitud son (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; (ii) proteínas de tipo anticuerpo; y (iii) aptámeros de ácido nucleico. Los "restos de unión a diana" adecuados para su uso en la presente invención tienen típicamente una masa molecular de 40.000 Da (40 kDa) o más.

20

Tal como se usa en el presente documento, se considera que un primer compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) "se une específicamente" a un segundo compuesto (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína diana), si tiene una constante de disociación K_D con dicho segundo compuesto de 100 μM o menos, particularmente 50 μM o menos, particularmente 30 μM o menos, particularmente 20 μM o menos, particularmente 10 μM o menos, particularmente 5 μM o menos, más particularmente 1 μM o menos, más particularmente 900 nM o menos, más particularmente 800 nM o menos, más particularmente 700 nM o menos, más

25

30

particularmente 600 nM o menos, más particularmente 500 nM o menos, más particularmente 400 nM o menos, más particularmente 300 nM o menos, más particularmente 200 nM o menos, incluso más particularmente 100 nM o menos, incluso más particularmente 90 nM o menos, incluso más particularmente 80 nM o menos, incluso más particularmente 70 nM o menos, incluso más particularmente 60 nM o menos, incluso más particularmente 50 nM o menos, incluso más particularmente 40 nM o menos, incluso más particularmente 30 nM o menos, incluso más particularmente 20 nM o menos, e incluso más particularmente 10 nM o menos.

En el contexto de la presente solicitud, los términos "molécula diana" y "epítopo diana", respectivamente, se refieren a un antígeno y un epítopo de un antígeno, respectivamente, que está específicamente unido por un resto de unión a diana. En particular, la molécula diana es un antígeno asociado a tumor, en particular, un antígeno o un epítopo que está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales en una concentración aumentada y/o en una configuración estérica diferente en comparación con la superficie de las células no tumorales. En particular, dicho antígeno o epítopo está presente en la superficie de uno o más tipos de células tumorales, pero no en la superficie de las células no tumorales. En realizaciones particulares, el resto de unión a diana se une específicamente a un epítopo de un antígeno seleccionado de: PSMA, CD19, CD269, sialil Lewis^a, HER-2/neu y molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM). En otras realizaciones, dicho antígeno o epítopo se expresa preferentemente en células implicadas en enfermedades autoinmunes. En dichas realizaciones concretas, el resto de unión a diana se une específicamente a un epítopo del receptor

de IL-6 (IL-6R).

La expresión "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo", tal como se usa en el presente documento, se refiere

5 a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Por consiguiente, la expresión "fragmentos de unión a antígeno del mismo" se refiere

10 a un fragmento de un anticuerpo que comprende al menos un dominio de unión a antígeno funcional. También se incluyen proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, la presentación en fagos para unirse específicamente a una molécula diana, por ejemplo,

15 a una proteína diana seleccionada de: PSMA, CD19, CD269, sialil Lewis^a, HER-2/neu y EpCAM. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de

20 inmunoglobulina. "Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno adecuados para su uso en la presente invención" incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados (en particular

25 injertados con CDR), desinmunizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, díacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90 (1993) 6444-8), nanocuerpos,

30 anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención) y

fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humano de la presente invención e incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv con enlaces disulfuro (sdFv), y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender el dominio o los dominios variables solos o combinados con la totalidad o una parte de lo siguiente: la región de bisagra, los dominios CL, CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de dominio(s) variable(s) con una región de bisagra, los dominios CL, CH1, CH2 y CH3.

Los anticuerpos utilizables en la invención pueden ser originarios de cualquier animal, aves y mamíferos incluidos. En particular, los anticuerpos son de origen humano, de roedor (por ejemplo, ratón, rata, cobaya o conejo), pollo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro. Se prefiere particularmente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Tal como se usa en el presente documento, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N.º 5.939.598 de Kucherlapati y Jakobovits.

La expresión "proteína similar a un anticuerpo" se refiere a una proteína que ha sido diseñada genéticamente (por ejemplo, por mutagénesis de bucles) para su unión específica a una molécula diana. Normalmente, dicha proteína similar a un anticuerpo comprende al menos un bucle de péptido variable unido en ambos extremos a un armazón proteico. Esta restricción estructural doble aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína similar a un anticuerpo a niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle de péptido variable normalmente consiste en 10 a 20 aminoácidos. El armazón proteico puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. En particular, el armazón proteico es una proteína globular pequeña. Las proteínas similares a anticuerpos incluyen, sin limitación, aficuerpos, anticalinas y proteínas repetidas de anquirina diseñadas (para revisión, véase: Binz et al., Nat Biotechnol. 2005, 1257-68). Las proteínas similares a anticuerpos pueden provenir de grandes bibliotecas de mutantes, por ejemplo, pueden seleccionarse de grandes bibliotecas de presentación en fagos y se pueden aislar en analogía con anticuerpos regulares. También, las proteínas de unión similares a anticuerpos se pueden obtener mediante mutagénesis combinatoria de restos expuestos a la superficie en proteínas globulares.

La expresión "aptámero de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido diseñada mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a una molécula diana (para una revisión, véase: Brody y Gold, J Biotechnol. 74 (2000) 5-13). El aptámero de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. Los aptámeros

pueden contener modificaciones, por ejemplo, nucleótidos modificados tales como pirimidinas sustituidas con flúor en 2'.

5 Un "enlazador" en el contexto de la presente invención se refiere a una estructura que está conectando dos componentes, cada uno de los cuales está unido a un extremo del enlazador. En el caso de que el enlazador sea un enlace, un enlace directo de amatoxina al anticuerpo puede disminuir la capacidad de la

10 amatoxina para interactuar con la ARN polimerasa II. En realizaciones particulares, el enlazador aumenta la distancia entre dos componentes y alivia la interferencia estérica entre estos componentes, como en el caso presente entre el anticuerpo y la amatoxina. En realizaciones particulares, el enlazador

15 tiene una cadena continua de entre 1 y 30 átomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos) en su estructura principal, es decir, la longitud del enlazador se define como la conexión más corta medida por el número de

20 átomos o enlaces entre el resto de amatoxina y el anticuerpo, en el que un lado de la cadena principal del enlazador ha reaccionado con la amatoxina y el otro lado está disponible para la reacción, o ha reaccionado, con un anticuerpo. En el contexto de la presente invención, un enlazador particularmente

25 es un grupo alquileo C_{1-20} -alquileo, heteroalquileo C_{1-20} , alquilenilo C_{2-20} , heteroalquilenilo C_{2-20} , alquinileno C_{2-20} , heteroalquinileno C_{2-20} , cicloalquileo, heterocicloalquileo, arileno, heteroarileno, aralquileo o un heteroaralquileo, opcionalmente sustituido. El enlazador puede contener uno o

30 más elementos estructurales, tales como carboxamida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos de hidrocarburo

y similares. El enlazador también puede contener combinaciones de dos o más de estos elementos estructurales. Cada uno de estos elementos estructurales puede estar presente en el enlazador más de una vez, por ejemplo dos veces, tres veces, 5 cuatro veces, cinco veces o seis veces. En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender un enlace disulfuro. Se entiende que el enlazador debe estar unido ya sea en una sola etapa o en dos o más etapas posteriores a la amatoxina y al anticuerpo. Para ese fin, el enlazador tendrá 10 dos grupos, particularmente en un extremo proximal y distal, que pueden (i) formar un enlace covalente a un grupo presente en uno de los componentes a unir, particularmente un grupo activado en una amatoxina o el péptido de unión al objetivo o (ii) que se activa o puede activarse para formar un enlace 15 covalente con un grupo en una amatoxina. Por consiguiente, se prefiere que los grupos químicos estén en el extremo distal y proximal del enlazador, que son el resultado de tal reacción de acoplamiento, por ejemplo un ester, un éter, un uretano, un enlace peptídico etc.

20

En realizaciones particulares, el enlazador L es una cadena lineal de entre 1 y 20 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, particularmente de entre 2 y 18 átomos, más particularmente de entre 5 y 16 átomos e 25 incluso más particularmente de entre 6 y 15 átomos. En realizaciones particulares, al menos el 60 % de los átomos en la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos en la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

30

En realizaciones particulares, el enlazador L es grupo un

alquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, cicloalquilenos, heterocicloalquilenos, arilenos, heteroarilenos, aralquilenos o un a heteroaralquilenos, que comprende de 1 a 4 heteroátomos
5 seleccionados entre N, O y S, en donde dicho enlazador está opcionalmente sustituido.

El término "alquilenos" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal bivalente que tiene de 1 a 20 átomos
10 de carbono, que incluye grupos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, los grupos alquilenos pueden ser grupos alquilenos inferiores. La expresión "alquilenos inferior" se refiere a grupos alquilenos que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, y en ciertas realizaciones de 1 a 5 o de 1
15 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilenos incluyen, pero sin limitación, metileno ($-\text{CH}_2-$), etileno ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), n-propileno, n-butileno, n-pentileno y n-hexileno.

El término "alquilenos" se refiere a grupos de cadena
20 lineal bivalente que tienen de 2 a 20 átomos de carbono, en donde al menos uno de los enlaces carbono-carbono es un doble enlace, mientras que otros enlaces pueden ser enlaces simples o enlaces dobles adicionales. El término "alquilenos" en el presente documento se refiere a grupos que tienen 2 to 20
25 átomos de carbono, en donde al menos uno de los enlaces carbono-carbono es un triple enlace, mientras que otros enlaces pueden ser enlaces simples, dobles o triples. Ejemplos de grupos alquilenos incluyen etenileno ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 1-propenileno, 2-propenileno, 1-butenileno, 2-butenileno, 3-butenileno y
30 similares. Ejemplos de grupos alquilenos incluyen etinileno, 1-propinileno, 2-propinileno y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquileno" se refiere a un anillo bivalente que forma parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, y donde dicho anillo está completamente saturado, y el término "cicloalquenileno" está destinado a referirse a un anillo bivalente que es parte de cualquier sistema monocíclico o policíclico estable, donde dicho anillo tiene entre 3 y 12 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, y donde dicho anillo está al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno). Ejemplos de cicloalquilenos incluyen, pero sin limitación, ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno y cicloheptileno. Ejemplos de cicloalquenilenos incluyen, pero sin limitación, ciclopentenileno y ciclohexenileno.

Como se usa en el presente documento, los términos "heterocicloalquileno" y "heterocicloalquenileno" se refieren a un anillo bivalente que forma parte de cualquier sistema de anillo monocíclico o policíclico estable, donde tal anillo tiene entre 3 y aproximadamente 12 átomos, y donde tal anillo consiste en átomos de carbono y al menos un heteroátomo, particularmente al menos un heteroátomo seleccionado independientemente del grupo que consiste en N, O y S, con heterocicloalquileno que se refiere a dicho anillo que está completamente saturado, y heterocicloalquenileno que se refiere a un anillo que es al menos parcialmente insaturado (pero excluyendo cualquier anillo de arileno o heteroarileno).

El término "arileno" pretende significar un anillo bivalente o sistema de anillo que es parte de cualquier sistema

monocíclico o policíclico estable, donde tal anillo o sistema de anillo tiene entre 3 y 20 átomos de carbono, pero no tiene heteroátomo, cuyo anillo o sistema de anillo consiste en un resto aromático como se define por la regla del electrón π "4n+2", incluido el fenileno.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarileno" se refiere a un anillo o sistema de anillo bivalente que forma parte de cualquier sistema mono o policíclico estable, donde dicho anillo o sistema de anillo tiene entre 3 y 20 átomos, cuyo anillo o sistema de anillo consiste en un resto aromático como se define por la regla del electrón π "4n + 2" y contiene átomos de carbono y uno o más heteroátomos de nitrógeno, azufre y/u oxígeno.

En el contexto de la presente invención, el término "sustituido" pretende indicar que uno o más hidrógenos presentes en el esqueleto de un enlazador se reemplazan con una selección del grupo o grupos indicados, siempre que la valencia normal del átomo indicado, o la del átomo apropiado del grupo que está sustituido, no se supera, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable. La expresión "opcionalmente sustituido" pretende significar que el enlazador no está sustituido o está sustituido, como se define en el presente documento, con uno o más sustituyentes, como se define en el presente documento. Cuando un sustituyente es un grupo ceto (u oxo, es decir =O), un grupo tio o imino o similar, después, se reemplazan dos hidrógenos en el átomo del esqueleto del enlazador. Los sustituyentes de ejemplo incluyen, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo,

heteroaralquilo, acilo, aroílo, heteroaróilo, carboxilo, alcoxí, ariloxi, aciloxi, aroiloxi, heteroaroiloxi, alcóxicarbonilo, halógeno, (tio)éster, ciano, fosforilo, amino, imino, (tio)amido, sulfhidrilo, alquiltio, aciltio, sulfonilo, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoílo, un sulfonamido, nitro, azido, haloalquilo, incluyendo perfluoroalquilo (tal como trifluorometilo), haloalcoxí, alquilsulfanilo, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonoamino, fosforilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, alquilcarboxi, alquilcarboxiamida, oxo, hidroxí, mercapto, amino (opcionalmente mono- o disustituido, por ejemplo, por alquilo, arilo o heteroarilo), imino, carboxamida, carbamoílo (opcionalmente mono- o disustituido, por ejemplo, por alquilo, arilo o heteroarilo), amidino, aminosulfonilo, acilamino, aroilamino, (tio)ureido, (ariltio)ureido, alquil(tio)ureido, cicloalquil(tio)ureido, ariloxi, aralcoxí u $-O(CH_2)_n-OH$, $-O(CH_2)_n-NH_2$, $-O(CH_2)_nCOOH$, $-(CH_2)_nCOOH$, $-C(O)O(CH_2)_nR$, $-(CH_2)_nN(H)C(O)OR$ o $-N(R)S(O)_2R$ en donde n es 1-4 y R se selecciona independientemente entre hidrógeno, -alquilo, -alquenilo, -alquinilo, -cicloalquilo, -cicloalquenilo, -(heterocicloalquilo unido a C), -(heterocicloalquenilo unido a C), -arilo y -heteroarilo, con múltiples grados de sustitución permitidos. Los expertos en la materia entenderán que los sustituyentes, tales como heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquilo, etc., o grupos funcionales tales como -OH, -NHR etc., pueden sustituirse ellos mismos, si es apropiado. Los expertos en la materia también entenderán que los restos sustituidos pueden sustituirse también cuando sea apropiado.

En realizaciones particulares, el enlazador L comprende

un resto seleccionado entre uno de los siguientes restos: un disulfuro (-S-S-), un éter (-O-), un tioéter (-S-), una amina (-NH-), un éster (-O-C(=O)- o -C(=O)-O-), un carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un uretano (-NH-C(=O)-O- o -O-C(=O)-NH-) y un resto de urea (-NH-C(=O)-NH-).

En realizaciones particulares de la presente invención, el enlazador L comprende varios grupos m seleccionados de la lista de: grupo alquilenos, alquenilenos, alquinilenos, cicloalquilenos, heteroalquilenos, heteroalquenilenos, heteroalquinilenos, heterocicloalquilenos, arilenos, heteroarilenos, aralquilenos y un heteroaralquilenos, en donde cada grupo puede opcionalmente sustituirse independientemente, el enlazador comprende además una cantidad de n restos seleccionados independientemente de uno de los siguientes restos: un disulfuro (-S-S-), un éter (-O-), un tioéter (-S-), una amina (-NH-), un éster (-O-C(=O)- o -C(=O)-O-), un carboxamida (-NH-C(=O)- o -C(=O)-NH-), un uretano (-NH-C(=O)-O- o -O-C(=O)-NH-) y un resto de urea (-NH-C(=O)-NH-), en donde $m = n+1$. En realizaciones particulares, m es 2 y n es 1, o m es 3 y n es 2. En realizaciones particulares, el enlazador comprende 2 o 3 grupos alquilenos sin sustituir, y 1 o 2, respectivamente, disulfuro, éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, uretano o restos de urea que unen los grupos alquilenos sin sustituir.

En una realización particular, el enlazador L no comprende un grupo heteroarileno.

En realizaciones particulares, los átomos de C en la cadena lineal son independientemente parte de grupos metileno

opcionalmente sustituidos ($-\text{CH}_2-$). En tales realizaciones particulares, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente entre halógeno y alquilo C_{1-6} , particularmente metilo.

5

En realizaciones particulares, el enlazador L es un enlazador estable.

En el contexto de la presente invención, la expresión
10 "enlazador estable" se refiere a un enlazador que es estable (i) en presencia de enzimas y (ii) en un entorno reductor intracelular.

En realizaciones particulares, el enlazador estable no
15 contiene (i) una subestructura escindible por enzimas, y/o (ii) un grupo disulfuro. En tales realizaciones particulares, el enlazador tiene una longitud de hasta 12 átomos, particularmente entre 2 a 10, más particularmente entre 4 a 9 y lo más particularmente entre 6 a 8 átomos.

20

En otras realizaciones particulares, el enlazador es un enlazador escindible.

En el contexto de la presente invención, la expresión
25 "enlazador escindible" se refiere a un enlazador que es (i) escindible por una enzima, o (ii) un enlazador reducible. En realizaciones particulares, el término solo se refiere a un enlazador que es escindible por una enzima (no a un enlazador reducible).

30

En el contexto de la presente invención, la expresión

"enlazador que es escindible ... por una enzima" se refiere a un enlazador que puede ser escindido por una enzima, particularmente por una peptidasa lisosómica, tal como la Catepsina B, dando como resultado la liberación intracelular

5 de la carga de toxina conjugada con el anticuerpo objetivo después de la internalización (véase Dubowchik et al., Bioconjug Chem. 13 (2002) 855-69). En realizaciones

particulares, el enlazador escindible comprende un dipéptido seleccionado entre: Phe-Lys, Val-Lys, Phe-Ala, Val-Ala, Phe-

10 Cit y Val-Cit, particularmente en donde el enlazador escindible comprende además un separador de p-aminobencilo (PAB) entre los dipéptidos y la amatoxina.

En tales realizaciones particulares, el enlazador

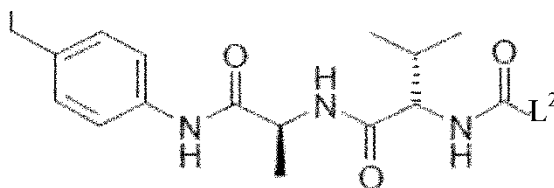
15 escindible comprende una estructura $L^1-L^*-L^2$, en donde L^* es un resto dipéptido de p-aminobencilo, L^1 es una parte del enlazador que conecta L^* a la amatoxina, en particular, en donde L^1 está conectado a L^* a través de un grupo $-NH-$ u $-O-$, particularmente un grupo $-C(=O)-NH-$, un $-C(=O)-NH-O-$ o un $-$

20 $C(=O)-O-$, y en donde L^2 es una parte del enlazador que conecta L^* al resto de unión al objetivo, in particular en donde L^2 se conecta a L^* a través de un resto $-(CH_2)_m-$, siendo m un número entero seleccionado del 1 al 8, en particular del 1 al 5, o mediante un resto $-(CH_2-CH_2O)_n-$, siendo n un número entero

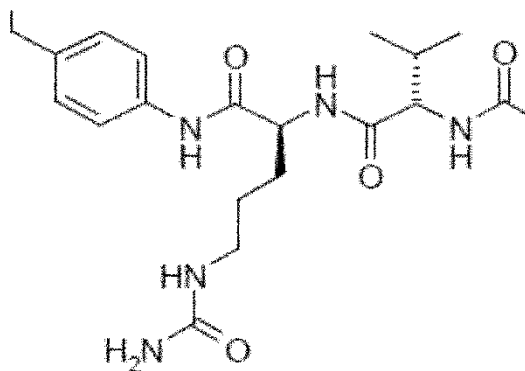
25 seleccionado del 1 al 3, en particular del 1 al 2. Por ejemplo, en el caso del enlazador escindible que comprende el dipéptido Val-Ala, la estructura de $L^1-L^*-L^2$ es como sigue a continuación:

$$L^1$$

34

 $L^1-L^*-L^2$

En particular otras realizaciones de este tipo, L^* comprende el dipéptido Val-Lys y tiene la siguiente estructura:

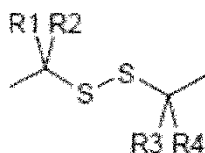


- 5 En realizaciones particulares, el enlazador L^1 es una cadena lineal de entre 1 y 4 átomos seleccionados independientemente entre C, O, N y S, particularmente de entre 1 y 3 átomos, más particularmente entre 1 y 2 átomos e incluso más, solo 1 átomo. En realizaciones particulares, al menos el
- 10 50 % de los átomos en la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos en la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

- En una realización particular, L^1 es un grupo $-NH-$ u $-O-$ que
- 15 forma parte de la amatoxina. En realizaciones particulares, L^1 es un grupo $-O-$ que se origina a partir de un grupo hidroxilo unido a la posición 4', 5', 6' o 7' del resto triptófano central. En realizaciones particulares, L^1 es un grupo $-O-$ que se origina en el grupo hidroxilo que forma parte del grupo
- 20 ácido carboxílico del residuo de aminoácido 1 de un derivado de amanina de acuerdo con la presente invención. En realizaciones particulares, L^1 es un grupo $-NH-$ que se origina en el grupo amino que forma parte del grupo carboxamida del

residuo de aminoácido 1 de un derivado de amaninamida de acuerdo con la presente invención. En realizaciones particulares, L¹ es un grupo -O- que se origina a partir de un grupo hidroxilo que forma parte del residuo de aminoácido 3 de un derivado de amanina o amaninamida de acuerdo con la presente invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión "enlazador reducible" se refiere a un enlazador que puede escindirse en el entorno reductor intracelular, particularmente un enlazador que contiene grupos disulfuro, lo que da como resultado la liberación intracelular de la carga de toxina conjugada con el resto de unión al objetivo después de la internalización por el intracelular entorno reductor (véase Shen et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 10905-10908). En realizaciones particulares, el enlazador reducible comprende un resto



en donde R1 a R4 se seleccionan independientemente entre H y metilo.

En tales realizaciones particulares, tal enlazador escindible tiene una longitud de hasta 20 átomos, particularmente entre 6 a 18, más particularmente entre 8 a 16 y lo más particularmente entre 10 a 15 átomos. En tales realizaciones particulares, la parte del enlazador que une la amatoxina de acuerdo con la presente invención y el grupo disulfuro escindible es una cadena lineal de 3 o 4 átomos de C, particularmente 3 átomos de C. En realizaciones

particulares, los 3 o 4 átomos de C en la cadena lineal están unidos por enlaces simples. En realizaciones particulares, el enlazador es un grupo n-propileno.

- 5 En realizaciones particulares, dicho enlazador está presente y está conectado en un lado al grupo hidroxilo unido al anillo de fenilo del resto triptófano central, es decir, a un sustituyente hidroxilo de 4', 5' o 7'.
- 10 En otras realizaciones particulares, dicho enlazador está presente y está conectado por un lado a una posición en el derivado de amanitina de la presente invención, en donde dicha posición se selecciona entre
- (i) en el caso de S-desoxi-4'-hidroxi-amaninamida, 4'-
 15 hidroxi-amaninamida, S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida, 5'-hidroxi-amaninamida, S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida y 7'-hidroxi-amaninamida, el átomo de nitrógeno del grupo carboxamida en el átomo y C del aminoácido amatoxina 1 (enlace amida);
- 20 (ii) en el caso de S-desoxi-4'-hidroxi-amanina, 4'-hidroxi-amanina, S-desoxi-5'-hidroxi-amanina, 5'-hidroxi-amanina, S-desoxi-7'-hidroxi-amanina, 7'-hidroxi-amanina, el átomo de oxígeno del grupo ácido en el átomo y C del aminoácido amatoxina 1 (enlace éster);
- 25 (iii) en el caso de un derivado de la amanitina de la presente invención, en donde el resto de ácido carboxílico libre del aminoácido 1 se ha convertido en un resto $-C(=O)NH-OR_1$, el átomo de oxígeno del grupo ácido hidroxámico en el átomo y C del aminoácido amatoxina 1;
- 30 (iv) el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo en el átomo de C δ del aminoácido 3 de amatoxina, particularmente a través de

un enlace éster, un enlace éter o un enlace uretano; o

(v) el nitrógeno del anillo del aminoácido 4.

El acoplamiento del enlazador al resto de unión al
 5 objetivo puede lograrse mediante una variedad de métodos bien
 conocidos por un experto en la materia, particularmente en la
 técnica de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC).

En realizaciones particulares, dicho enlazador está
 10 conectado al resto de unión al objetivo a través de un resto
 de urea (...-enlazador-NH-C(=O)-NH-resto de unión al
 objetivo). En tales realizaciones particulares, el resto de
 urea resulta de una reacción de una amina primaria
 originalmente presente en el resto de unión al objetivo, tal
 15 como un grupo amino de una cadena lateral de lisina, con un
 derivado de ácido carbámico ...-enlazador-NH-C(O)-Z, en donde
 Z es un grupo saliente que puede reemplazarse por una amina
 primaria.

20 En otras realizaciones particulares, dicho enlazador está
 presente y está conectado al resto de unión al objetivo a
 través de un resto de tioéter (...-enlazador-S-resto de unión
 a la diana). Por lo tanto, en tales realizaciones, La presente
 invención se refiere a un conjugado de fórmula genérica:

25
$$\text{Amanitina} - \text{L} - \text{X}^* - \text{S} - \text{Tbm},$$

en donde la Amanitina es un derivado de amanitina de acuerdo
 con la presente invención, L es un enlazador, X* es un resto
 resultante del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo
 reactivo con tiol, S es el átomo de azufre de dicho grupo tiol,
 30 particularmente el grupo tiol de un residuo de aminoácido
 cisteína, y Tbm es un resto de unión al objetivo,

particularmente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo funcional que comprende dicho residuo de aminoácido cisteína. En realizaciones particulares, dicho residuo de aminoácido cisteína (i) está ubicado en un dominio de anticuerpo
5 seleccionado entre CL, CH1, CH2 y CH3; (ii) está ubicado en una posición, donde la secuencia de la línea germinal que exhibe la homología más cercana a la secuencia de dicho dominio de anticuerpo contiene un residuo de aminoácido diferente de la cisteína; y (iii) se encuentra en una posición que está
10 expuesta a disolventes.

En el contexto de la presente invención, la expresión "grupo tiol reactivo" se refiere a un grupo que reacciona selectivamente con el grupo tiol de, por ejemplo, una cisteína
15 libre de un anticuerpo, particularmente en un valor de pH en el intervalo entre 6,0 y 8,0, más particularmente en un valor de pH en el intervalo entre 6,5 y 7,5. En particular, el término "selectivamente" significa que menos del 10 % de las reacciones de acoplamiento de una molécula que comprende un grupo reactivo
20 con tiol con un anticuerpo que comprende al menos un residuo de cisteína libre son reacciones de acoplamiento con residuos del anticuerpo que no son cisteína, tales como residuos de lisina, particularmente menos del 5 %, más particularmente menos del 2 %. En realizaciones particulares, el grupo reactivo
25 con tiol se selecciona entre bromoacetamida, yodoacetamida, maleimida, una maleimida que tiene un grupo saliente en la posición 3, en particular un grupo saliente seleccionado entre -Br, y tiol sustituido (véase, por ejemplo, US 9,295,729), una 1,2-dihidropiridazina-3,6-diona que tienen un grupo saliente
30 en la posición 4, en particular un grupo saliente seleccionado entre -Br, y tiol sustituido (véase, por ejemplo, US

9,295,729), metilsulfonil benzotiazol, metilsulfonil feniltetrazol, metilsulfonil feniloxadiazol (véase Toda et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 52 (2013) 12592-6), un 3-arilpropionitrilo (véase Kolodych et al, Bioconjugate Chem. 5 2015, 26, 197-200), y 5-nitro-piridin-2-il-disulfuro (...-L-S-S-(5-nitropiridin-2-ilo).

En realizaciones particulares, dicha posición o grupo funcional, que está en un lado conectado al enlazador y que 10 puede conectarse directa o indirectamente a una posición o grupo funcional presente en un resto de unión al objetivo es un resto que puede reaccionar con dos grupos tiol presentes en un resto de unión al objetivo o en dos restos de unión al objetivo. En realizaciones particulares, los grupos reactivos 15 con tiol son una maleimida que tiene dos grupos salientes en las posiciones 3 y 4, en particular se selecciona entre 3,4-dibromomaleimida, 3,4-bis(ariltio)-maleimida, en particular 3,4-difeniltio-maleimida y 3,4-bis(heteroariltio)-maleimida, en particular 3,4-bis(2-piridinilsulfanil)-maleimida, y. En 20 otras realizaciones particulares, el grupo tiol reactivo es una 1,2-dihidropiridazina-3,6-diona que tiene dos grupos salientes en las posiciones 4 y 5, en particular seleccionado entre 4,5-bromo-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, 4,5-bis(ariltio)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, en particular 25 4,5-difeniltio-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona y 4,5-bis(heteroariltio)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona, en particular 4,5-bis(2-piridinil-sulfanil)-1,2-dihidropiridazina-3,6-diona.

30 En realizaciones particulares, el resto resultante del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo tiol reactivo se

selecciona entre: acetamida sustituida con tiol; succinimida sustituida con tiol; ácido succinámico sustituido con tiol; heteroarilo sustituido con tiol, particularmente benzotiazol sustituido con tiol, feniltetrazol sustituido con tiol y
 5 feniloxadiazol sustituido con tiol; y un disulfuro, en donde un átomo de azufre se deriva de un residuo de cisteína del anticuerpo. En realizaciones particulares, el resto resultante del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo reactivo con tiol es una succinimida sustituida con tiol.

10

En realizaciones particulares, el enlazador L en el resto L-X*-S presente en la fórmula genérica de la sección [00101], se selecciona entre el siguiente grupo de restos:

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

15 (lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_3\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_3\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_3\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_3\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_4\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_4\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_2\text{-CMe}_2\text{-S-S-}(\text{CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de

20 Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-CMe}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-(\text{CH}_2)_3\text{-S-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NH-Cit-Val-CO(CH}_2)_5\text{-X-S-}$ (lado
 25 de Tbm)

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NH-Ala-Val-CO(CH}_2)_5\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NH-Ala-Val-CO(CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

30 (lado de amanitina) $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NH-Ala-Phe-CO(CH}_2)_2\text{-X-S-}$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Cit}-\text{Phe}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

5 (lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Val}-\text{Val}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Ile}-\text{Val}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

10 (lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{His}-\text{Val}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Met}-\text{Val}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm);

(lado de amanitina) $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{Asn}-\text{Lys}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-\text{X}-\text{S}-$ (lado de Tbm); y

15 en donde $-\text{NH}-$ y $-\text{CO}-$ que flanquean las secuencias de dipéptidos representan restos amino y carbonilo del enlazador que forma enlaces amida con el carboxi- y el terminal amino del dipéptido, respectivamente.

20 En el contexto de la presente invención, la expresión "un resto resultante del acoplamiento de un grupo tiol a un grupo reactivo con tiol" se refiere a una estructura que resulta de

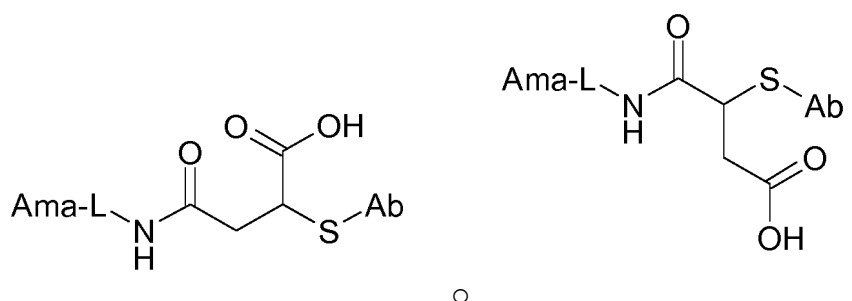
(i) la sustitución nucleófila de un grupo saliente Y presente en un grupo reactivo con tiol por el átomo de azufre de un

25 residuo de cisteína, por ejemplo un grupo bromo acetamida, un yodo acetamida, un grupo 4,6-dicloro-1,3,5-triazin-2-ilamino, una alquilsulfona o una a heteroarilsulfona; (ii) la adición del grupo HS de un residuo de cisteína a un doble enlace activado de un grupo reactivo con tiol, por ejemplo maleimida,

30 o (iii) un intercambio de disulfuro de un disulfuro activado o metanotiosulfonato con el átomo de azufre de un residuo de

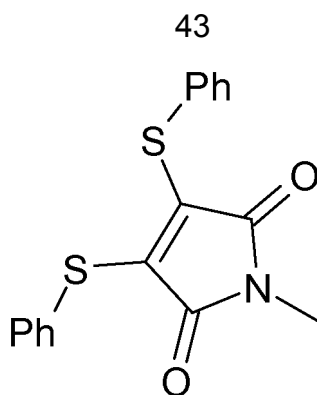
cisteína, por ejemplo con piridin-2-tiol, 5-nitropiridin-2-tiol o metanosulfinato como grupo saliente; o (iv) cualquier otra reacción química que dé como resultado un enlace estable entre el átomo de azufre de un residuo de cisteína y un resto reactivo que forme parte del grupo reactivo con tiol.

El resto primario resultante del acoplamiento del grupo tiol puede opcionalmente derivatizarse adicionalmente, por ejemplo el succinimidil tioéter resultante de una maleimida puede hidrolizarse a tioéteres de ácido succinámico de las siguientes estructuras genéricas



En otras realizaciones particulares, el acoplamiento específico del sitio se puede lograr reduciendo un puente disulfuro presente en el resto de unión al objetivo, y haciendo reaccionar los dos residuos de cisteína con un resto puente X* presente en una construcción Amanitina - L - X* (véase Badescu et al. Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates. Bioconjugate Chemistry. 25 (2014) 1124-1136).

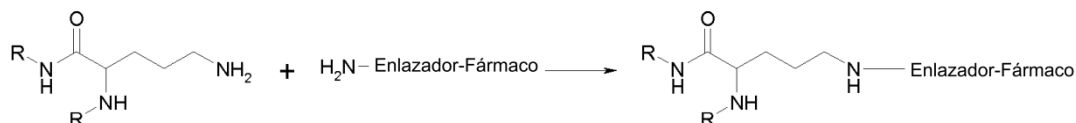
En una realización similar, el acoplamiento específico del sitio puede lograrse reduciendo un puente disulfuro presente en el resto de unión al objetivo, y haciendo reaccionar los dos residuos de cisteína con un resto puente X* presente en una construcción Amanitina - L - X*, particularmente en donde X* es



(véase Bryden et al., Bioconjug Chem, 25 (2014) 611-617; Schumacher et al., Org Biomol Chem, 2014, 12, 7261-7269)

5 En otra realización particular, el acoplamiento se logra mediante el acoplamiento regioespecífico de un grupo amino presente en el enlazador a un residuo de glutamina presente en el resto de unión al objetivo a través de una transaminasa, particularmente por acoplamiento a glutamina Q295 de un anticuerpo.

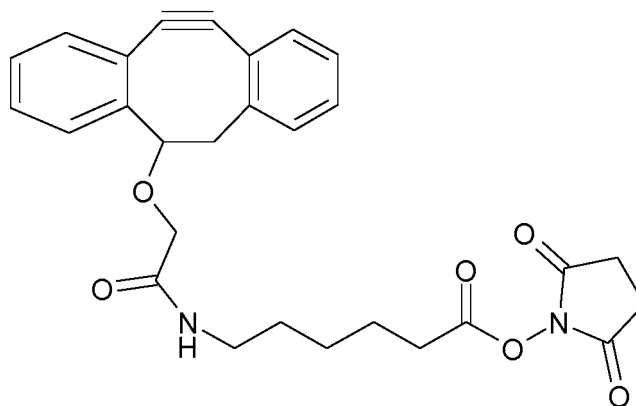
10



En una realización particular, el acoplamiento se logra mediante conjugación específica del sitio a restos de unión al objetivo que comprenden cadenas laterales de N-glucano. En particular, la cadena lateral de N-glucano puede degradarse enzimáticamente, seguido de transglicosilación con una azido-galactosa. Usando química de clic, dicho resto de unión al objetivo modificado se puede acoplar a construcciones apropiadamente modificadas Amanitina - L - X*, en donde X* es, por ejemplo, un dibenzo-ciclooctino (DIBO) o un resto análogo que comprende un triple enlace C-C. Por ejemplo, una construcción de Amanitina -L-NH₂ puede acoplarse a DIBO-SE mediante sustitución nucleófila del resto hidroxí succinimida.

15

20



DIBO-SE

La construcción enlazadora modificada por DIBO resultante se puede acoplar luego al derivado azido mencionado anteriormente. En una realización alternativa, el resto de unión al objetivo

5 puede modificarse mediante la incorporación de un aminoácido no natural que permite la química de clic, en particular mediante la incorporación de una para-azidometil-L-fenilalanina (pAMF).

10 En realizaciones particulares, el enlazador L en - L - X* es una cadena lineal de al menos 5, particularmente al menos 10, más particularmente entre 10 y 20 átomos independientemente seleccionados entre C, O, N y S, particularmente de entre 10 y 18 átomos, más particularmente de entre 10 y 16 átomos e incluso

15 más particularmente de entre 10 y 15 átomos. En realizaciones particulares, al menos el 60 % de los átomos en la cadena lineal son átomos de C. En realizaciones particulares, los átomos en la cadena lineal están unidos por enlaces simples.

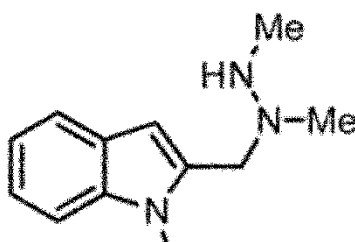
20 En realizaciones alternativas, la posición o grupo funcional, que puede conectarse directa o indirectamente a una posición o grupo funcional presente en un resto de unión al objetivo, no es un grupo etinilo, o, de manera más general, no es un grupo alquinilo, o no es un grupo que pueda reaccionar

25 con un 1,3 dipolo en una cicloadición 1,3-dipolar (química de

clic).

En otras realizaciones particulares, el acoplamiento específico del sitio de una construcción de Amanitina - L - X* a un resto de unión al objetivo se puede lograr mediante la incorporación de un aminoácido no natural que comprende un grupo ceto, en particular p-acetilfenilalanina (pAcPhe), en el resto de unión al objetivo, y haciendo reaccionar dicho resto de unión al objetivo modificado con una construcción Amanitina - L - X*, en donde X* es un resto de hidroxilamina.

En una realización más, puede introducirse un grupo formilo mediante la enzima generadora de formilglicina (FGE), que es altamente selectiva para un grupo cisteína en una secuencia de reconocimiento CxPxR para generar una etiqueta de aldehído. Tal etiqueta de aldehído se puede hacer reaccionar con un grupo apropiado X * presente en una construcción Amanitina - L - X*, en particular en donde X* es



(véase Agarwal et al., Bioconjugate Chem 24 (2013) 846-851).

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

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer

colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

5 Tal como se usa en el presente documento, "tratar", "tratando" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de lo siguiente: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno (o trastorno) que se
10 está tratando; (c) inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno (o los trastornos) que se está tratando; (d) limitar o prevenir la recurrencia del trastorno (o trastornos) en pacientes que han tenido anteriormente el trastorno; y (e) limitar o prevenir la recurrencia de los
15 síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el trastorno (o los trastornos).

Tal como se usa en el presente documento, el tratamiento puede comprender administrar un conjugado o una composición
20 farmacéutica de acuerdo con la presente invención a un paciente, en donde "administrar" incluye la administración *in vivo*, así como la administración directa a tejido *ex vivo*, tal como injertos venosos.

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

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el propósito
30 pretendido. La cantidad eficaz de un agente terapéutico dado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la

vía de administración, el tamaño y la especie del animal que recibirá el agente terapéutico, y el propósito de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual se puede determinar empíricamente por un experto en la técnica de acuerdo con los métodos establecidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de amanitina según la presente invención, o un conjugado de la presente invención de un derivado de amanitina con un resto de unión a diana, y que además comprende uno o más diluyentes, vehículos, excipientes, cargas, aglutinantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, disgregantes, adsorbentes, y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

"Farmacéuticamente aceptable" significa que se ha aprobado por parte de un organismo de control del gobierno federal o estatal, o que está listada en la Farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se usa en forma de un medicamento administrado por vía sistémica. Esto incluye parenterales, que comprenden entre otros inyectables e infusiones. Los inyectables se formulan en forma de ampollas o como los llamados inyectables listos para usar, por ejemplo, jeringas listas para usar o jeringas de un solo uso y aparte de esto en frascos perforables para extracción múltiple. La administración de inyectables puede ser en forma de aplicación subcutánea (s.c.),

intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.c.). En particular, es posible producir las formulaciones de inyección adecuadas, respectivamente, como una suspensión de cristales, soluciones, sistemas dispersos de nanopartículas o coloides como, por ejemplo, hidrosoles.

Las formulaciones inyectables se pueden producir además como concentrados, que se pueden disolver o dispersar con diluyentes isotónicos acuosos. La infusión también se puede preparar en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones liposomales y microemulsiones. Similar a los inyectables, las formulaciones de infusión también se pueden preparar en forma de concentrados para dilución. Las formulaciones inyectables también se pueden aplicar en forma de infusiones permanentes tanto en pacientes internos como en terapia ambulatoria, por ejemplo, mediante minibombas.

Es posible agregar a las formulaciones de drogas parenterales, por ejemplo, albúmina, plasma, expansor, sustancias tensioactivas, diluyentes orgánicos, sustancias que influyen en el pH, sustancias de complejación o sustancias poliméricas, en particular como sustancias para influir en la adsorción de los conjugados de toxina de resto de unión a diana de la invención con proteínas o polímeros o también se pueden agregar con el objetivo de reducir la adsorción de los conjugados de toxina del resto de unión a diana de la invención con materiales como instrumentos de inyección o materiales de embalaje, por ejemplo, plástico o vidrio.

Los derivados de amanitina de la presente invención que comprenden un resto de unión a diana se pueden unir a

microvehículos o nanopartículas en parenterales como, por ejemplo, a partículas finamente dispersas basadas en poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poliaminoácidos o poliéteruretanos. Las formulaciones parenterales también se pueden modificar como preparaciones de depósito, por ejemplo, basadas en el "principio de unidades múltiples", si los conjugados de la toxina del resto de unión a diana de la invención se introducen en forma finamente dispersa, en forma dispersa y en suspensión, respectivamente, o como una suspensión de cristales en el medicamento o basadas en el "principio de unidad única" si el conjugado de toxina del resto de unión a la diana de la invención está incluido en una formulación, por ejemplo, en un comprimido o en un bastoncillo que se implanta posteriormente. Estos implantes o medicamentos de depósito en formulaciones de unidad única y de múltiples unidades a menudo consisten en los llamados polímeros biodegradables como, por ejemplo, poliésteres de ácido láctico y ácido glicólico, poliéter-uretanos, poliaminoácidos, poli(met)acrilatos o polisacáridos.

20

Los adyuvantes y los vehículos añadidos durante la producción de las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas como parenterales son particularmente *aqua sterilisata* (agua esterilizada), sustancias que influyen en el valor del pH tales como, por ejemplo, ácidos o bases orgánicos o inorgánicos, así como sus sales, sustancias tamponantes para ajustar los valores de pH, sustancias para la isotonización como, por ejemplo, cloruro de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, glucosa y fructosa, surfactantes y tensioactivos, respectivamente, y emulsionantes como, por ejemplo, ésteres parciales de ácidos grasos de

30

polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween®) o, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietilenos (por ejemplo, Cremophor®), aceites grasos como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite de ricino, ésteres
5 sintéticos de ácidos grasos como, por ejemplo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y aceite neutro (por ejemplo, Miglyol®), así como adyuvantes poliméricos como, por ejemplo, gelatina, dextrano, polivinilpirrolidona, aditivos que aumentan la solubilidad de disolventes orgánicos como, por
10 ejemplo, propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o sustancias formadoras de complejos como, por ejemplo, citrato y urea, conservantes como, por ejemplo, hidroxipropiléster y metiléster de ácido benzoico, alcohol bencílico, antioxidantes como por ejemplo sulfito de sodio y
15 estabilizantes como por ejemplo EDTA.

Cuando se formulan las composiciones farmacéuticas de la presente invención como suspensiones en una realización preferida, se añaden agentes espesantes para evitar el
20 establecimiento de los conjugados de toxina de la fracción de unión a la diana de la invención o, tensioactivos y polielectrolitos para asegurar la resuspendabilidad de sedimentos y/o agentes formadores complejos como, por ejemplo, EDTA. También es posible lograr complejos de principio activo
25 con varios polímeros. Los ejemplos de tales polímeros son polietilenglicol, poliestireno, carboximetilcelulosa, Pluronic® o éster de ácido graso sorbit de polietilenglicol. Los conjugados de toxina de la fracción de unión a diana de la invención también se pueden incorporar en formulaciones
30 líquidas en forma de compuestos de inclusión, por ejemplo, con ciclodextrinas. En realizaciones particulares, se pueden

añadir agentes dispersantes como adyuvantes adicionales. Para la producción de agentes de andamiaje liofilizados como manita, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, se puede usar PVP o variedades de gelatina.

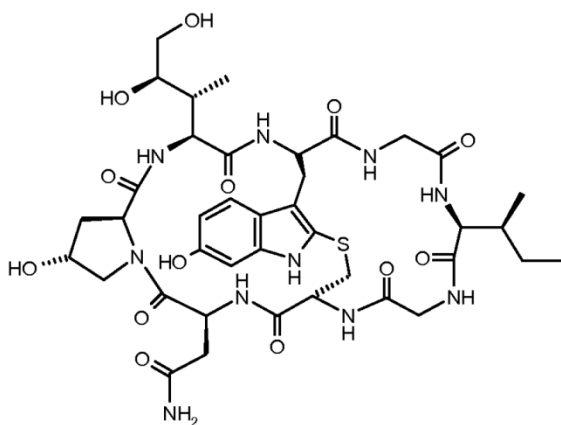
5

EJEMPLOS

A continuación, la invención se explica con más detalle mediante ejemplos no limitantes:

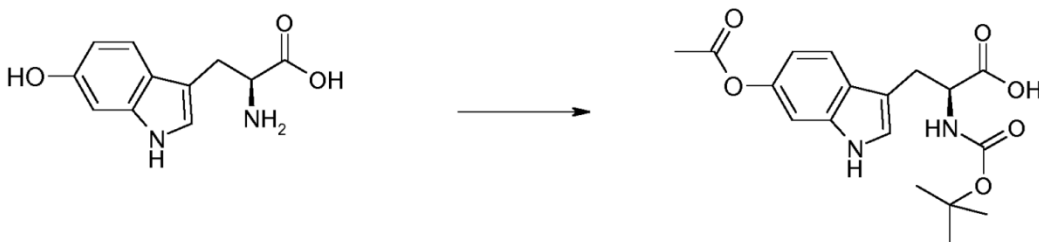
10

A. Síntesis total de S-desoxi- α -amanitina HDP 30,0735



HDP 30,0735

1. Preparación de N-(*tert*-butoxycarbonil)-L-6-acetoxitriptófano HDP 30,2550



HDP 30,2550

15

Se suspendieron 590,0 mg (2,68 mmol) de 6-Hidroxil-L-triptófano (CAS: 13567-14-1) en una mezcla de 30 ml de 1,4-dioxano/agua 1:1 (v,v). En una atmósfera de argón, se añadieron 2,68 ml (2,68 mmol) de NaOH 1 N una vez a temperatura ambiente.

20

La solución resultante de color amarillo se trató con 574,6 μ l

(2,68 mmol) Boc anhídrido (Boc2O) y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La solución se acidificó con ácido clorhídrico 1 N a pH 2,4 y se extrajo 3 veces con 25 ml de etilacetato. Los extractos combinados de etilacetato se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron sobre MgSO₄. La filtración y la evaporación a sequedad dio 785,0 mg del material en bruto. El N-Boc-6-hidroxi-L-triptófano en bruto se disolvió en 4,91 ml (4,91 mmol) de NaOH 1 N y se trató con 463,2 ml (500,3 mg, 4,90 mmol) de acetanhídrido. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h en argón y se acidificó con ácido cítrico al 5 %. La fase acuosa se extrajo tres veces con 25 ml de etilacetato, se lavó con NaCl saturado y se secó sobre MgSO₄. La filtración y la evaporación dio 635 mg de un sólido en bruto.

15

El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre a 330 g de columna de gel de sílice (detección de longitud de onda 254 nm) con un gradiente de CH₂Cl₂ + ácido acético 1 % a CH₂Cl₂/MeOH (15:1) + ácido acético al 1 % y dio, después de la coevaporación con tolueno 564,4 mg (rendimiento del 56 %) de un polvo de color blanco.

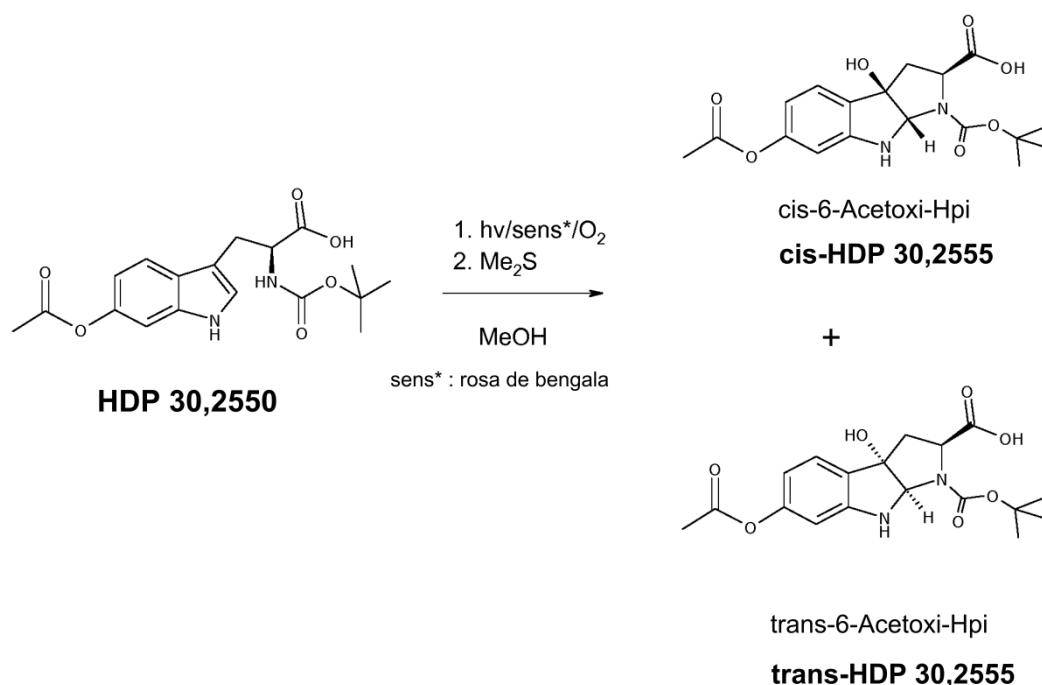
20

EM (IEN⁻) encontrado: 361,08 [M-H]⁻; calc.: 362,15

(C₁₈H₂₂N₂O₆)

25

2. Preparación de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol cis-HDP 30,2555 y trans HDP 30,2555 (cis,trans-6-Acetoxi-Hpi)



Fotooxigenación

La fotooxigenación se realizó con una lámpara de vapor de sodio a alta presión de 400 W (lámpara Sirius X400 de 230 V, 400 W; 55000 lúmenes a una distancia de 1,3 m) o alternativamente con una lámpara de halógeno de tungsteno (500 W). Se usa una solución de filtro ($\text{CuCl}_2\text{-CaCO}_3$) que corta la luz con $\lambda < 490$ nm para una lámpara de halógeno de tungsteno.

El azul de metileno o rosa de bengala se utiliza como sensibilizador de tinte.

La reacción se llevó a cabo en un recipiente de reacción cilíndrico de 500 ml con camisa de intercambio de calor hecha de vidrio de borosilicato DURAN®, fondo plano y brida plana de laboratorio (DN) con dos conectores con rosca GL 18. La distancia desde la lámpara al recipiente de reacción era de 15 cm y la temperatura de reacción estaba en un intervalo de 3-4 °C.

El producto final se purificó en un sistema de cromatografía ultrarrápida Teledyne ISCO con una columna de

330 g de sílice Redi Sept Flash (Teledyne ISCO cat. 69-2203-330). Disolventes CH_2Cl_2 , CH_3OH , CH_3COOH fueron HPLC convencional o grado BP.

5 Se burbujeó oxígeno seco (99,5 % de pureza) a través de la mezcla de reacción con una velocidad de 2-4 l por minuto.

Se disolvieron 943,0 mg (2,60 mmol) N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-6-acetoxi-triptófano HDP **30,2550** y 100 mg de
 10 rosa de bengala en 500 ml de metanol y se enfriaron hasta 3 °C usando un criostato Huber con glicol/agua como medio de enfriamiento. La solución de reacción se irradió con la lámpara de vapor de sodio a alta presión de 400 W. Durante la irradiación, se burbujeó una corriente lenta de oxígeno a
 15 través de la solución de reacción. Después de 5 horas de irradiación, se detuvo la oxigenación y el enfriamiento y los medios de reacción se trataron con 10 ml de sulfuro de dimetilo. La mezcla se agitó durante 2 horas y se evaporó a sequedad usando un evaporador rotativo con una temperatura de
 20 baño de agua de 35 °C. El residuo de color rojo oscuro se secó adicionalmente a alto vacío hasta un sólido cristalino de 1,20 g. El producto en bruto se purificó en una columna de gel de sílice de 330 g (detección de longitud de onda 254nm) con un gradiente de CFI_2Cl_2 + ácido acético al 5 % a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$
 25 (30:1) + ácido acético al 5 %. 380 mg de *cis*-HDP 30,2555 y 290 mg de *trans*-HDP 30,2555 se eluyeron y se coevaporaron con tolueno. Después de la liofilización en *terc*-butanol, ambos isómeros se obtuvieron en forma de polvos de color blanquecino.
 30 *cis*-1-(*terc*-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol (***cis*-FIDP 30,2555**)
380 mg de *cis*-FIDP 30,2555 rendimiento: 39 %

55

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

δ = 1,22, 1,44, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,23 (s, 3H, OCOCH_3); 2,46-2,63 (m, 2H, CH_2); 4,14-4,29 (m, 1H, 2-H); 5,35 (s, 1H, 8a-H); 6,39-6,46 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,20-7,24 (m, 1H, 4-H)

5 RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ =ppm)

δ = 20,93, 28,45, 31,12, 42,80, 61,12, 69,44, 82,21, 85,82, 87,93, 104,97, 112,98, 124,84, 129,42, 151,51, 154,04, 155,97, 171,34, 175,79

EM (IEN^+) encontrado: 378,92 calc.: 378,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

[MH] $^+$;

encontrado: 401,17

EM (IEN^+) [M+Na] $^+$; calc.: 401,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$)

10 UV/VIS (CH_3OH): λ_{max} = 296 nm, 239 nm, 215 nm

λ_{min} = 266 nm, 227 nm

trans-1-(*terc*-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-6-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol **(trans-HDP 30,2555)**

15 290 mg de trans-HDP 30,2555 rendimiento: 30 %

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ =ppm)

δ = 1,22, 1,45, 1,54 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 2,22 (s, 3H, OCOCH_3); 2,55-2,73 (m, 2H, CH_2); 4,51-4,57 (m, 1H, 2-H); 5,21-5,24 (s, 1H, 8a-H); 6,36-6,41 (m, 2H, 7-H, 5-H); 7,17-7,18 (m, 1H, 4-H)

20 RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ =ppm)

δ = 20,95, 28,50, 31,12, 42,47, 60,97, 69,44, 82,06, 84,84, 87,54, 104,74, 112,67, 125,03, 128,70, 152,31, 154,22, 156,00, 171,23, 174,67

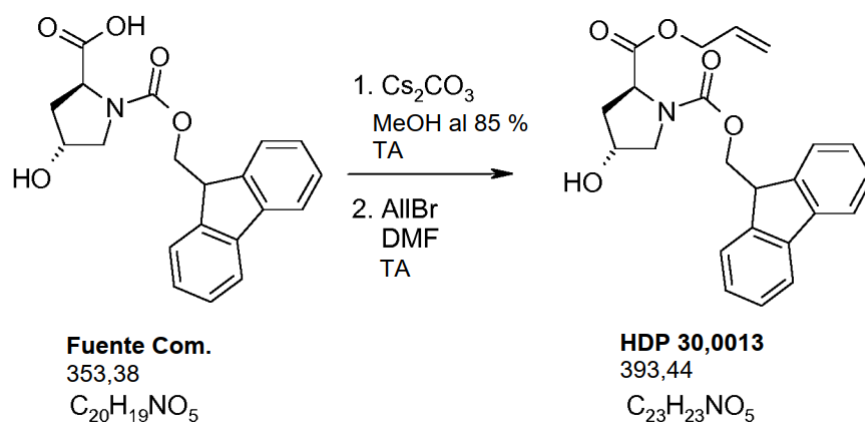
EM encontrado: 379,00 [MH] $^+$; calc.: 378,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

(IEN^+)

EM encontrado: 401,17 [M+Na] $^+$; calc.: 401,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$)

(IEN^+)

EM 779,00

(IEN⁺) encontrado: [2M+Na]⁺; calc.: 779,28 (C₃₆H₄₄N₄Na₂O₁₄)UV/VIS (CH₃OH): $\lambda_{\max}$ = 299 nm, 241 nm, 215 nm $\lambda_{\min}$ = 268 nm, 228 nm**3. Preparación de S-desoxi- α -amanitina HDP 30,0735****5 Etapa 1: HDP 30,0013**

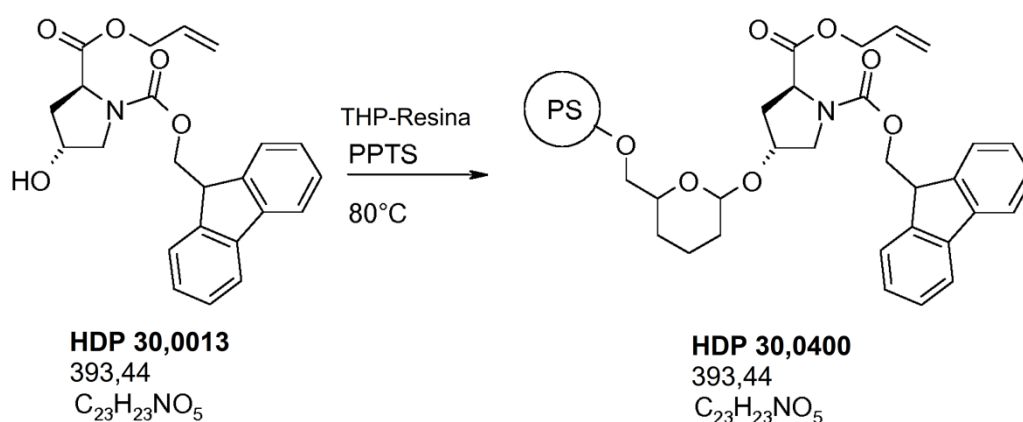
Se suspendió FmocHypOH (10,0 g, 28,3 mmol) en 100 ml de MeOH al 80 % y se añadió CS₂CO₃ (4,6 g, 14,1 mmol). La suspensión se agitó a 50 °C durante 30 minutos hasta la disolución completa. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se volvió a disolver en 100 ml de DMF. Se añadió gota a gota alilbromuro (1,6 ml, 3,6 g, 29,7 mmol) y la reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La DMF se retiró por destilación y el residuo se disolvió en terc-

10 butilmetil éter. Los precipitados se filtraron y la solución transparente se absorbió en Celite antes de la cromatografía en columna. El compuesto se purificó en 220 g de gel de sílice con gradiente de n-hexano/acetato de etilo.

15

20 Rendimiento: 11,5 g, 100 %

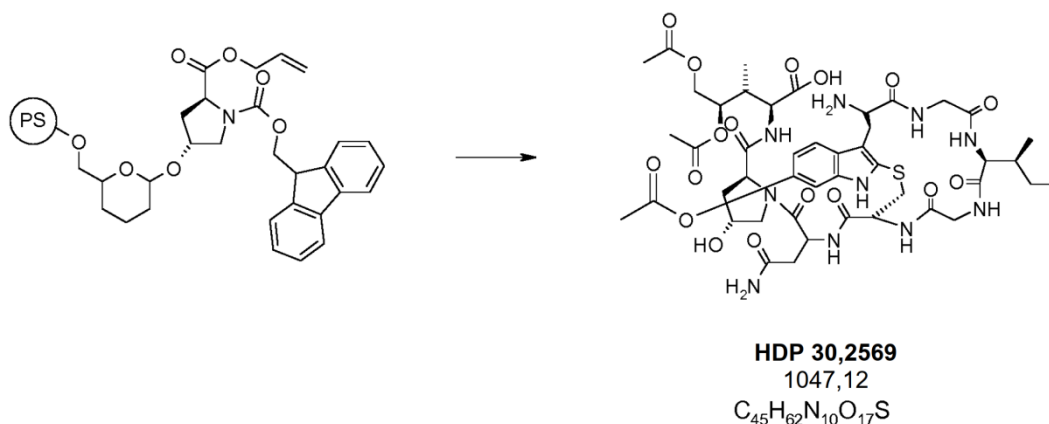
Etapa 2: HDP 30,0400



Se añadieron HDP 30,0013 (5,0 g, 14,1 mmol), 4-toluenosulfonato de piridinio (1,33 g, 5,3 mmol) a una
 5 suspensión de resina de 1,3-dihidro-2H-piran-2-il-metoximetilo (5,0 g, 1,0 mmol/g THP-resina) en 40 ml de dicloroetano. La reacción se agitó a 80 °C durante una noche. Después de enfriar, la resina se filtró y se lavó ampliamente con dicloroetano, dimetilformamida, acetonitrilo, diclorometano y
 10 *tert*-butilmetil éter.

La carga fue de 0,62 mmol/g (determinada por espectroscopia UV del grupo fluorenemetilto después de la desprotección)

15 Etapa 3: HDP 30,2569 (Síntesis en fase sólida)



Pretratamiento de resina:

Se trató HDP 30,0400 (0,31 g, 0,25 mmol) con ácido N,N-

dimetilbarbitúrico (241 mg, 1,55 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (35 mg, 0,03 mmol). La resina se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó ampliamente con diclorometano, DMF, acetonitrilo, diclorometano y *terc*-butilmetil éter y se secó a presión reducida.

Procedimiento de acoplamiento:

Todos los reactivos y reactivos se disolvieron en diclorometano/DMF (1:1, v/v). Se disolvió HDP 30,0477 [véase el documento WO 2014/009025] (102 mg, 0,30 mmol) en 6,0 ml de diclorometano/*N,N*-dimetilformamida y se trató con 4,0 ml de una solución 0,2 N de PyBOP/HOBt y 2 ml de DIEA (40 % en DMF). Después de la adición de 2,0 ml de *N,N*-dimetilformamida, la reacción se calentó a 50 °C durante 8 minutos por irradiación con microondas (20 W, reactor de microondas CEM) y se lavó con *N,N*-dimetilformamida después del acoplamiento.

Desprotección de Fmoc:

20

La desprotección se realizó mediante la adición de 6,0 ml de piperidina al 20 % en *N,N*-dimetilformamida a 50 °C durante 10 minutos. La resina se lavó con *N,N*-dimetilformamida (sin desprotección después del acoplamiento del aminoácido final).

25

Todos los demás aminoácidos se acoplaron siguiendo el protocolo anterior, las ponderaciones se muestran a continuación:

(0,102 g, 0,30 mmol	1,5 equiv.HDP 30,0477	PM:339,6,
anterior)		véase
0,72 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocAsn(Trt)OH	PM:599,7

0,71 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocCys (OTrt) OHPM: 586,7	
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocGlyOH	PM: 297,3
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmoclleOH	PM: 353,4
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocGlyOH	PM: 297,3
0,114 g, 0,30 mmol	1,5 equiv.HDP 30,2555	PM: 378,4

Después de la finalización, la resina se transfirió finalmente a una jeringa con frita inferior, se lavó con DCM y se secó a presión reducida.

5

Liberación de resina y formación de anillo B

Se aspiró una solución de 5 ml de TFA, 5 ml de DCM más MeOH al 10 % a la resina y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La solución se dispensó en un matraz de reacción de 50 ml y la resina se lavó con TFA/DCM 1: 1 más MeOH al 10 % una vez y se vertió en el mismo matraz. El matraz de reacción se agitó durante 16 h. Se añadió triisopropilsilano (0,5 ml) y la reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 500 µl de MeOH y el péptido precipitó en 50 ml de TBME enfriado con hielo. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó una vez con 50 ml de TBME y se secó a presión reducida.

El precipitado se solubilizó en 2 ml de metanol y se purificó por cromatografía preparativa en columna de fase inversa. El metanol se retiró por destilación a presión reducida y la fase acuosa restante se liofilizó.

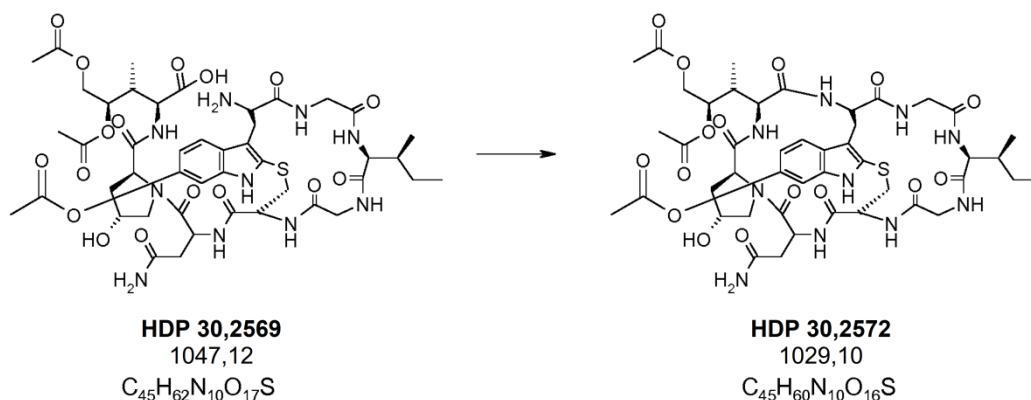
Rendimiento: 136,5 mg, 62,5 %

EM (IEN+) encontrado: 1047,4 [M+H]⁺; calc.: 1047,4

(C₄₅H₆₃N₁₀O₁₇S)

HPLC: 91,9 % área

Etapla 4: Ciclación (formación del anillo A, HDP 30,2572)



5 El intermedio monocíclico liofilizado anterior (136 mg, 130 μmol) se disolvió en 16 ml de DMF y se trató con difenilfosforilazida (DPPA, 131 μl, 1300 μmol, 10 equiv.) y diisopropiletilamina (DIEA, 162 μl, 1300 μmol, 10 equiv.). La reacción se agitó durante 16 h y se detuvo con 500 μl agua tras

10 la finalización. La conversión se controló por HPLC. La mezcla se concentró a presión reducida, se volvió a disolver en 1 ml de metanol y se purificó por cromatografía preparativa en columna de fase inversa.

15 Rendimiento: 55,3 mg, 41 %

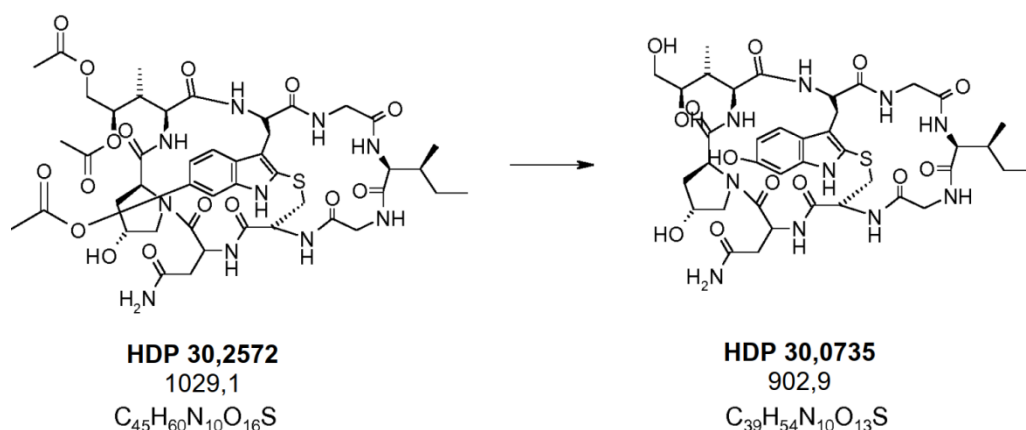
EM (IEN+) encontrado: 1029,33 [M+Na]⁺; calc.: 1030,10

(C₄₅H₆₁N₁₀O₁₆S)

20 HPLC: 99,2 % área

Etapla 5: Desprotección de acetato (HDP 30,0735)

61



Se disolvió HDP 30,2572 (55,3 mg, 53,7 μ mol) en una solución de NH_3 metanólico 7 N (3,0 ml) y se agitó. La conversión se verificó por HPLC/EM. Después de la finalización (6 - 8 h) la reacción se concentró al vacío, se volvió a suspender en 100 μ l de MeOH y se purificó por HPLC prep.

Rendimiento: 14,1 mg, 29 %

HPLC: 100 %

EM (IEN+) encontrado: 903,3 calc.: 902,9 ($C_{39}H_{54}N_{10}O_{13}S$)

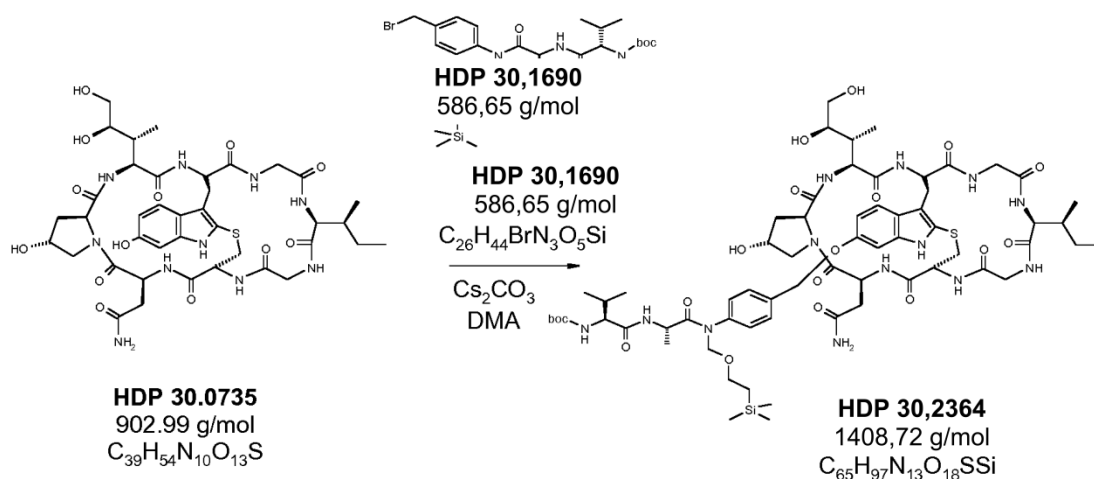
$[M+H]^+$;

encontrado: 925,33

$[M+Na]^+$

10 4. Preparación de 6'-((3-Maleidopropanamido)-Val-Ala-PAB)-S-deoxi- α -amanitina (HDP 30,2371)

Etapa 1: HDP 30,2364



Se disolvieron S-desoxi- α -amanitina **HDP 30,0735** (30 mg, 33,2 μ mol) y **HDP 30,1690** (documento WO 2016/142049, 78 mg,

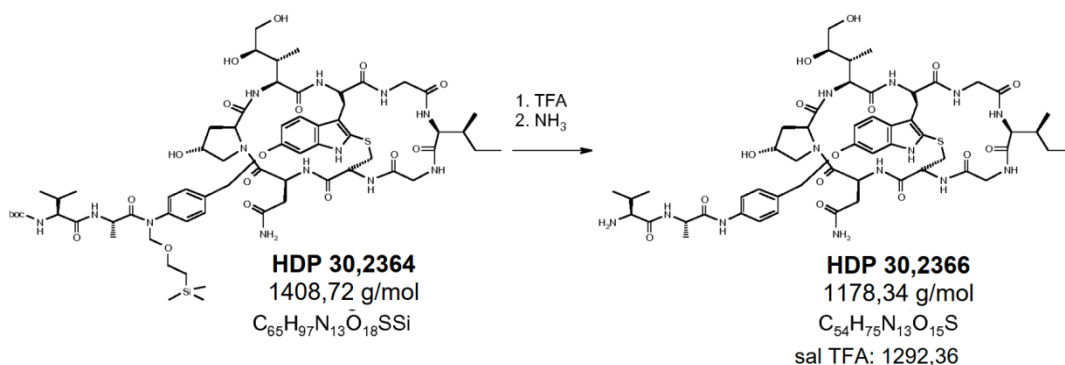
133 μmol = 4,0 equiv.) en 1500 μl de dimetilacetamida seca (DMA). Se añadió una solución 0,2 M de hidrogenocarbonato de cesio en agua (199 μl , 1,2 equiv.) en una porción y la mezcla se agita a temperatura ambiente. Después de 1,5 y 4 h, se
 5 añadieron porciones adicionales de 99 μl (0,6 equiv.) de solución de carbonato de cesio.

Después de 18 h el disolvente se evaporó a alto vacío.

10 El residuo se disolvió en 400 μl de metanol y se añadieron gota a gota a MTBE enfriado con hielo (10 ml). Después de permanecer a 0 °C durante 10 min, el precipitado resultante se aisló por centrifugación (4 min, 4000 $\times$ g). El sobrenadante se descargó y el sedimento se volvió a suspender en MTBE adicional
 15 (10 ml) y se repitió la centrifugación. El producto en bruto secado al vacío se disolvió en 400 μl de metanol y se purificó por HPLC prep. en un Phenomenex Luna- C_{18} (2), columna de 10 μm (250 $\times$ 21,2 mm) con un gradiente de metanol del 5 % al 100 % en agua. Las fracciones del producto se combinaron y se
 20 redujeron hasta 23 mg (70 %) de producto como un sólido amorfo.
 EM (IEN+) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ encontrado: 1430,58; calc.: 1430,65
 ($\text{C}_{65}\text{H}_{97}\text{N}_{13}\text{NaO}_{18}\text{SSi}$)

Por evaporación del pico de elución inicial se recuperaron
 25 5 mg (17 %) de material de partida.

Etapa 2: HDP 30,2366

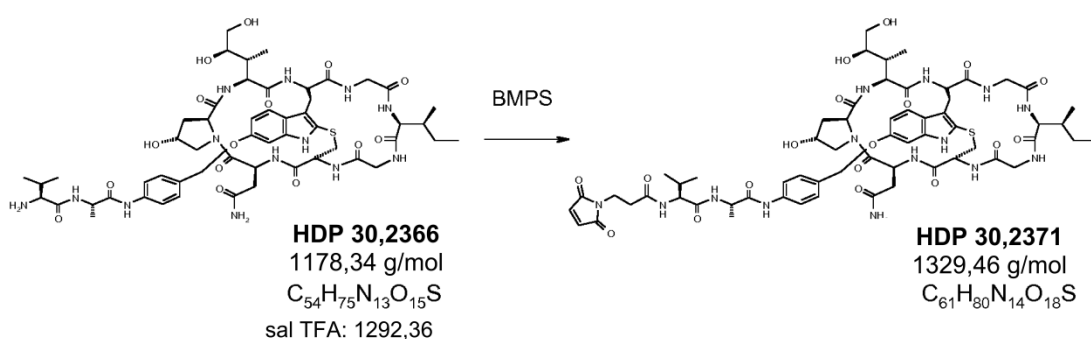


Se disolvió HDP 30,2364 (9,47 mg, 6,72 μmol) en 750 μl de ácido trifluoroacético (TFA). Después de 2 min los volátiles se retiran al vacío y el residuo se disolvió en 750 μl de agua y se añadió gota a gota amoniaco al 3 % hasta que se alcanzó un pH de 10 y se produjo precipitación.

La solución se liofilizó y se purificó posteriormente en HPLC prep. (Phenomenex Luna- C_{18} (2), columna de 10 μm 250 x 21,2 mm, gradiente de metanol al 5-100 % (TFA al 0,05 %) en agua (TFA al 0,05 %) para dar 7,72 mg (89 % basado en sal TFA) de producto.

EM (IEN^+) [MH^+] encontrado: 1178,42; calc.: 1178,53
($\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{N}_{13}\text{O}_{15}\text{S}$)

15 Etapa 3 HDP 30,2371



Se disolvió **HDP 30,2366** (4,01 mg, 3,10 μmol) en 500 μl de DMF seca.

20 Se añadieron éster N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(maleimido)propiónico (BMPS, 1,65 mg, 2 equiv.), disuelto en 100 μl de DMF seguido de 2,1 μl de DIPEA.

Después de agitar durante 1 h, la mezcla de reacción se vertió en 10 ml de metil-terc-butil-éter enfriado con hielo. El tubo se mantuvo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 4000 x g. El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó con

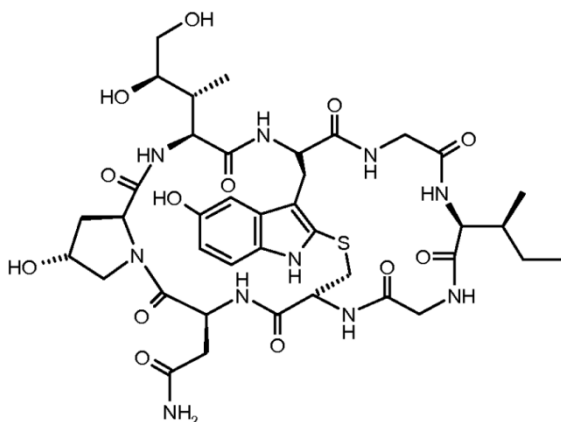
10 ml de metil-*terc*-butil-éter fresco.

El sedimento secado al vacío se purificó por HPLC RP-18 con un gradiente de metanol al 5-100 % en agua. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad y se liofilizaron a partir de 1 ml de *terc*-butanol/agua para dar 2,70 mg (65 %) de producto en forma de un polvo incoloro.

EM [MH]⁺ encontrado: calc.: 1329,6 (C₆₁H₈₁N₁₄O₁₈S)
(IEN+) 1329,3;
[M+Na]⁺ encontrado: calc.: 1351,5
1351,5; (C₆₁H₈₀N₁₄NaO₁₈S)

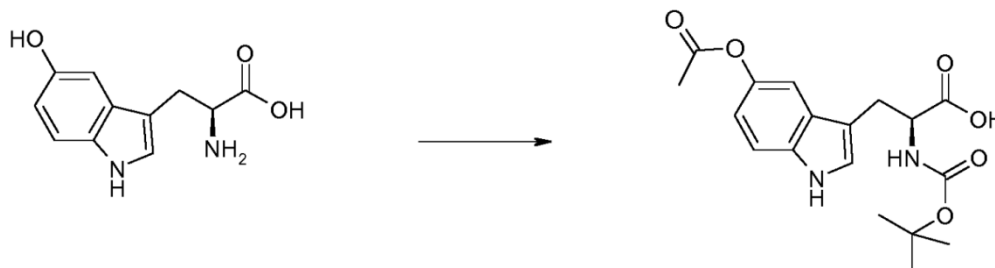
B. Síntesis total de S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida HDP

10 30,2548



HDP 30,2548

1. Preparación de N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-5-acetoxi-triptófano HDP 30,2531



HDP 30,2531

Se suspendieron 800,0 mg (3,63 mmol) de 5-hidroxi-L-triptófano (CAS: 4350-09-8) en una mezcla de 40 ml de 1,4-dioxano/agua 1:1 (v:v). En una atmósfera de argón, se añadieron 3,64 ml (3,64 mmol) de NaOH 1 N una vez a temperatura ambiente.

5 La solución resultante de color amarillo se trató con 779,0 μ l (794,0 mg, 3,63 mmol) de anhídrido Boc (Boc2O) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución se acidificó con ácido clorhídrico 1 N a pH 2,4 y se extrajo 3 veces con 35 ml de etilacetato. Los extractos combinados de
10 etilacetato se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron sobre MgSO₄. La filtración y la evaporación a sequedad dieron 1,26 g de material en bruto. El N-Boc-6-hidroxi-L-triptófano en bruto se disolvió en 7,87 ml (7,87 mmol) de NaOH 1 N y se trató con 743,0 μ l (802,4 mg, 7,86 mmol) de
15 acetanhídrido. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas en argón y se acidificó con ácido cítrico al 5 %. La fase acuosa se extrajo tres veces con 25 ml de etilacetato, se lavó con NaCl saturado y se secó sobre MgSO₄. Filtración y evaporación.

20

El sólido en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre una columna de gel de sílice de 330 g (detección de longitud de onda 254 nm) con un gradiente de CH₂Cl₂ + ácido acético al 1 % a CH₂Cl₂/MeOH (15:1) + ácido
25 acético al 1 % y dio, después de la coevaporación con tolueno, 1020,0 mg (rendimiento del 78 %) de un polvo de color blanco.

EM (IEN⁻) encontrado: 361,08[M-H]⁻; calc.: 362,15 (C₁₈H₂₂N₂O₆)

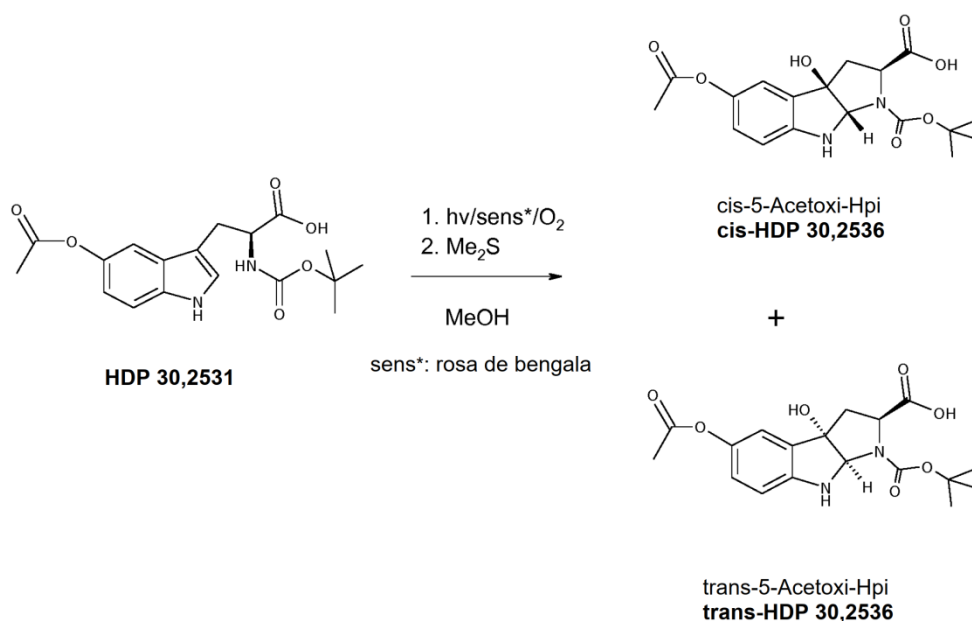
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ = ppm)

30 δ = 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,27 (s, 3H, OCOCH₃); 3,08-3,31 (m, 2H, CH₂); 4,39-4,41 (m, 1H, 2-H); 6,81-6,83; 7,13; 7,24-7,26

(m, 2H, 6-H, 7-H); 7,30-7,32 (1H, 4-H)

2. Preparación de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-5-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-

5 hexahidropirrolo[2,3-b]indol cis-HDP 30,2536 y trans HDP 30,2536 (cis,trans-5-Acetoxi-Hpi)



Fotooxigenación

La fotooxigenación se realizó con una lámpara de vapor de sodio a alta presión de 400 W (lámpara Sirius X400 de 230 V, 400 W; 55.000 lúmenes a una distancia de 1,3 m) o alternativamente con una lámpara de halógeno de tungsteno (500 W). Se usa una solución de filtro (CuCl₂-CaCO₃) que corta la luz con $\lambda < 490$ nm para una lámpara de halógeno de tungsteno.

15

El azul de metileno o rosa de bengala se utiliza como sensibilizador de tinte.

La reacción se llevó a cabo en un recipiente de reacción cilíndrico de 500 ml con camisa de intercambio de calor hecha de vidrio de borosilicato DURAN®, fondo plano y brida plana de laboratorio (DN) con dos conectores con rosca GL 18. La distancia desde la lámpara al recipiente de reacción era de

20

15 cm y la temperatura de reacción estaba en un intervalo de 3-4 °C.

El producto final se purificó en un sistema de cromatografía ultrarrápida Teledyne ISCO con una columna de 330 g de sílice Redi Sept Flash (Teledyne ISCO cat. 69-2203-330). Disolventes CH_2Cl_2 , CH_3OH , CH_3COOH fueron HPLC convencional o grado BP.

Se burbujeó oxígeno seco (99,5 % de pureza) a través de la mezcla de reacción con una velocidad de 2-4 l por minuto.

Se disolvieron 1,20 g (3,17 mmol) de N-(*terc*-butoxicarbonil)-L-5-acetoxi-triptófano **HDP 30,2531** y 100 mg de rosa de bengala en 500 ml de metanol y se enfriaron hasta 3 °C usando un criostato Huber con glicol/agua como medio de enfriamiento. La solución de reacción se irradió con la lámpara de vapor de sodio a alta presión de 400 W. Durante la irradiación, se burbujeó una corriente lenta de oxígeno a través de la solución de reacción. Después de 4 horas de irradiación, se detuvo la oxigenación y el enfriamiento y los medios de reacción se trataron con 20 ml de sulfuro de dimetilo. La mezcla se agitó durante 2 horas y se evaporó a sequedad usando un evaporador rotatorio con una temperatura del baño de agua de 35 °C. El residuo de color rojo oscuro se secó además a alto vacío hasta un sólido cristalino. El producto en bruto se purificó en una columna de gel de sílice de 330 g (detección de longitud de onda 254 nm) con un gradiente de CH_2Cl_2 + ácido acético al 5 % a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30:1) + ácido acético de 5 %.

178 mg de **cis-HDP 30,2536** y 132 mg de **trans-HDP 30,2536** se eluyeron y se coevaporaron con tolueno. Después de la liofilización en *terc*-butanol, ambos isómeros se obtuvieron en forma de polvos de color blanquecino.

5

cis-1-(*terc*-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-5-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrololo[2,3-b]indol (**cis-HDP 30,2536**)

178 mg de cis-HDP 30,2536 rendimiento: 15 %

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ=ppm)

10 δ = 1,44, 1,54 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,23 (s, 3H, OCOCH₃); 2,45-2,62 (m, 2H, CH₂); 4,18-4,33 (m, 1H, 2-H); 5,37 (s, 1H, 8a-H); 6,63-6,67; 6,82-6,84; (m, 2H, 7-H, 6-H); 6,96-6,98 (m, 1H, 4-H)

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD, δ = ppm)

15 δ = 20,86, 28,46, 31,12, 42,81, 61,21, 82,14, 85,60, 111,49, 117,83, 123,98, 132,77, 144,99, 148,03, 156,07, 172,01, 175,89

EM (IEN⁺) encontrado: 379,00 [MH]⁺; calc.: 378,14 (C₁₈H₂₂N₂O₇)

EM (IEN⁺) encontrado: 401,17 [M+Na]⁺; calc.: 401,14 (C₁₈H₂₂N₂NaO₇)

20 EM (IEN⁻) encontrado: 377,17 [M-H]⁻; calc.: 378,14 (C₁₈H₂₂N₂O₇)

UV/VIS (CH₃OH): λ_{max} = 299 nm, 242 nm, 207 nm

λ_{min} = 270 nm, 222 nm

trans-1-(*terc*-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-5-acetoxi-

25 1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrololo[2,3-b]indol (**trans-HDP 30,2536**)

132 mg de trans-HDP 30,2536 rendimiento: 11 %

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ = ppm)

30 δ = 1,47, 1,54 [s, 9H, C(CH₃)₃]; 2,21 (s, 3H, OCOCH₃); 2,50-2,70 (m, 2H, CH₂); 4,51-4,56 (m, 1H, 2-H); 5,22-5,26 (s, 1H, 8a-H); 6,58-6,63; 6,80-6,81 (m, 6-H, 7-H); 6,92 (s, 1H, 4-H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ = ppm)

δ = 20,88, 28,50, 31,12, 42,60, 61,11, 82,05, 85,38, 111,26, 117,88, 124,07, 131,94 144,66, 148,95, 156,11, 172,01, 174,81

EM (IEN^+) encontrado: 379,00 $[\text{MH}]^+$; calc.: 378,14 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

5 EM (IEN^+) encontrado: 401,17 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calc.: 401,14
($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$)

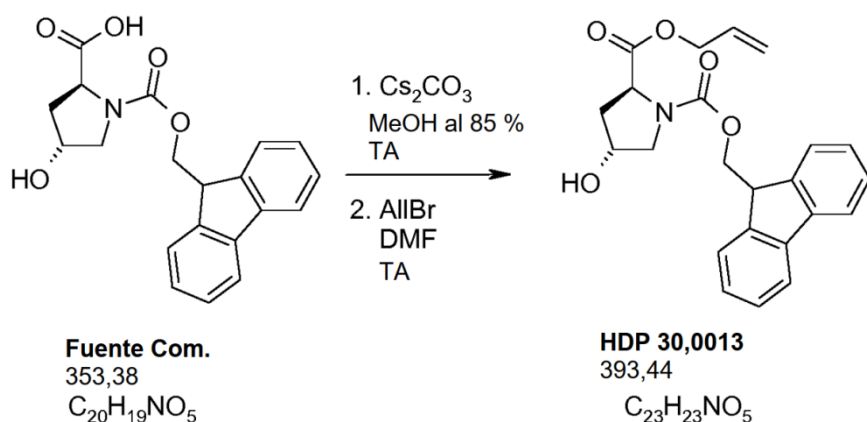
EM (IEN^-) encontrado: 377,17 $[\text{M}-\text{H}]^-$; calc.: 378,14
($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$)

UV/VIS (CH_3OH): λ_{max} = 302 nm, 244 nm, 208 nm

10 λ_{min} = 272 nm, 224 nm

3. Preparación de S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida HDP 30,2548

Etapas 1: HDP 30,0013



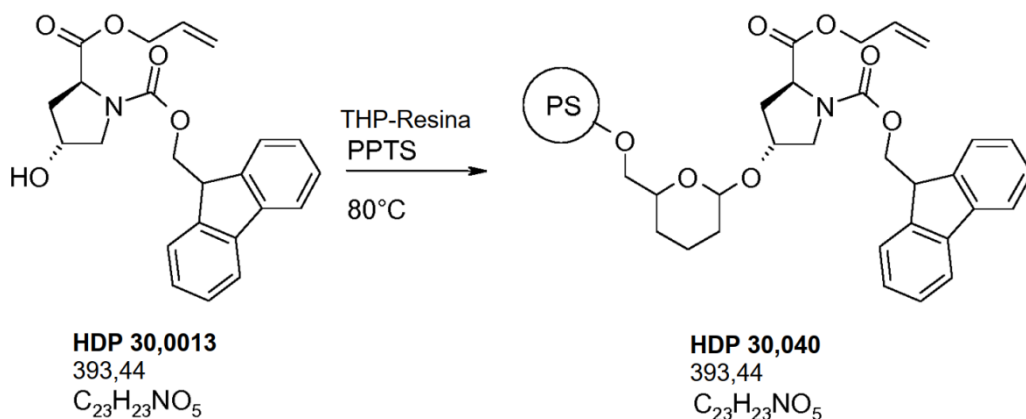
15 Se suspendió FmocHypOH (10,0 g, 28,3 mmol) en 100 ml de MeOH al 80 % y se añadió CS_2CO_3 (4,6 g, 14,1 mmol). La suspensión se agitó a 50 °C durante 30 minutos hasta la disolución completa. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se volvió a disolver en 100 ml de DMF. Se añadió

20 gota a gota alilbromuro (1,6 ml, 3,6 g, 29,7 mmol) y la reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La DMF se retiró por destilación y el residuo se disolvió en terc-butilmetil éter. Los precipitados se filtraron y la solución transparente se absorbió en Celite antes de la cromatografía

25 en columna. El compuesto se purificó en 220 g de gel de sílice con un gradiente de n-hexano/etilacetato.

Rendimiento: 11,5 g, 100 %

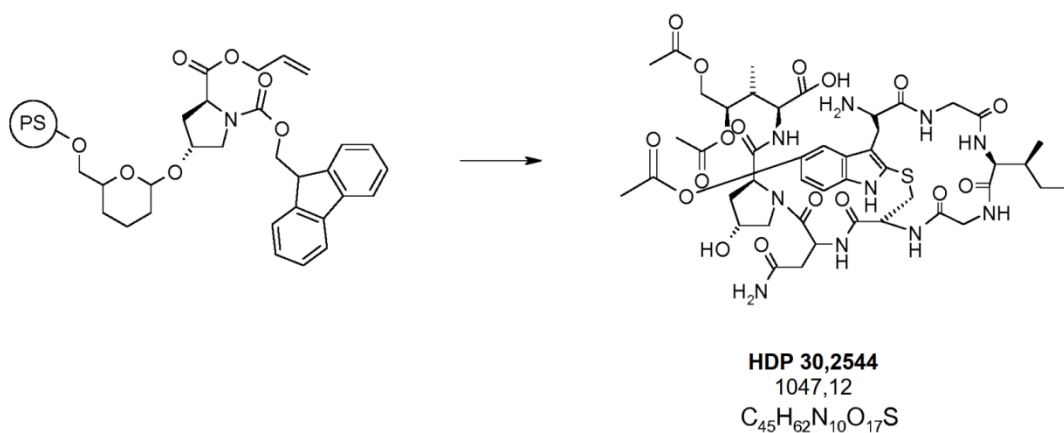
Etapa 2: HDP 30,0400



Se añadieron HDP 30,0013 (5,0 g, 14,1 mmol), 4-toluenosulfonato de piridinio (1,33 g, 5,3 mmol) a una suspensión de resina de 1,3-dihidro-2H-piran-2-il-metoximetil (5,0 g, 1,0 mmol/g THP-resina) en 40 ml dicloroetano. La reacción se agitó a 80 °C durante una noche. Después de enfriar, la resina se filtró y se lavó ampliamente con dicloroetano, dimetilformamida, acetonitrilo, diclorometano y *terc*-butilmetiléter.

La carga fue de 0,62 mmol/g (determinada por espectroscopia UV del grupo fluorenemetiló después de la desprotección)

Etapa 3: HDP 30,2544 (S íntesis en fase sólida)



Pretratamiento de resina:

Se trató **HDP 30,0400** (0,31 g, 0,25 mmol) con ácido N,N-dimetilbarbitúrico (241 mg, 1,55 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (35 mg, 0,03 mmol). La resina se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó ampliamente con
 5 diclorometano, DMF, acetonitrilo, diclorometano y *terc*-butilmetil éter y se secó a presión reducida.

Procedimiento de acoplamiento:

10 Todos los reactivos y reactivos se disolvieron en diclorometano/DMF (1:1, v/v). Se disolvió **HDP 30,0477** [véase el documento WO 2014/009025] (102 mg, 0,30 mmol) en 6,0 ml de diclorometano/N,N-dimetilformamida y se trató con 4,0 ml de una solución 0,2 N de PyBOP/HOBt y 2 ml de DIEA (40 % en DMF).
 15 Después de la adición de 2,0 ml de N,N-dimetilformamida, la reacción se calentó a 50 °C durante 8 minutos por irradiación con microondas (20 W, reactor de microondas CEM) y se lavó con N,N-dimetilformamida después del acoplamiento.

20 Desprotección de Fmoc:

La desprotección se realizó mediante la adición de 6,0 ml de piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida a 50 °C durante 10 minutos. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (sin
 25 desprotección después del acoplamiento del aminoácido final).

Todos los demás aminoácidos se acoplaron siguiendo el protocolo anterior, las ponderaciones se muestran a continuación:

(0,102 g, 0,30 mmol 1,5 equiv.HDP 30,0477 PM: 339,6,
 anterior) véase

0,72 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocAsn(Trt)OH	PM: 599,7
0,71 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocCys(OTrt)OH	PM: 586,7
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocGlyOH	PM: 297,3
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocIleOH	PM: 353,4
0,36 g, 1,2 mmol	5,0 equiv.FmocGlyOH	PM: 297,3
0,114 g, 0,30 mmol	1,5 equiv.HDP 30,2536	PM: 378,4

Después de la finalización, la resina se transfirió finalmente a una jeringa con frita inferior, se lavó con DCM y se secó a presión reducida.

5 Liberación de resina y formación de anillo B

Se aspiró una solución de 5 ml de TFA, 5 ml de DCM más MeOH al 10 % a la resina y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La solución se dispensó en un matraz de reacción de 50 ml y la resina se lavó con TFA/DCM 1: 1 más MeOH al 10 % una vez y se vertió en el mismo matraz. El matraz de reacción se agitó durante 16 h. Se añadió triisopropilsilano (0,5 ml) y la reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 500 µl de MeOH y el péptido precipitó en 50 ml de TBME enfriado con hielo. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó una vez con 50 ml de TBME y se secó a presión reducida.

El precipitado se solubilizó en 2 ml de metanol y se purificó por cromatografía preparativa en columna de fase inversa. El metanol se retiró por destilación a presión reducida y la fase acuosa restante se liofilizó.

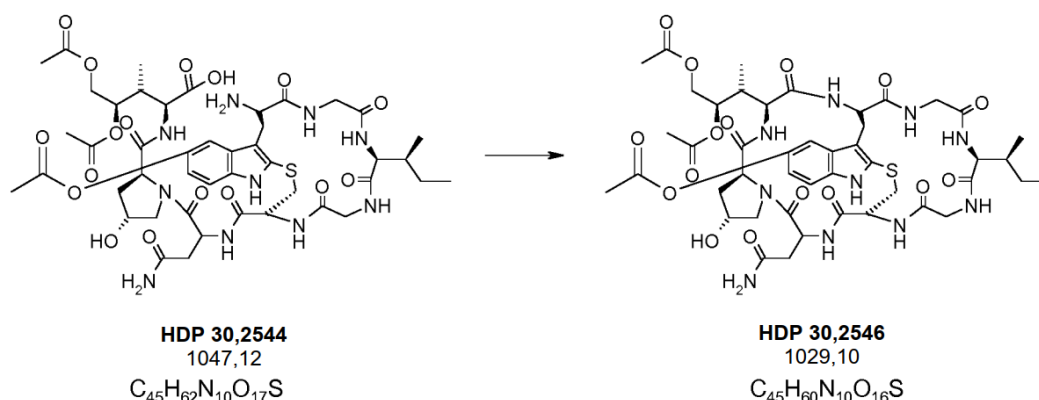
Rendimiento: 75,1 mg, 35,9 %

EM (IEN⁺) encontrado: 1047,4 [M+H]⁺; calc.: 1047,4

(C₄₅H₆₃N₁₀O₁₇S)

HPLC: 99,3 % área

Etapa 4: Ciclación (formación del anillo A, HDP 30,2546)



5

El intermedio monocíclico liofilizado anterior (49,4 mg, 47,2 μmol) se disolvió en 3 ml de DMF y se trató con difenilfosforilazida (DPPA, 13 μl, 237 μmol, 5 equiv.) y diisopropiletilamina (DIEA, 40 μl, 237 μmol, 5 equiv.). La reacción se agitó durante 16 h y se detuvo con 500 μl agua tras la finalización. La conversión se controló por HPLC. La mezcla se concentró a presión reducida, se volvió a disolver en 1 ml de metanol y se purificó por cromatografía preparativa en columna de fase inversa.

15

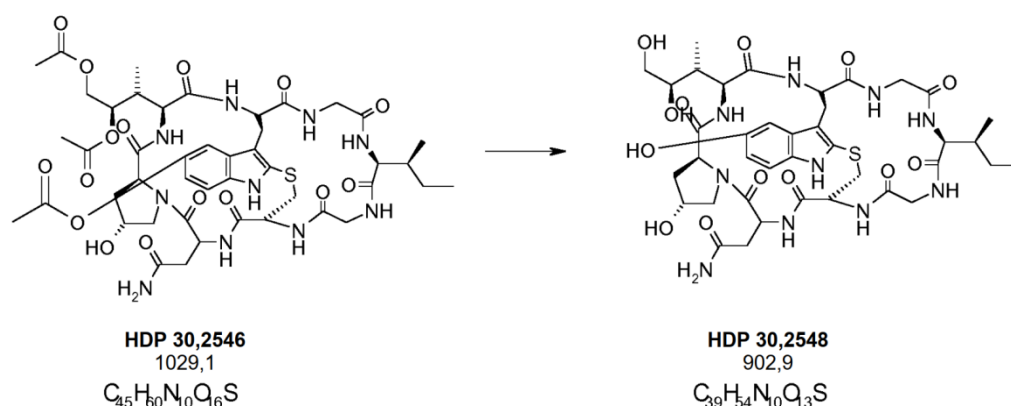
Rendimiento: 32,5 mg, 67,9 %

EM (IEN⁺) encontrado: [M+H]⁺ 1029,33 [MH]⁺ 1051,3 [M+Na]⁺;

calc.: 1029,39; 1051,42 (C₄₅H₆₁N₁₀O₁₆S; C₄₅H₆₀N₁₀O₁₆SNa)

HPLC: 88,3 % área

20 Etapa 5: Desprotección de acetato (HDP 30,2548)



Se disolvió **HDP 30,2546** (23,4 mg, 22,7 μmol) en una solución de NH_3 metanólico 7 N (2,3 ml) y se agitó. La conversión se verificó por HPLC/EM. Después de la finalización (6 - 8 h) la reacción se concentró al vacío, se volvió a suspender en 100 μl de MeOH y se purificó por HPLC prep.

Rendimiento: 12,5 mg, 53,3 %

HPLC: 99 %

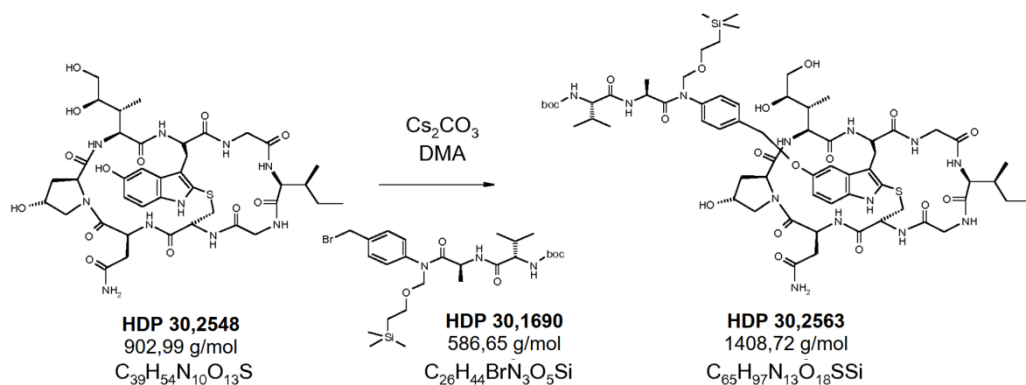
EM (ESP) encontrado: 903,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calc.: 902,9

($\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}$)

encontrado: 925,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

5. Preparación de 5'-((3-Maleidopropanamido)-Val-Ala-p-amininobenciloxi)-S-deoxi-amaninamida (HDP 30,2602)

Etapas 1: HDP 30,2563



Se disolvieron S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida **HDP 30,2548** (9,66 mg, 10,7 μmol) y **HDP 30,1690** (documento WO 2016/142049, 50,2 mg, 85,6 μmol = 8,0 equiv.) en 500 μl de dimetilacetamida seca (DMA). Se añadió una solución 1,0 M de hidrogenocarbonato de cesio en agua (17,12 μl , 1,6 equiv.) en una porción y la mezcla se agitó a temperatura ambiente.

Después de 1,5 h, se añadieron porciones adicionales de 17,12 μl (1,6 equiv.) de solución de carbonato de cesio.

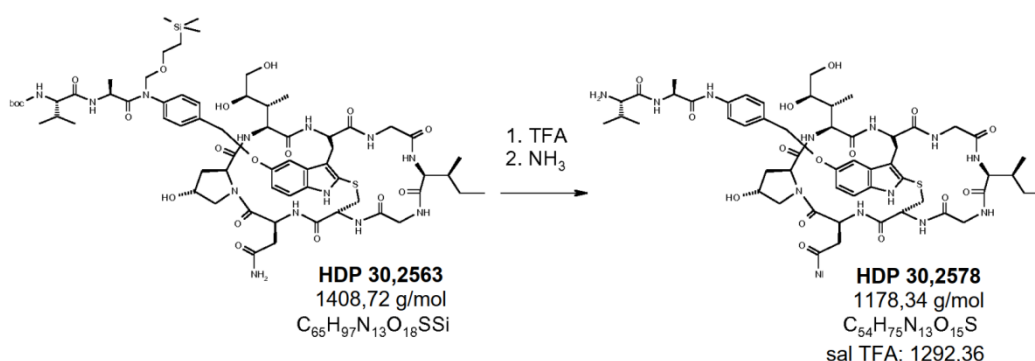
Después de 8 h la mezcla de reacción se neutralizó con

75

ácido acético, se pasó a través de un filtro centrífugo (0,2 µm) y se purificó por HPLC en una Phenomenex Luna-C₁₈(2), columna de 10 µm (250 x 21,2 mm) con un gradiente de (5-100 %) de acetonitrilo en agua. Las fracciones del producto se combinaron y se redujeron hasta 4,00 mg (26 %) de producto como un sólido amorfo.

EM (ESP) [M+Na]⁺ encontrado: 1430,58; calc.: 1430,65
(C₆₅H₉₇N₁₃NaO₁₈SSi)

10 Etapa 2: HDP 30,2378

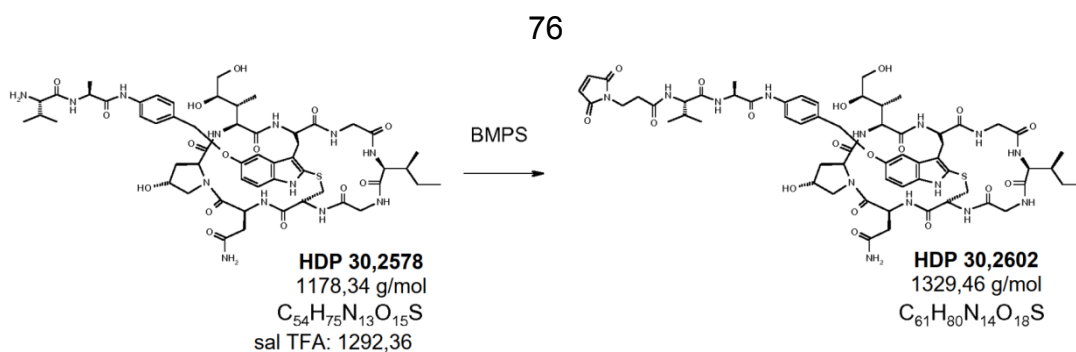


Se disolvió **HDP 30,2563** (7,53 mg, 5,34 µmol) en 500 µl de una mezcla de ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano 95:5:5. Después de 5 min, los volátiles se retiraron al vacío y el residuo se disolvió en 1000 µl de agua y se añadió gota a gota amoníaco al 3 % hasta que se alcanzó un pH de 10.

La solución se liofilizó y se purificó posteriormente en HPLC prep. (Phenomenex Luna-C₁₈(2), columna de 10 µm 250 x 21,2 mm, gradiente de 20-30 % en 16 min de acetonitrilo en agua (TFA al 0,05 %) para dar 3,95 mg (57 % basado en sal TFA) de producto.

EM (IEN⁺) [M+H]⁺ encontrado: 1178,50; calc.: 1178,53
(C₅₄H₇₆N₁₃O₁₅S)

Etapa 3 HDP 30,2602



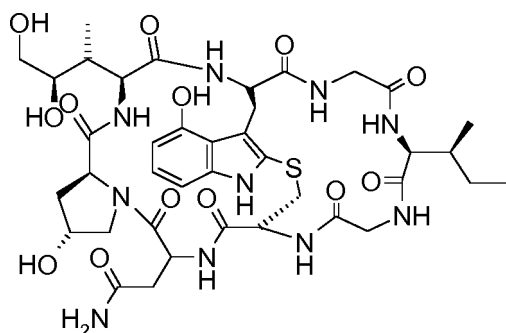
Se disolvió **HDP 30,2578** (3,95 mg, 3,06 μ mol) en 400 μ l de DMF seca.

5 Se añadieron éster N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(maleimido)propiónico (BMPS, 1,63 mg, 2 equiv.), disuelto en 81,4 μ l de DMF seguido de 2,1 μ l de (2 equiv.) de DIPEA.

Después de agitar durante 2 h la mezcla de reacción se
 10 pasó a través de un filtro centrífugo (0,2 μ m) y se purificó por RP-18 HPLC con un gradiente de acetonitrilo al 5-70 % en agua + TFA al 0,05 %. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad y se liofilizaron a partir de 2 ml de acetonitrilo/agua 1:1 para dar 2,73 mg (67 %) de producto en
 15 forma de un polvo incoloro.

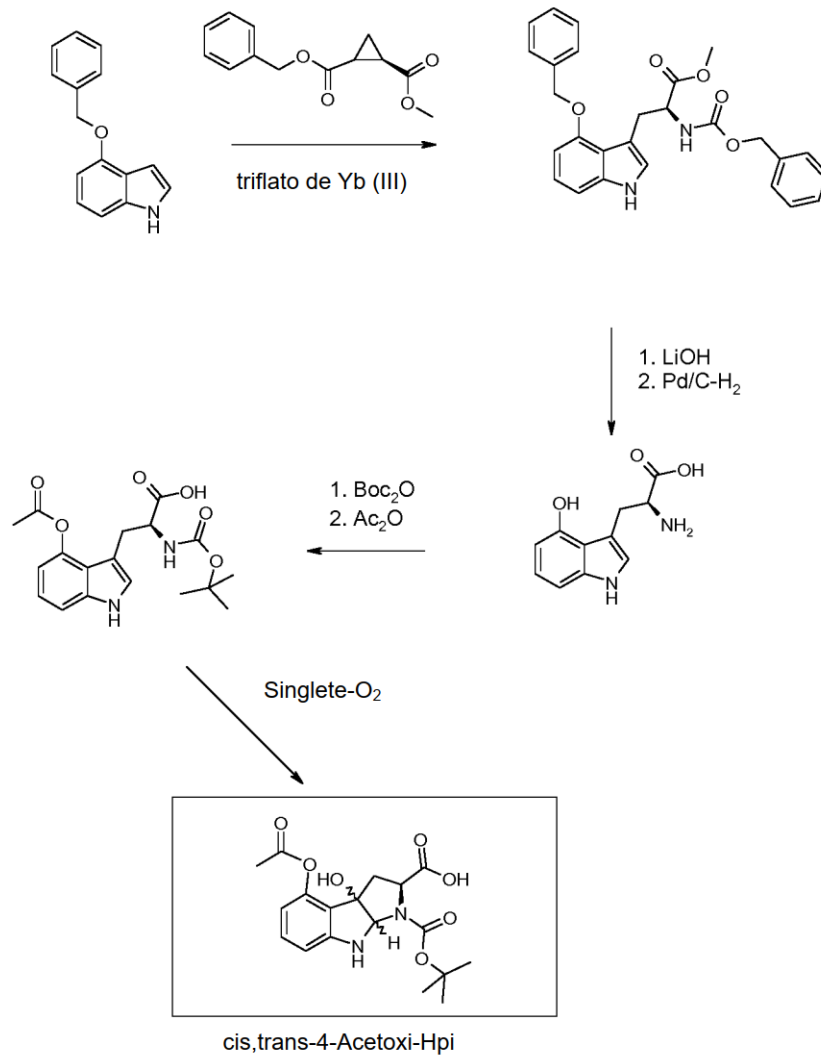
EM (IEN+) $[M+H]^+$ encontrado: 1329,33; calc.: 1329,56
 ($C_{61}H_{81}N_{14}O_{18}S$)

20 C. Síntesis total de S-desoxi-4'-hidroxi-amaninamida



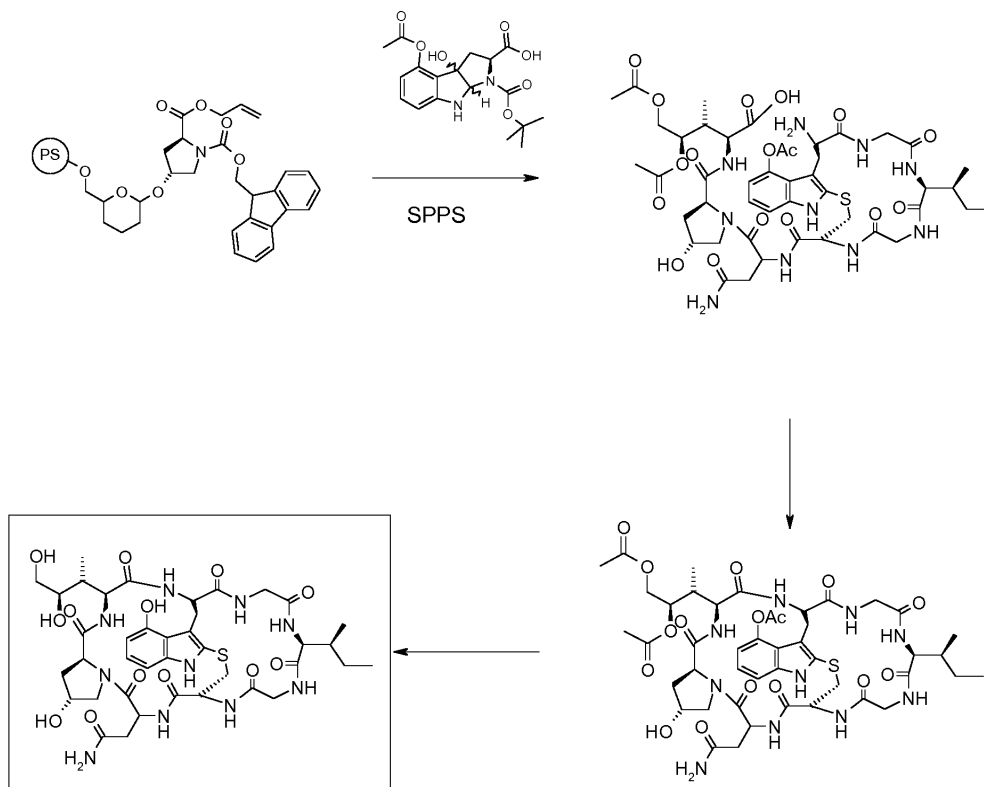
1. Vista esquemática de la síntesis de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-4-acetoxi-

1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol; cis- y trans
(cis,trans-4-Acetoxi-Hpi)



**2. Vista esquemática de la síntesis de S-desoxi-4'-hidroxi-
amaninamida**

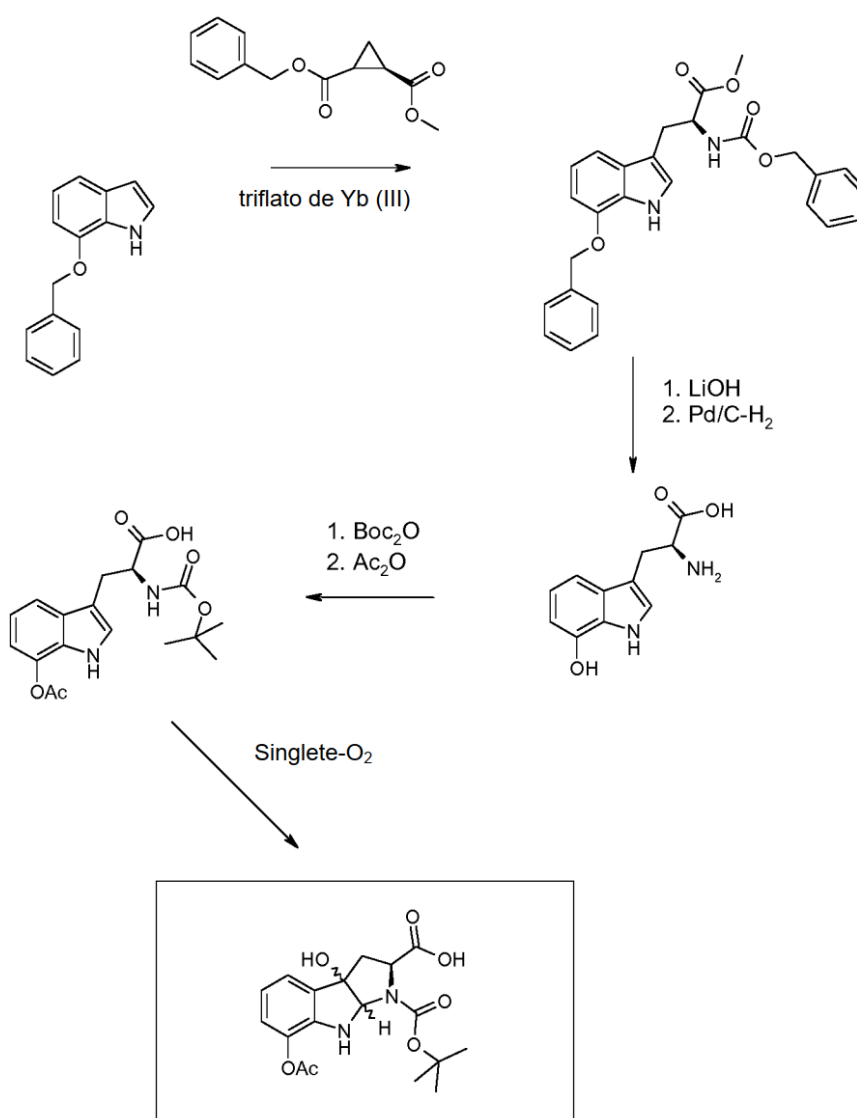
5



D. Síntesis total de S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida

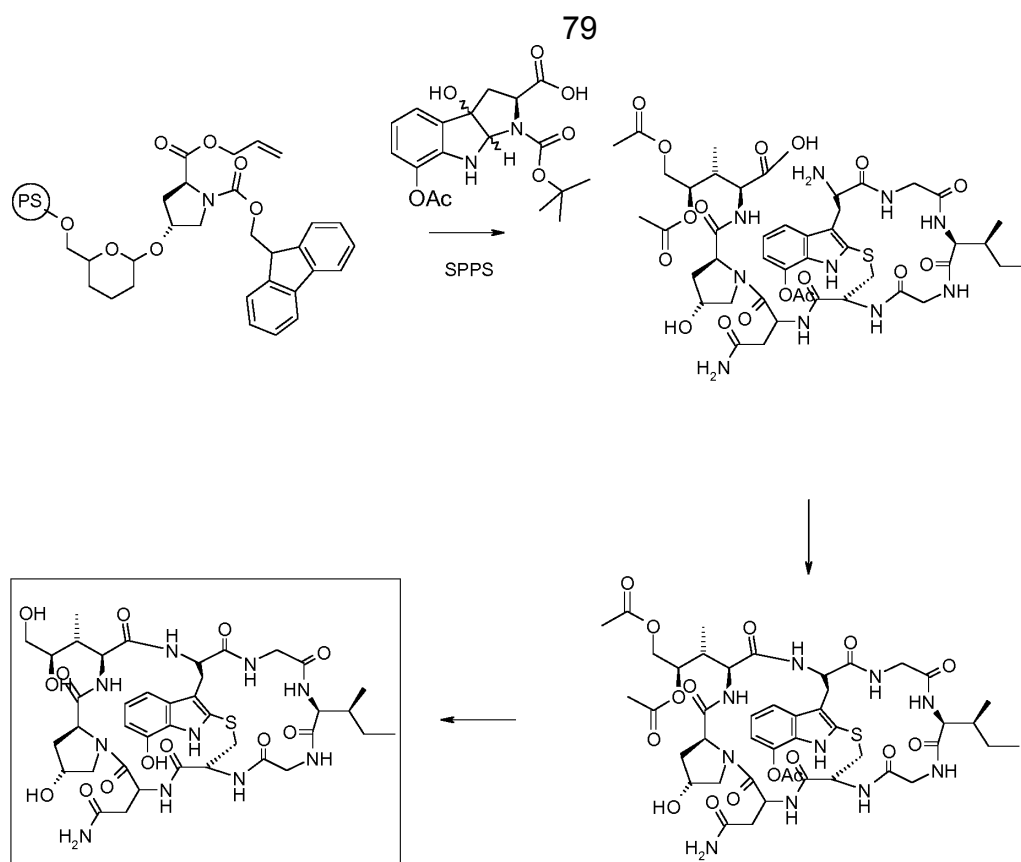
1. Síntesis de cis,trans-1-(terc-butoxicarbonil)-2-carboxi-3a-hidroxi-4-acetoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol; (cis,trans-4-acetoxi-Hpi)

5 La síntesis de cis,trans-7-acetoxi-Hpi se realiza de forma análoga a la síntesis de cis,trans-4-acetoxi-Hpi partiendo de 7-hidroxi-L-triptófano disponible en el mercado en lugar de 4-hidroxi-L-tripotófano.



10 2. Vista esquemática de la síntesis de S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida

15 La síntesis de S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida se realiza de manera análoga a la síntesis de S-desoxi-4'-hidroxi-amaninamida usando cis,trans-7-acetoxi-Hpi en lugar de cis,trans-4-acetoxi-Hpi.



6. Citotoxicidad *in vitro* de S-desoxi- α -amanitina HDP 30,0735 y S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida HDP 30,2548

5 Ensayo de proliferación celular BrdU en células HEK293 y HEK293 OATP1B3.

Las placas de cultivo celular HEK293-OATP1B3 se recubrieron con poli-D-lisina.

10

Recubrimiento con poli-D-lisina:

- o 5 mg de poli D-lisina en 50 ml de agua estéril
 - o 50 μ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos
 - o Incubación durante 1 hora a TA
- 15
- o Lavar los pocillos dos veces con 200 μ l de agua estéril
 - o Secado durante al menos 2 horas (TA)

Se prepararon placas negras de 96 pocillos con fondo transparente con $2,0 \times 10^3$ células HEK293 y HEK293

20 OATP1B3/pocillo y 90 μ l de medio de crecimiento por pocillo,

incluyendo FCS al 10 % y suplementos. Controles: Se estableció el "blanco" con 100 µl de medio sin células, el "fondo" y el "100 %" se establecieron con células en 100 µl de medio.

- 5 • Incubación durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Esquema de dilución de HDP 30,0735, HDP 30,2548 y alfa-amanitina:

Las soluciones madre se diluyeron a 1:1000 (dilución de 1:10 y de 1:100) en medio:

- 10 10 µl de solución madre de derivado de amanitina ($1,0 \times 10^{-2}$ M) + 90 µl de PBS =

100 µl a $1,0 \times 10^{-3}$ M

Dilución de 2 µl + 198 µl de medio = 200 µl a 1×10^{-5} M

Diluciones adicionales:

- 15 A: 200 µl a $1,0 \times 10^{-5}$ M

B: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución A (dilución de 1:5)

C: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución B (dilución de 1:5)

- 20 D: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución C (dilución de 1:5)

E: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución D (dilución de 1:5)

F: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución E (dilución de 1:5)

- 25 G: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución F (dilución de 1:5)

H: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución G (dilución de 1:5)

- 30 Se añadieron 10 µl de cada solución a los triplicados de los pocillos.

Volumen final: 100 µl/pocillo

Dosis final: inicial de 1×10^{-6} M: serie de dilución de 1:5.

- Incubación durante 96 h a 37 °C y CO₂ al 5 %.

5

- Después de 96 h: Ensayo de proliferación celular de Roche, luminiscente según las instrucciones del fabricante.

- Se determinaron las concentraciones CE₅₀ con el programa informático de análisis de datos Graphpad Prism 4.0.

10

7.: Síntesis de los conjugados HDP 30,2347, HDP 2371 y 30.2602

Ejemplo: Síntesis de T-D265C-30.2371:

Se usaron 10 mg de Tiomab T-D265C en tampón PBS para la conjugación con HDP 30,2371.

15

Ajuste de la solución de anticuerpos a EDTA 1 mM:

2 ml de solución de anticuerpo (10,0 mg) + 20 µl de EDTA 100 mM, a pH 8,0

Cantidad de anticuerpos: 10 mg = $6,9 \times 10^{-8}$ mol

Destapado de cisteínas por reacción de anticuerpos con 40

20

eq. de TCEP:

- 2 ml de solución de anticuerpos ($6,9 \times 10^{-8}$ mol) + 55,2 µl de solución de TCEP 50 mM ($2,76 \times 10^{-6}$ mol)

- Incubar durante 3 horas a 37 °C en un agitador.

- Dos diálisis consecutivas a 4 °C en 2,0 l x PBS, EDTA 1 mM, a pH 7,4 en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 MWCO, primera diálisis de aprox. 4 h, segunda diálisis durante la noche

25

Oxidación por reacción del anticuerpo con 20 eq. de ácido deshidroascórbico (dhAA):

30

- aprox. 2 ml de solución de anticuerpos ($6,9 \times 10^{-8}$ mol) + 27,6 µl de solución de dhAA 50 mM fresca ($1,38 \times 10^{-6}$ mol)

- Incubar durante 3 h a TA en un agitador.

Conjugación con amanitina usando 6 eq. de HDP 30,2371 e inactivación con 25 eq. de N-acetil-L-cisteína:

Solubilizar 2 mg de HDP 30,2371 en 200 μ l de DMSO = 10 μ g/ μ l

- 5 - aprox. 2 ml de solución de anticuerpo (= 9,5 mg; $6,53 \times 10^{-8}$ mol) + **52,1 μ l** de HDP 30,2371 (= 520,8 μ g; $3,92 \times 10^{-7}$ mol).
- Incubar 1 hora a TA.
- Enfriar mediante la adición de 16,3 μ l de N-acetil-L-cisteína 100 mM ($1,63 \times 10^{-6}$ mol).
- 10 - Incubar 15 minutos a TA (o durante la noche a 4 °C).
- Purificar la mezcla de reacción con 1x columnas de PD-10 equilibradas con PBS a 1x, a pH 7,4. Identificar las fracciones que contienen proteínas con el reactivo de Bradford en parafilm y poner juntas las fracciones que
- 15 contienen proteínas.
- Diálisis de la solución de anticuerpos a 4 ° C durante la noche en 2,0 l de PBS, a pH 7,4 y casetes de diálisis Slide-A-Lyzer 20.000 MWCO.

Determinación del DAR por análisis de LC-ESI-MS.

- 20 Ajustar la concentración de proteína a 5,0 mg/ml ($3,4 \times 10^{-5}$ M) y llevar a condiciones estériles por filtración. Almacenar a 4 °C.

Los CAF con un anticuerpo diferente o con un derivado de amanitina diferente se produjeron en consecuencia. La cantidad molecular de anticuerpo se calculó de acuerdo con el PM del respectivo anticuerpo. Las cantidades de toxina enlazadora, TCEP, dhAA, N-acetil-L-cisteína se ajustaron en consecuencia para alcanzar los respectivos equivalentes.

8. Citotoxicidad *in vitro* de los conjugados HDP 30,2347, HDP 2371 y 30.2602

Ensayo de proliferación celular BrdU en células SKBR-3, JIMT-

1, LnCap y 22rv1:

El ensayo se realizó como se describió anteriormente (6.)
con los siguientes cambios:

Las placas de cultivo celular no estaban recubiertas con
5 poli-D-lisina.

- Esquema de dilución de los CAF:
- Las soluciones madre se diluyeron a $1,0 \times 10^{-6}$ M en medio de crecimiento

Diluciones adicionales:

- 10 A: 100 μ l a $1,0 \times 10^{-6}$ M
- B: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución A
(dilución de 1:5)
- C: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución B
(dilución de 1:5)
- 15 D: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución C
(dilución de 1:5)
- E: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución D
(dilución de 1:5)
- F: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución E
20 (dilución de 1:5)
- G: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución F
(dilución de 1:5)
- H: 80 μ l de medio de crecimiento + 20 μ l de solución G
(dilución de 1:5)
- 25 • Se añadieron 10 μ l de cada solución a triplicados de pocillos. Volumen final: 100 μ l/pocillo. Dosis final: inicial de 1×10^{-7} M; serie de dilución de 1:5

Ensayo WST-I en células Raji y células Nalm-6:

- Se prepararon placas transparentes de 96 pocillos con fondo
30 en F con $2,0 \times 10^3$ células/pocillo y 90 μ l del respectivo medio de crecimiento por pocillo, incluyendo FCS al 10 % y

suplementos. Controles: Se estableció el "blanco" con 100 µl de medio sin células; las "células solas" se establecieron con células en 100 µl de medio.

- Incubación durante 24 h a 37 °C y CO₂ al 5 %.

5 • Esquema de dilución de los CAF:

- Las soluciones madre se diluyeron a $1,0 \times 10^{-6}$ M en medio de crecimiento

Diluciones adicionales:

A: 100 µl a $1,0 \times 10^{-6}$ M

10 B: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución A
(dilución de 1:5)

C: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución B
(dilución de 1:5)

15 D: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución C
(dilución de 1:5)

E: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución D
(dilución de 1:5)

F: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución E
(dilución de 1:5)

20 G: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución F
(dilución de 1:5)

H: 80 µl de medio de crecimiento + 20 µl de solución G
(dilución de 1:5)

25 • Se añadieron 10 µl de cada solución a triplicados de pocillos. Volumen final: 100 µl/pocillo. Dosis final: inicial de 1×10^{-7} M; serie de dilución de 1:5

- Incubación durante 96 h a 37 °C y CO₂ al 5 %.

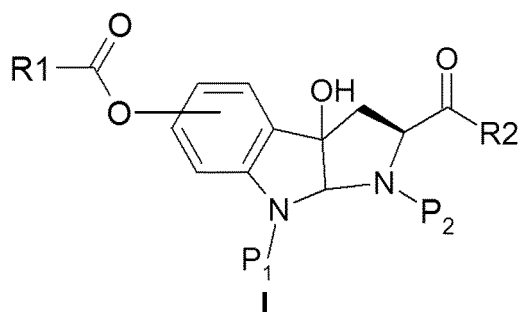
- Después de 96 h: Ensayo de proliferación celular Roche WST-1 según las instrucciones del fabricante.

30 • Se determinaron las concentraciones CE₅₀ con el programa informático de análisis de datos Graphpad Prism 4.0.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado sustituido con hidroxí de 2-carboxi-3a-hidroxí-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de acuerdo

5 con la Fórmula I



en donde R1 se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido; P₁ es hidrógeno o un grupo protector;

10 P₂ es hidrógeno o un grupo protector, particularmente un grupo protector; y

R2 se selecciona entre OH, OR1 y una cadena de polipéptido que consiste en 1-7 residuos de aminoácidos.

15 2. El derivado sustituido con hidroxí de 2-carboxi-3a-hidroxí-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de la reivindicación 1, en donde el grupo protector, cuando está presente, se selecciona independientemente entre Boc, PhCH₂OCO-, CH₂=CHCH₂O-CO- y tritilo.

20

3. El derivado sustituido con hidroxí de 2-carboxi-3a-hidroxí-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de la reivindicación 1 o 2, en donde el sustituyente R1-C(=O)-O- está unido a la posición 5 en la Fórmula I.

25

4. El derivado sustituido con hidroxí de 2-carboxi-3a-hidroxí-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de la

reivindicación 1 o 2, en donde el sustituyente R1-C(=O)-O- está unido a la posición 6 en la Fórmula I.

5. Un método para la síntesis de un precursor lineal que
5 comprende ocho residuos de aminoácidos de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende la etapa de usar un derivado sustituido con hidroxide 2-carboxi-3a-hidroxide 1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la
10 síntesis peptídica de dicho precursor.

6. Un método para la síntesis de un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que comprende las etapas de
15 (i) provocar o permitir la formación de un enlace entre el residuo de cisteína y el resto triptófano del precursor lineal de la reivindicación 5; y
(ii) provocar o permitir la formación de dicho derivado de amanitina haciendo reaccionar el extremo N del precursor lineal
20 de la reivindicación 5 con el extremo C de dicho precursor.

7. El método de la reivindicación 6, que comprende además la oxidación del átomo de azufre del resto cisteína para formar un sulfóxido o una sulfona, particularmente un sulfóxido.

25

8. Un derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado, que se selecciona entre (i) S-desoxi-4'-hidroxiamanina, 4'-hidroxiamanina, S-desoxi-5'-hidroxiamanina, 5'-hidroxiamanina, S-desoxi-7'-hidroxiamanina, 7'-hidroxiamanina, (ii) S-desoxi-4'-hidroxiamaninamida, 4'-hidroxiamaninamida, S-desoxi-5'-hidroxiamaninamida, 5'-hidroxiamaninamida,

30

amaninamida, S-desoxi-7'-hidroxi-amaninamida y 7'-hidroxi-amaninamida, (iii) un derivado de amanitina de acuerdo con (i), en donde el resto de ácido carboxílico libre del aminoácido 1 se convierte en un éster carboxílico $-C(=O)OR_1$ o en un resto $-C(=O)NH-OR_1$, en donde R_1 se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido.

9. El derivado de amanitina de la reivindicación 8, que se selecciona entre S-desoxi-5'-hidroxi-amanina 5'-hidroxi-amanina, S-desoxi-5'-hidroxi-amaninamida y 5'-hidroxi-amaninamida.

10. Un conjugado que comprende (a) derivado de amanitina que comprende un resto triptófano hidroxilado de la reivindicación 8 o 9; (b) un resto de unión al objetivo; y (c) opcionalmente un enlazador que une dicho derivado de amanitina y dicho resto de unión al objetivo.

11. Una composición farmacéutica que comprende el derivado de amanitina de la reivindicación 8 o 9 o el conjugado de la reivindicación 10.

12. El derivado de amanitina de la reivindicación 8 o 9, el conjugado de la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en particular, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de

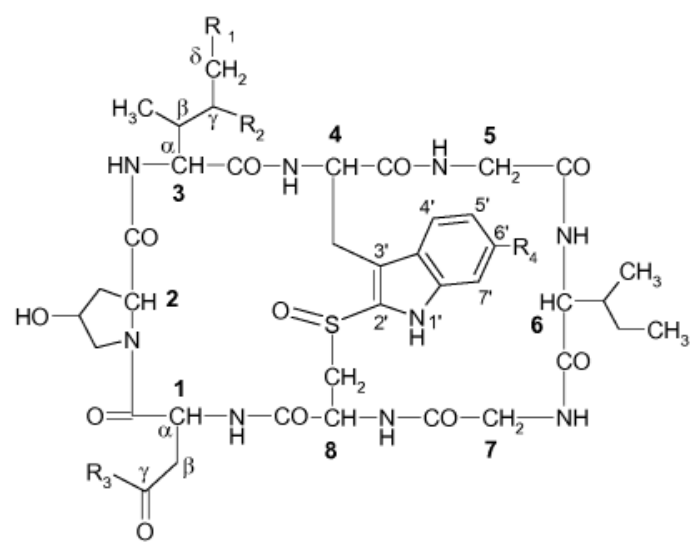
riñón, melanoma maligno, leucemia y linfoma maligno.

13. Una construcción que comprende (a) un derivado de amanitina de la reivindicación 8 o 9; y (b) un resto enlazador
- 5 que lleva un grupo reactivo Y para unir dicho derivado de amanitina a un resto de unión a la diana.

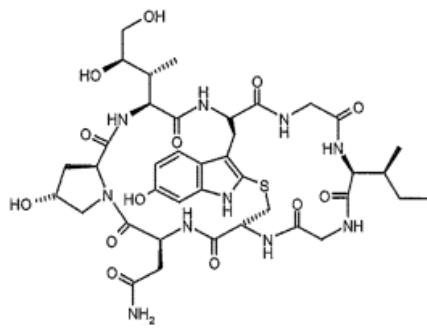
NUEVO MÉTODO PARA SINTETIZAR AMANITINAS

5 La invención se refiere a nuevos métodos para sintetizar
derivados de amanitina que tienen un grupo hidroxilo unido al
resto de triptófano central. La invención se refiere además a
nuevos derivados de amanitina que tienen un grupo hidroxilo
unido a la posición 4', 5' o 7' del resto de triptófano central,
10 a nuevos conjugados de tales derivados de amanitina, y a
composiciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados.

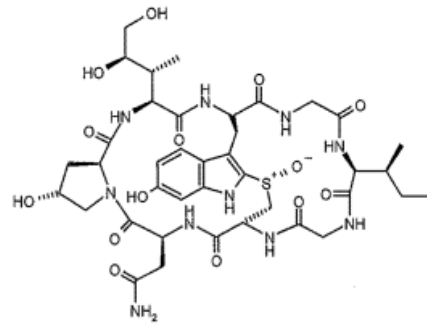
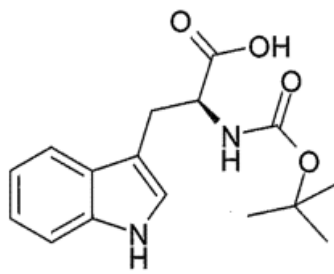
Figura 1:



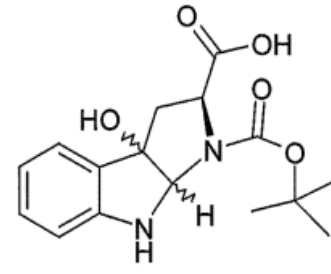
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-amanitina	OH	OH	NH ₂	OH
β-amanitina	OH	OH	OH	OH
γ-amanitina	H	OH	NH ₂	OH
ε-amanitina	H	OH	OH	OH
amanina	OH	OH	OH	H
amaninamida	OH	OH	NH ₂	H
amanulina	H	H	NH ₂	OH
ácido amanúlico	H	H	OH	OH
γ-amanina	H	OH	OH	H
γ-amaninamida	H	OH	NH ₂	H

Figura 2:

HDP 30,0735

 α -Amanitina**Figura 3:**

Boc-L-triptófano



HDP 30,0079

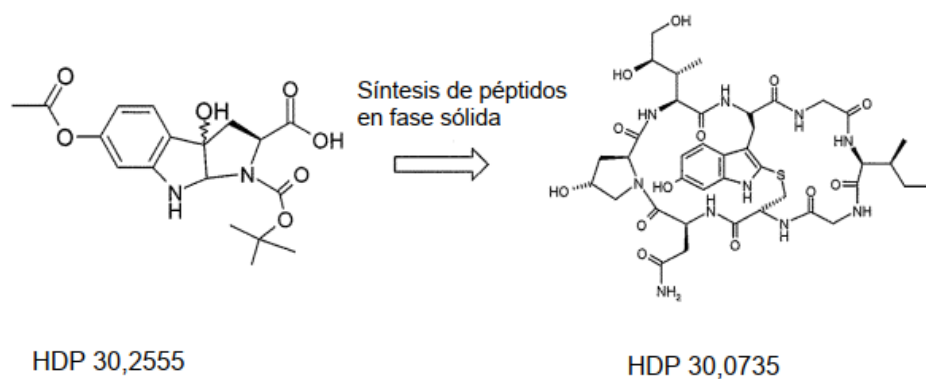
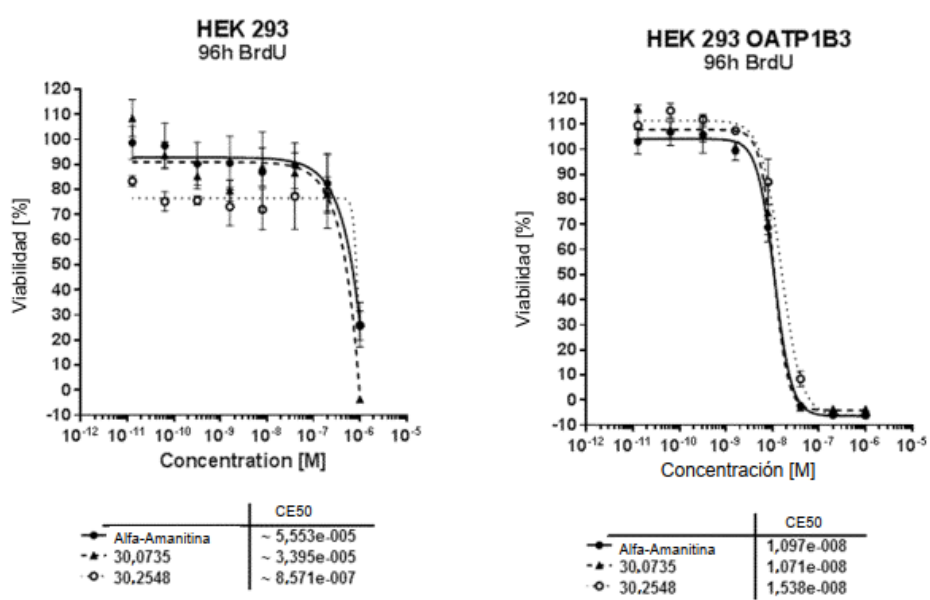
**Figura 5:**

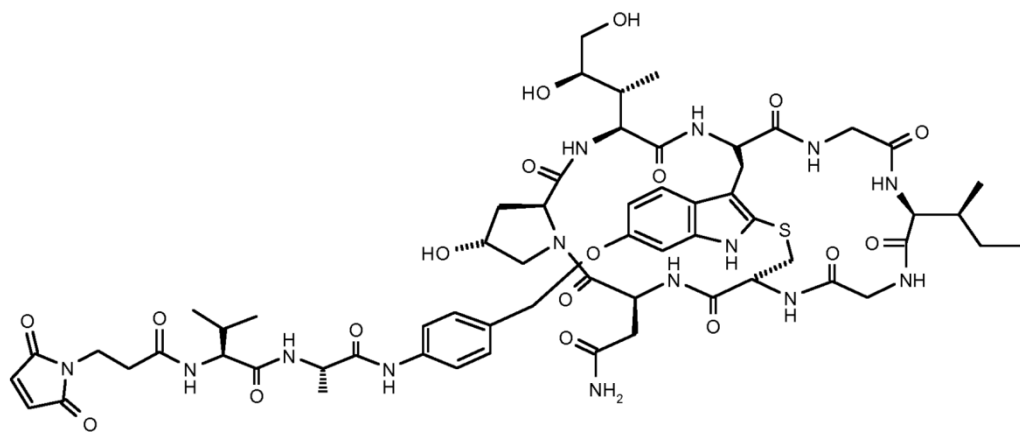
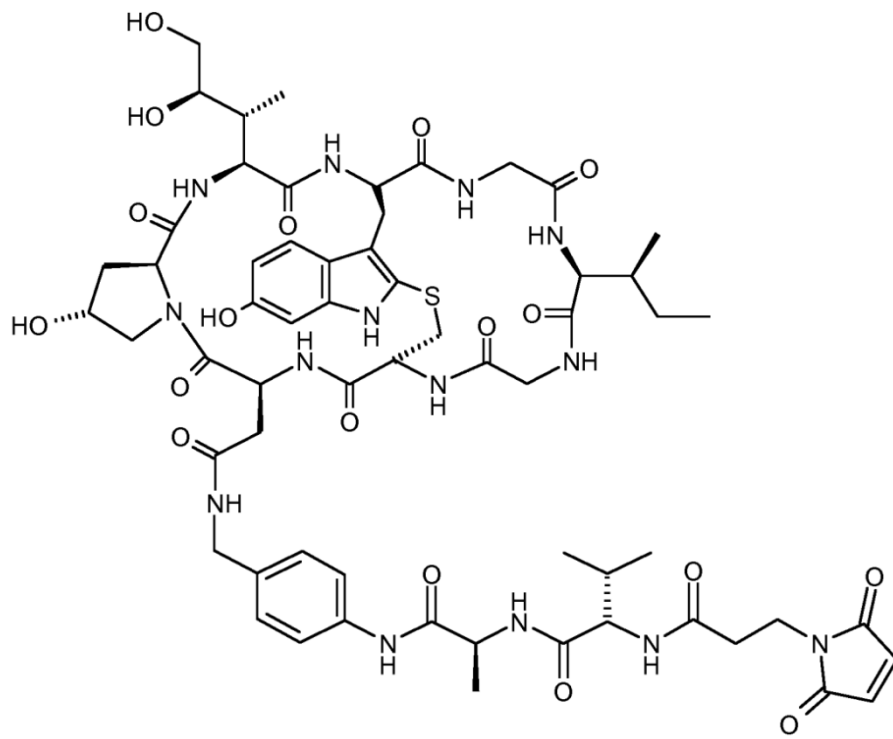
Figura 6 :**HDP 30,2371**

Figura 7 :



HDP 30,2347

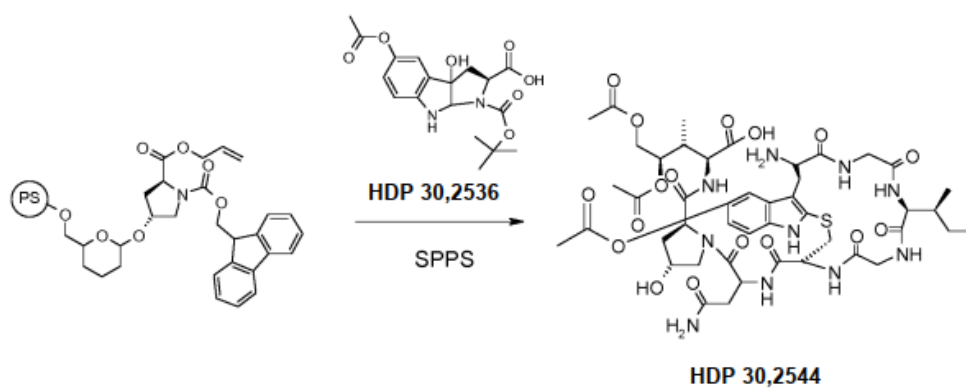
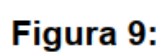


Figure 10:

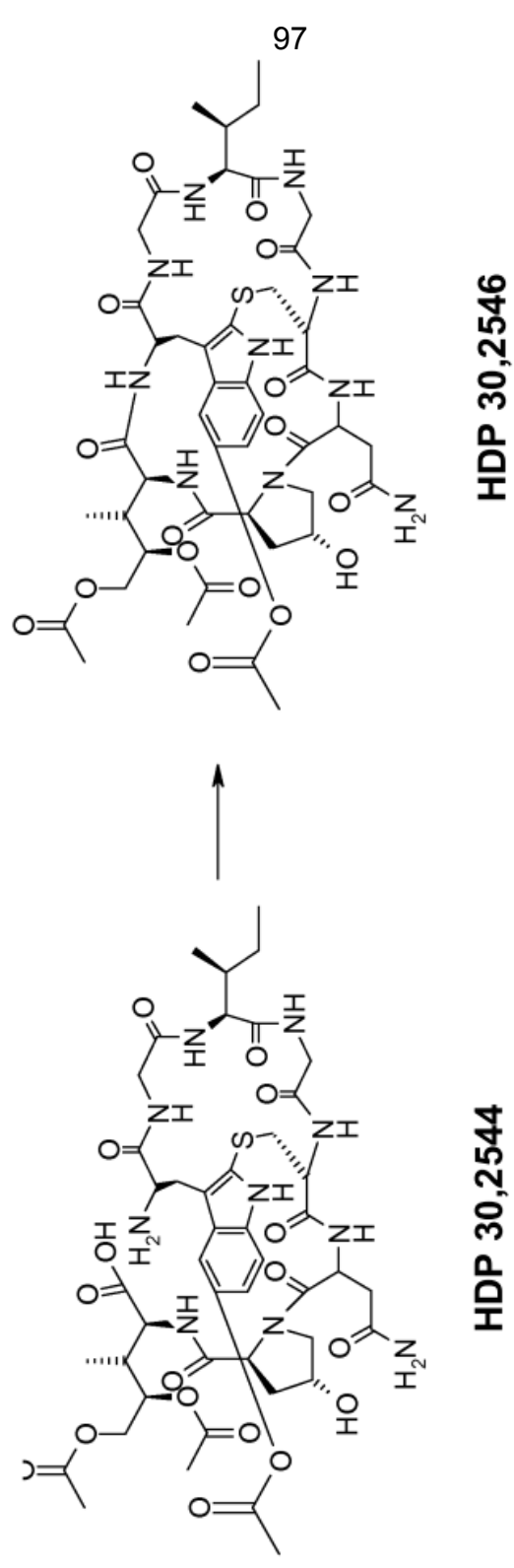
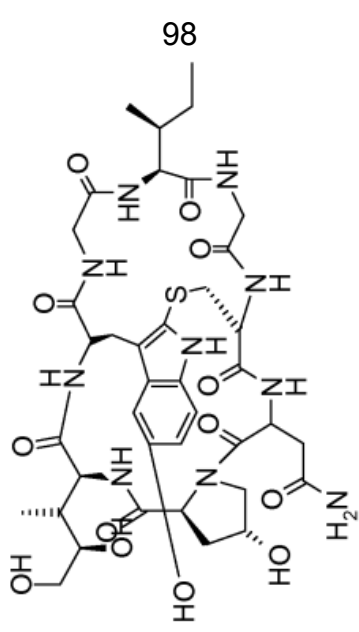
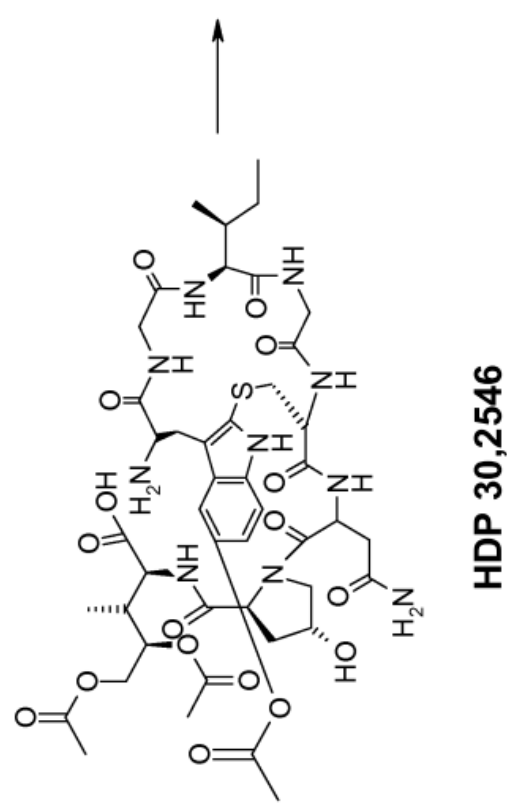


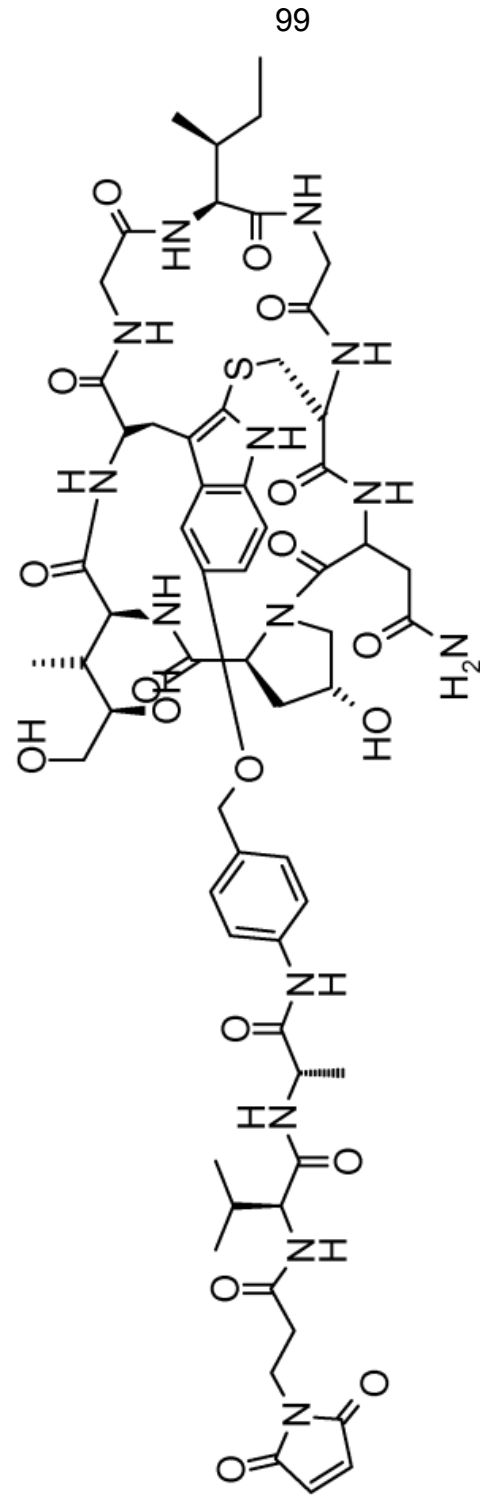
Figura 11:



HDP 30,2548

HDP 30,2546

Figura 12:



HDP 30,2602

Figura 13, A):

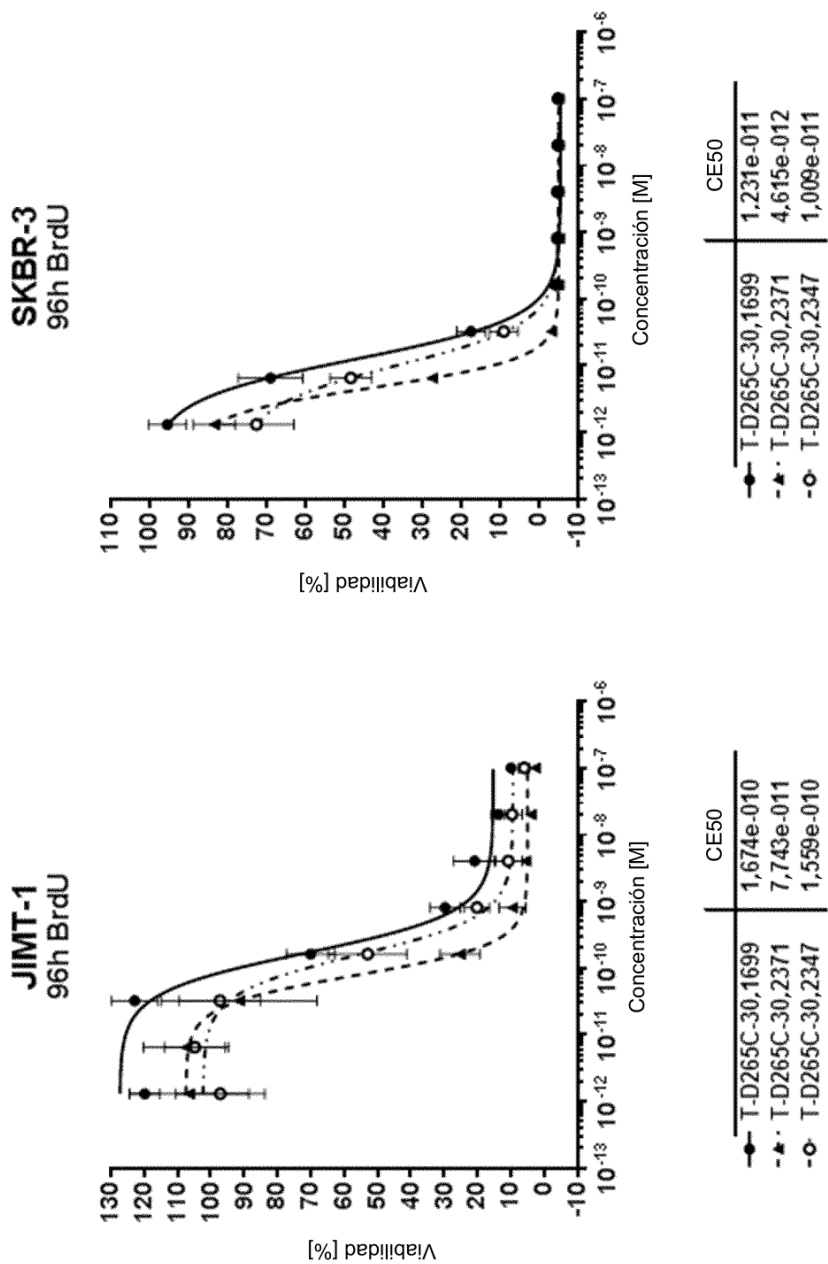


Figura 13, B):

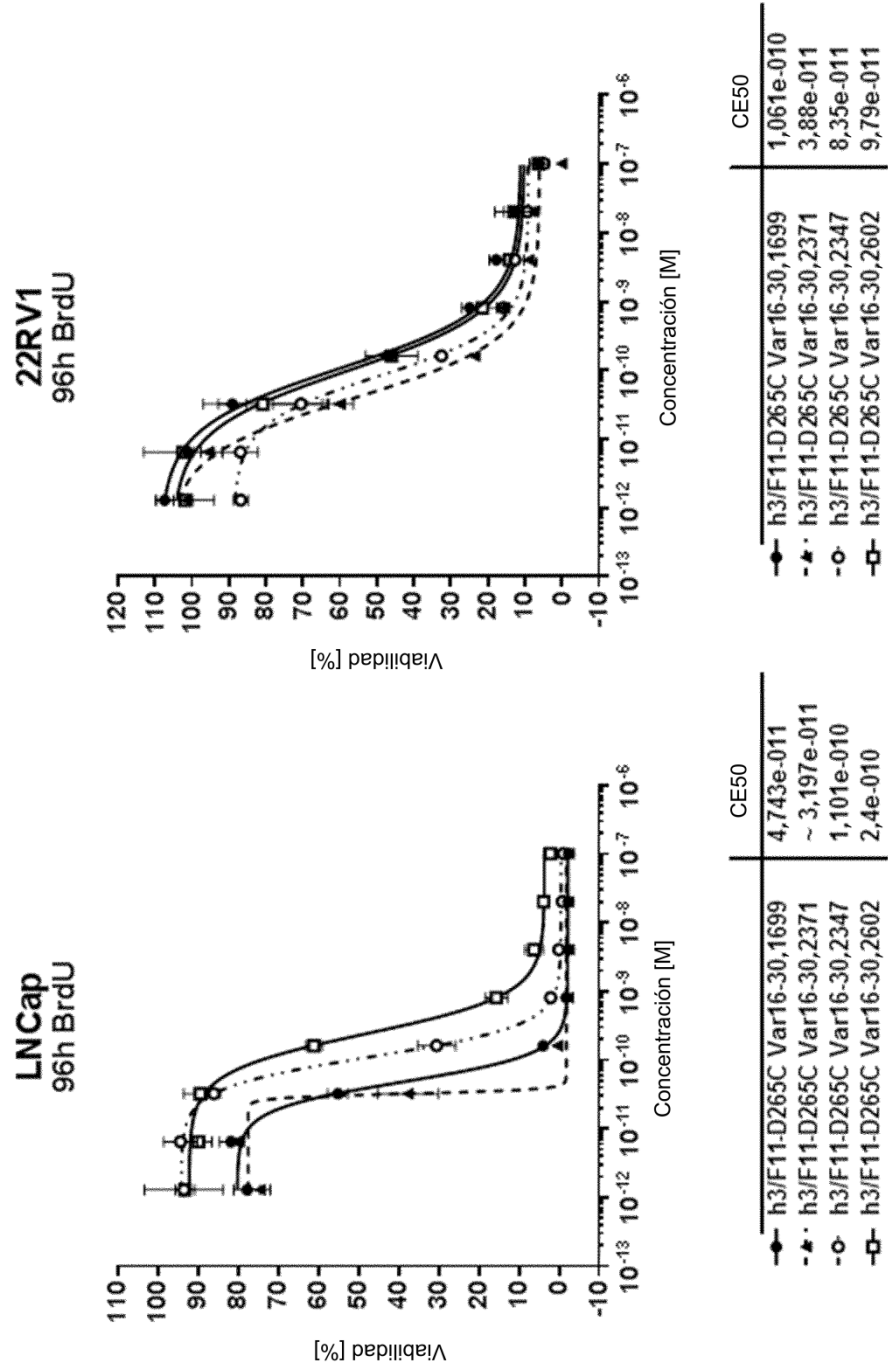


Figura 13, C):

