



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 739**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03788251 .1**

96 Fecha de presentación : **05.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1542723**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **Reticulantes con elevada reactividad y solubilidad y su uso en la preparación de conjugados para el suministro dirigido de fármacos de molécula pequeña.**

30 Prioridad: **16.08.2002 US 403652 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **ImmunoGen, Inc.**
830 Winter Street
Waltham, Massachusetts 02451, US

72 Inventor/es: **Widdison, Wayne, Charles**

74 Agente: **Ruo Null, Alessandro**

ES 2 361 739 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reticulantes con elevada reactividad y solubilidad y su uso en la preparación de conjugados para el suministro dirigido de fármacos de molécula pequeña

5

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/403.652, presentada el 16 de agosto de 2002.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

[0002] La presente invención se refiere a un método mejorado para preparar conjugados de agentes de unión celular y fármacos de molécula pequeña, especialmente agentes citotóxicos.

15

[0003] La presente invención también se refiere a nuevos reticulantes bifuncionales y métodos para preparar agentes de unión celular que comprenden un reticulante capaz de reaccionar con fármacos de molécula pequeña. El método mejorado para preparar conjugados proporciona a los conjugados enlaces disulfuro estéricamente impedidos para potenciar la estabilidad *in vivo* del enlace disulfuro y, inesperadamente, tiene una velocidad de reacción aumentada con fármacos de molécula pequeña que albergan un grupo tiol libre. La reacción es aproximadamente 12 veces más rápida que con los reticulantes descritos previamente.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

25

[0004] El reactivo de modificación bifuncional 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) se ha usado para unir dos proteínas juntas a través de un enlace disulfuro. El reactivo se hace reaccionar con la primera proteína para introducir un grupo que contiene disulfuro activo en la etapa de modificación. Una segunda proteína, que contiene un grupo tiol libre, se añade después para formar un enlace disulfuro entre las dos proteínas en la etapa de conjugación. Se han descrito muchos derivados de SPDP y versiones imida de SPDP (patente de Estados Unidos 4.563.304; J. Carlsson et al. 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Goff D. A., Carroll, S. F. 1 BioConjugate Chem. 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 J. Pharm. Sci. 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997)).

30

35

[0005] Se han descrito conjugados de agentes de unión celular con fármacos altamente citotóxicos (patentes de Estados Unidos N° 5.208.020 y 5.416.064; R.V.J. Chari et al., 52 Cancer Res. 127-131 (1992)). En estos conjugados, los agentes de unión celular primero se modifican con un agente bifuncional tal como SPDP para introducir un resto disulfuro activo. La reacción con un fármaco citotóxico que contiene tiol proporciona un conjugado en el que el agente de unión celular, tal como un anticuerpo monoclonal, y el fármaco se unen mediante enlaces disulfuro. Para potenciar la estabilidad *in vivo* de este enlace disulfuro, es importante para proporcionar enlaces disulfuro estéricamente impedidos. Este objetivo puede conseguirse usando reticulantes que albergan uno o dos sustituyentes metilo en el átomo de carbono geminal al enlace disulfuro o usando fármacos que albergan uno o dos sustituyentes metilo en el átomo de carbono que alberga el sustituyente tiol. Sin embargo, la introducción de dichos enlaces disulfuro impedidos sobre agentes de unión celular o tioles impedidos sobre los fármacos provoca una marcada disminución en la velocidad de reacción del fármaco que contiene tiol y el agente de unión celular. Por tanto, los procesos para la producción de conjugados llegan a ser imposibles, o muy costosos en tiempo y poco rentables. Además, el prolongado tiempo de reacción causa dimerización no deseada del fármaco que contiene tiol y la consiguiente pérdida de reactividad y bajos rendimientos de producto. En el caso de anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, las lentas velocidades de reacción del intercambio de disulfuro entre el enlace disulfuro impedido y el fármaco que contiene tiol conduce a la reacción secundaria indeseada de la escisión del enlace disulfuro entre las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o fragmento.

40

45

50

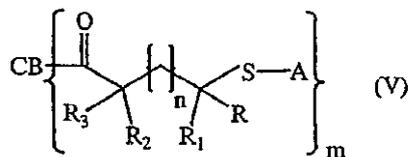
55

[0006] Por tanto, existe la necesidad de proporcionar reticulantes que proporcionarán una velocidad de reacción acelerada de la reacción de intercambio de disulfuro entre el agente de unión celular modificado y el sustituyente tiol sobre el fármaco citotóxico. Además, como los agentes de unión celular, tales como los anticuerpos monoclonales, son solamente solubles en soluciones acuosas, también es deseable proporcionar reticulantes que sean solubles en agua o requieran solamente un pequeño porcentaje (<5% v/v) de un disolvente orgánico para mantener la solubilidad en soluciones acuosas.

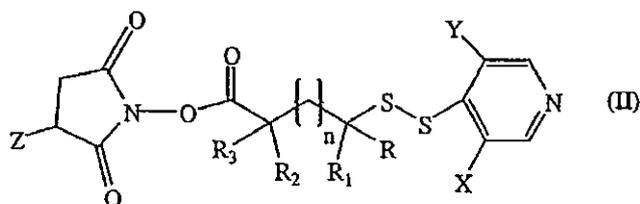
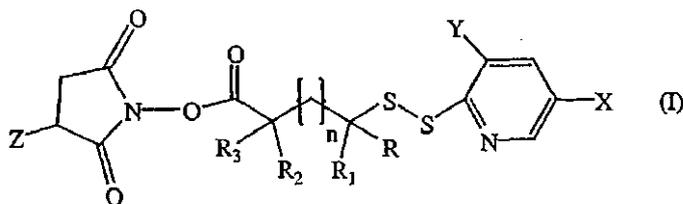
60

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

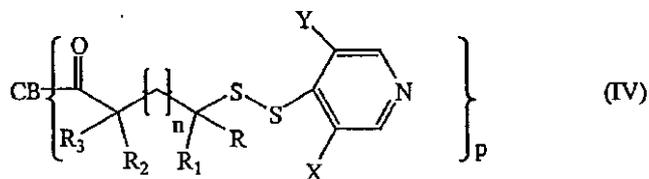
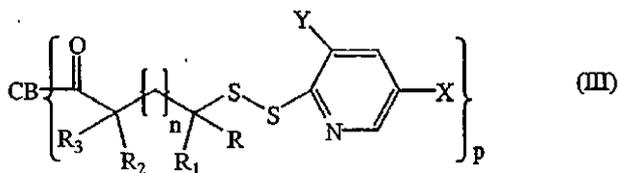
[0007] La presente invención cumple estos y otros objetos proporcionando un método para preparar un conjugado que comprenda un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, donde dicho conjugado está representado por la fórmula (V):



5 en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, y m es un número entero de 1 a 10 o más, comprendiendo dicho método:
 (1) hacer reaccionar el agente de unión celular con un reticulante de fórmula (I) o (II):



10 en las que X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂, con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, para dar de este modo un compuesto de fórmula (II) o (IV), respectivamente:

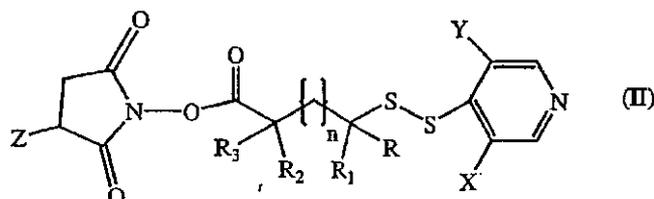
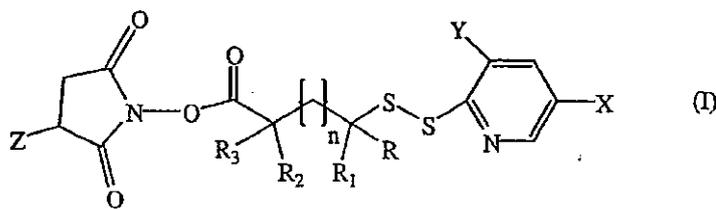


15 en las que p representa un número entero de 1 a 10 o más, y
 (2) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) o (IV) con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.

20 **[0008]** La invención también proporciona un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, donde dicho conjugado está representado por la fórmula (V), comprendiendo dicho método: hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) o (IV), con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.

25 **[0009]** En una realización preferida, el agente de unión celular es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el fármaco de molécula pequeña es un agente citotóxico.

[0010] La invención también proporciona un reticulante de fórmula (I) o (II):



5 en las que R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son CONR₄R₅ o NO₂, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃^{M+} o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, con la condición de que cuando X y/o Y es NO₂, Z no sea H.

10 **[0011]** La invención proporciona adicionalmente un método para preparar un agente de unión celular que comprende un enlazador capaz de unir el agente de unión celular a un fármaco de molécula pequeña, comprendiendo el agente de unión celular un enlazador que está representado por la fórmula (III) o (IV), que comprende hacer reaccionar el agente de unión celular con un reticulante de fórmula (I) o (II), respectivamente.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

20 **[0012]** La Figura 1 muestra la síntesis de reactivos reticulantes heterobifuncionales que contienen un grupo 2-(nitropiridil)-disulfuro o un grupo 2-(dinitropiridil)-disulfuro y un éster de ácido carboxílico reactivo. Primero se hace reaccionar un compuesto de ácido mercapto-carboxílico con un compuesto 2,2'-di(nitropiridil)-disulfuro o 2,2'-di(dinitropiridil)-disulfuro y el resto de ácido carboxílico después se esterifica con *N*-hidroxisuccinimida o *N*-hidroxisulfosuccinimida. Como ejemplo, el 1,3-dibromobutano se convirtió en ácido 4-mercaptopentanoico, que después se convirtió en el reactivo reticulante correspondiente.

25 **[0013]** La Figura 2 muestra la síntesis de los agentes reticulantes heterobifuncionales *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butirato (SNPB) y *N*-sulfosuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butirato (SSNPB), derivados del ácido 4-mercaptobutírico. El SPDB es un ejemplo de referencia y no forma parte de la presente invención.

30 **[0014]** La Figura 3 muestra la síntesis de los agentes reticulantes heterobifuncionales *N*-succinimidil-4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato (SMNP), y *N*-sulfosuccinimidil-4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato (SSMNP) derivados del ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico.

35 **[0015]** La Figura 4 muestra la síntesis de los reactivos reticulantes heterobifuncionales que contienen un grupo 2-(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro o un grupo 2-(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro y un éster de ácido carboxílico reactivo. Primero se hace reaccionar un compuesto de ácido mercapto-carboxílico con un compuesto 2,2'-di(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro y el resto de ácido carboxílico después se esterifica con *N*-hidroxisuccinimida o *N*-hidroxisulfosuccinimida. Como ejemplo, se muestra la síntesis de los agentes reticulantes heterobifuncionales *N*-succinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butirato (SCPB) y *N*-sulfosuccinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butirato (SSCPB), derivados del ácido 6,6-ditiodinicotínico.

40 **[0016]** La Figura 5 muestra la síntesis de los reactivos reticulantes heterobifuncionales que contienen un grupo 4-(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro o un grupo 4-(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro y un éster de ácido carboxílico reactivo. Primero se hace reaccionar un compuesto de ácido mercapto-carboxílico con un compuesto 4,4'-di(*N,N*-dialquilcarboxamidopiridil)-disulfuro y el resto de ácido carboxílico después se esterifica con una *N*-hidroxisuccinimida o *N*-hidroxisulfosuccinimida. Como ejemplo, se muestra la síntesis de los agentes reticulantes heterobifuncionales *N*-succinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-4-piridilditio)butirato y *N*-sulfosuccinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-4-piridilditio)butirato.

50 **[0017]** La Figura 6 muestra la síntesis de los reactivos reticulantes heterobifuncionales que contienen un grupo 4-(nitropiridil)-disulfuro o un grupo 4-(dinitropiridil)-disulfuro y un éster de ácido carboxílico

reactivo. Primero se hace reaccionar un compuesto de ácido mercapto-carboxílico con un compuesto 4,4'-di-(nitropiridil)-disulfuro o 4,4'-di-(dinitropiridil)-disulfuro y el resto de ácido carboxílico después se esterifica con *N*-hidroxisuccinimida o *N*-hidroxisulfosuccinimida. Como ejemplo, el 1,3-dibromobutano se convirtió en ácido 4-mercaptopentanoico, que después se convirtió en los reactivos reticulantes correspondientes.

[0018] La Figura 7 es una comparación de SSNPP y SPP para la eficacia de conjugación con una cantidad creciente de equivalentes de fármaco en la reacción de conjugación. La Figura 7A muestra la proporción de fármaco por anticuerpo para diversos equivalentes de fármaco usada en la reacción. La Figura 7B muestra la eficacia de la conjugación para diversos equivalentes de fármaco en la reacción.

[0019] La Figura 8 muestra el transcurso del tiempo para el intercambio de tiol con el enlazador SSNPP (cuadrados) y SPP (rectángulos) a pH 7,4. La conjugación se realizó a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,1 veces del maitansinoide, DM1, por enlazador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

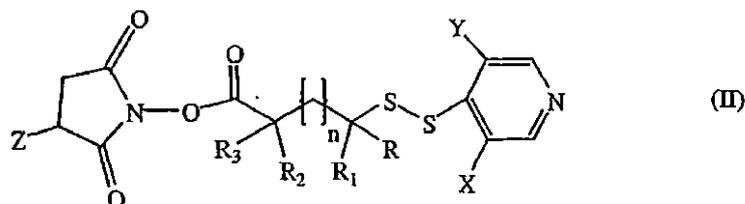
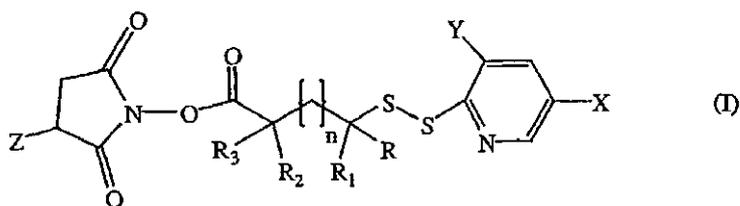
[0020] El nuevo método descrito en este documento usa reticulantes heterobifuncionales. Los ejemplos de algunos reticulantes adecuados y sus síntesis se muestran en las Figuras 1 a 6. Preferiblemente, los reticulantes son 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoato de *N*-succinimidilo (**1**) o el análogo altamente soluble en agua 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoato de *N*-sulfosuccinimidil (**2**), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirato (SPDB, **3a**), *N*-succinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butirato (SNPB, **3b**), y *N*-sulfosuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butirato (SSNPB, **3c**), *N*-succinimidil-4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato (SMNP, **4a**), *N*-succinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butirato (SCPB, **5a**) o *N*-sulfosuccinimidil-4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butirato (SSCPB, **5b**). El SPDB es un ejemplo de referencia y no forma parte de la presente invención. Los agentes de unión celular modificados con los reticulantes **1**, **2**, **3a**, **3b**, **3c**, **4a**, **5a** o **5b** después pueden hacerse reaccionar con un pequeño exceso de un fármaco de molécula pequeña que contiene un resto tiol para dar excelentes rendimientos de conjugado. Las velocidades de reacción son aproximadamente 12 veces más rápidas que con los reticulantes menos reactivos descritos previamente. Los nuevos reactivos tienen la ventaja adicional de que el progreso de la reacción de intercambio de disulfuro puede controlarse fácilmente a causa del elevado coeficiente de extinción de la nitro-piridina-2-tiona que se libera en la reacción. La disminución de la necesidad en el exceso de tiol tiene el beneficio imprevisto de reducir la escisión de los puentes disulfuro internos encontrados en las proteínas nativas.

Reticulantes

[0021] Los reticulantes heterobifuncionales de la presente invención tienen una doble ventaja sobre otros reticulantes porque (1) permiten la formación de un enlace disulfuro impedido entre el agente de unión celular y el resto de fármaco, y (2) proporcionan una velocidad de reacción acelerada del intercambio de disulfuro con el sustituyente tiol sobre el fármaco de molécula pequeña. Además, los reticulantes son soluble en agua o solamente requieren un pequeño porcentaje (<5% v/v) de un disolvente orgánico para mantener la solubilidad en soluciones acuosas.

[0022] Los reticulantes heterobifuncionales usados en la presente invención comprenden un grupo nitropiridilditio, dinitropiridilditio, *N,N*-dialquilcarboxamidopiridilditio o di-(*N,N*-dialquilcarboxamido)piridilditio y un grupo éster carboxílico reactivo tal como un grupo éster de *N*-succinimidilo o éster de *N*-sulfosuccinimidilo.

[0023] Preferiblemente, los reticulantes son los siguientes compuestos de fórmula (I) o (II):



5 en las que R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂, con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio.

10 **[0024]** Los ejemplos de alquilos lineales, ramificados o cíclicos que tienen de 3 a 6 átomos de carbono incluyen propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.

15 **[0025]** Los ejemplos de iones metálicos adecuados, M⁺, incluyen Li⁺, Na⁺, K⁺, y Rb⁺, y los ejemplos de iones tetraalquilamonio adecuados incluyen tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrabutilamonio e iones tetraalquilamonio con grupos alquilo mixtos, tales como dimetil-dietilamonio, etil-trimetilamonio, metil-etil-propil-butilamonio.

20 **[0026]** En realizaciones preferidas, tanto R como R₁, son H o metilo, o uno de R y R₁ es H y el otro es metilo.

25 **[0027]** En una realización más preferida, n es 1, R₁ es metilo y R, R₂, y R₃ son H. En otra realización más preferida, n es 1 y R, R₁, R₂, y R₃ son H. En una realización adicional más preferida, n es 1, R y R₁ son ambos metilo, y R₂ y R₃ son ambos H.

30 **[0028]** La síntesis de reticulantes que contienen 2-ditionitropiridilo y 2-ditio-dinitropiridilo de fórmulas (I) se muestra en las Figuras 1, 2 y 3 y la síntesis de los correspondientes reticulantes que contienen 4-ditionitropiridilo y 4-ditio-dinitropiridilo de fórmula (II) se muestra en la Figura 6. La síntesis de reticulantes que contienen 2-ditio-N,N-dimetilcarboxamidopiridilo de fórmula (I) se muestra en la Figura 4 y la síntesis de los correspondientes reticulantes que contienen 4-ditio-N,N-dimetilcarboxamidopiridilo de fórmula (II) se muestra en la Figura 5.

35 **[0029]** Se hace reaccionar ácido mercapto con ditiobis(nitropiridina), ditiobis(dinitropiridina), o ditiobis(dimetilcarboxamidopiridina), en un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente orgánico polar, tal como tetrahidrofurano, con o sin base, pero preferiblemente con una base tal como trietilamina. El ácido disulfuro no simétrico resultante después se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida o N-hidroxisulfosuccinimida en un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente orgánico aprótico polar, tal como dimetilformamida, en presencia de un agente de acoplamiento, preferiblemente una carbodiimida tal como dicitclohexilcarbodiimida, para dar el compuesto deseado.

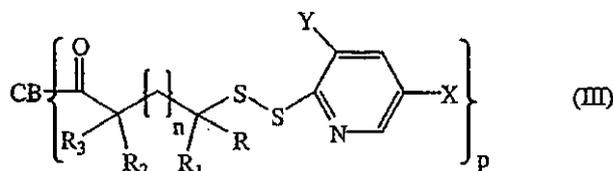
40 **[0030]** En realizaciones preferidas, tanto R como R₁ son H o metilo, o uno de R y R₁ es H y el otro es metilo.

45 **[0031]** En una realización más preferida, n es 1, R₁ es metilo y R, R₂, y R₃ son H. En otra realización más preferida, n es 1, R y R₁ son ambos metilo, y R₂ y R₃ son ambos H.

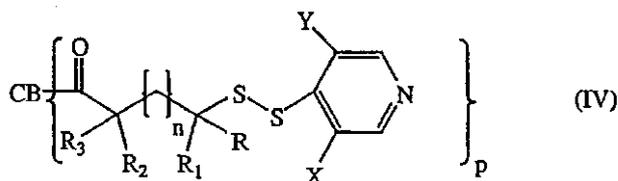
50 **[0032]** La presente invención también proporciona nuevos reticulantes de fórmula (I) o (II), mostradas anteriormente, en las que R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son CONR₄R₅ o NO₂, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, con la condición de que cuando X y/o Y es NO₂, Z no sea H.

Agentes de unión celular que albergan un reticulante que contiene disulfuro

[0033] El agente de unión celular que alberga un reticulante con un grupo reactivo está preferiblemente representado por la fórmula (III) o (IV):



55



en las que CB representa un agente de unión celular, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂, con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y p representa un número entero de 1 a 10 o más.

5
10 **[0034]** En realizaciones preferidas, tanto R como R₁, son H o metilo, o uno de R y R₁ es H y el otro es metilo.

15 **[0035]** En una realización más preferida, n es 1, R₁, es metilo y R, R₂, y R₃ son H. En otra realización más preferida, n es 1 y R, R₁, R₂, y R₃ son H. En una realización adicional más preferida, n es 1, R y R₁ son ambos metilo, y R₂ y R₃ son ambos H.

20 **[0036]** El agente de unión celular que alberga un reticulante puede sintetizarse por métodos conocidos en la técnica (patentes de Estados Unidos N° 6.340.701 B1, 5.846.545, 5.585.499, 5.475.092, 5.414.064, 5.208.020, y 4.563.304; R.V.J. Chari et al. Cancer Research 52, 127-131, 1992; R.V.J. Chari et al. Cancer Research 55, 4079-4084, 1995; J. Carlsson et al. 173 Biochem. J. (1978) 723-737(1978); Goff D. A., Carroll, S. F. 1 BioConjugate Chem. 381-386 (1990); L. Delprino et al. 82 J. Pharm. Sci. 506-512 (1993); S. Arpicco et al., 8 Bioconjugate Chem 327-337 (1997)). De forma ventajosa, a causa de que los grupos reticulantes son solubles en agua o requieren solamente un pequeño porcentaje de disolvente orgánico para mantener la solubilidad en solución acuosa, la reacción entre el agente de unión celular y el reticulante puede realizarse en solución acuosa. El reactivo reticulante se disuelve en un disolvente orgánico polar que es miscible con agua, por ejemplo diferentes alcoholes, tales como metanol, etanol, y propanol, dimetilformamida, dimetilacetamida, o ácido dimetilsulfóxido a una elevada concentración, por ejemplo, 1-100 mM, y después se añade una alícuota apropiada a la solución acuosa tamponada del agente de unión celular. Una alícuota apropiada es una cantidad de solución que introduce 1-10 grupos reticulantes por agente de unión celular, preferiblemente 2-5 grupos, y el volumen a añadir no debe exceder del 10%, preferiblemente del 5%, y mucho más preferiblemente del 1-3% del volumen de la solución de agente de unión celular. Las soluciones acuosas para los agentes de unión celular se tamponan entre pH 6 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,5 y pueden contener cualquier sal tamponante no nucleófila útil para estos intervalos de pH. Los tampones típicos incluyen tampones fosfato, trietanolamina.HCl, HEPES, y MOPS, que puede contener componentes adicionales, tales como sacarosa y sales, por ejemplo, NaCl. Después de la adición, la reacción se incuba a una temperatura de 4°C a 40°C, preferiblemente a temperatura ambiente. El progreso de la reacción puede controlarse midiendo el aumento en la absorción a 495 nm u otra longitud de onda apropiada. Después de completarse la reacción, puede realizarse el aislamiento del agente de unión celular modificado de un modo rutinario, usando, por ejemplo, cromatografía por filtración en gel, o cromatografía de adsorción.

30
35
40 **[0037]** El grado de modificación puede evaluarse midiendo la absorbancia del grupo nitropiridina tiona, dinitro-piridina ditiona, carboxamidopiridina ditiona o dicarboxamidopiridina ditiona liberado.

45 **[0038]** El agente de unión celular que comprende los conjugados de la presente invención puede ser de cualquier tipo actualmente conocido, o que llegue a conocerse, e incluye péptidos y no péptidos. El agente de unión celular puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, de un modo específico o no específico. Generalmente, pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo), interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

50 **[0039]** Los ejemplos más específicos de agentes de unión celular que pueden usarse incluyen:
55 - anticuerpos revestidos (patente de Estados Unidos N° 5.639.641);
- fragmentos de anticuerpos tales como sFv, Fab, Fab', y F(ab')₂ (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al, J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960));
- interferones (por ejemplo, α, β, γ);
- linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
60 - hormonas tales como insulina, TRH (hormona liberadora de tirotropina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos;
- vitaminas tales como ácido fólico;
- factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF-α, G-CSF, M-

CSF y GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)); y
 - transferrina (O'Keefe et al, J. Biol. Chem. 260:932-937 (1985)).

5 **[0040]** Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular
 extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. Son particularmente
 bien conocidas en la técnica las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por
 10 inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como
 la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus completos, virus completos atenuados,
 y proteínas virales tales como proteínas de la envuelta viral. También pueden usarse células humanas
 sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas fágicas de sFv
 (región variable de cadena sencilla), específicamente sFv humano (véase, por ejemplo, Griffiths et al,
 patente de Estados Unidos N° 5.885.793; McCafferty et al, documento WO 92/01047; Liming et al,
 documento WO 99/06587).

15 **[0041]** La selección del agente de unión celular apropiado es un tema de elección que depende de la
 población celular particular que tiene que abordarse, pero, en general, se prefieren anticuerpos
 monoclonales y fragmentos de unión a epitopo de los mismos, si está disponible uno apropiado.

20 **[0042]** Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal My9 es un anticuerpo IgG_{2a} murino que es específico
 para el antígeno CD33 encontrado en células de leucemia mieloide aguda (AML) (Roy et al. Blood
 77:2404-2412 (1991)) y puede usarse para tratar a pacientes de AML. Asimismo, el anticuerpo
 monoclonal anti-B4 es una IgG₁ murina, que se une al antígeno CD19 en células B (Nadler et al, J.
 Immunol. 131:244-250 (1983)) y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que
 25 expresan este antígeno tal como en linfoma no Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica. Asimismo, el
 anticuerpo N901 es un anticuerpo monoclonal IgG₁ murino que se une a CD56 encontrado en células de
 carcinoma pulmonar microcítico y en células de otros tumores de origen neuroendocrino (Roy et al. J. Nat.
 Cancer Inst. 88:1136-1145 (1996)).

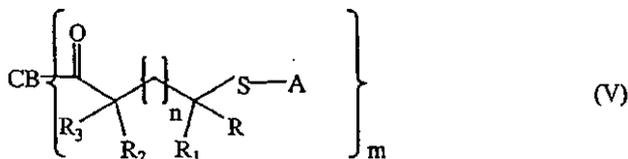
30 **[0043]** Además, el GM-CSF, que se une a células mieloides, puede usarse como agente de unión
 celular para células enfermas de leucemia mielógena aguda. La IL-2, que se une a células T activadas,
 puede usarse para la prevención del rechazo de trasplantes de injertos, para la terapia y prevención de
 la enfermedad de injerto contra hospedador, y para el tratamiento de leucemia aguda de células T. La
 MSH, que se une a melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico, que está
 35 dirigido al receptor de folato expresado en cáncer de ovario y otros cánceres también es un agente de
 unión celular adecuado.

40 **[0044]** Los cánceres de mama y testículos pueden abordarse satisfactoriamente con estrógenos (o
 análogos de estrógeno) o andrógenos (o análogos de andrógeno), respectivamente, como agentes de
 unión celular.

45 **[0045]** El nuevo método es especialmente ventajoso cuando el agente de unión celular es un
 anticuerpo o fragmento del mismo, ya que la velocidad aumentada del intercambio de disulfuro entre el
 enlace disulfuro impedido y el fármaco que contiene tiol reduce el grado de la reacción secundaria
 indeseada de la escisión del enlace disulfuro entre las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o
 fragmento.

Conjugados citotóxicos

50 **[0046]** Los conjugados citotóxicos de la presente invención comprenden, cada uno, uno o más
 fármacos de molécula pequeña unidos covalentemente a un agente de unión celular a través de un
 reticulante como se ha descrito anteriormente. Preferiblemente, los conjugados citotóxicos tienen la
 siguiente fórmula (V):



55 en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña
 unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal,
 ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, como se ha definido anteriormente, n es 0 o un
 número entero de 1 a 4, y m es de 1 a 10 o más.

60 **[0047]** En realizaciones preferidas, tanto R como R₁ son H o metilo, o uno de R y R₁ es H y el otro es
 metilo.

[0048] En una realización preferida, n es 1, R₁ es metilo y R, R₂, y R₃ son H. En otra realización preferida, n es 1 y R, R₁, R₂, y R₃ son H. En una realización adicional más preferida, n es 1, R y R₁ son ambos, y R₂ y R₃ son ambos H.

5 [0049] Preferiblemente la cantidad de fármacos de molécula pequeña unida a cada agente de unión celular es 1-10, más preferiblemente 2-5, e incluso más preferiblemente 3-4.

10 [0050] La síntesis de los conjugados implica un intercambio de disulfuro entre el enlace disulfuro en el reticulante unido covalentemente al agente de unión celular y un fármaco de molécula pequeña que contiene un grupo tiol libre. La reacción produce un conjugado en el que el agente de unión celular y los fármacos de molécula pequeña están unidos a través de enlaces disulfuro estéricamente impedidos. De forma importante, cuando se realiza la reacción usando agentes de unión celular modificados para que contengan los reticulantes de la presente invención, inesperadamente, la reacción de intercambio de disulfuro (a temperatura ambiente y pH 6,5-7,5) sucede hasta doce veces más rápido que cuando se usan otros reticulantes.

15 [0051] El conjugado citotóxico puede purificarse por medios bioquímicos convencionales, tales como filtración en gel en una columna Sephadex G25 o Sephacryl S 300, o por diálisis como se ha descrito previamente.

20 **Fármacos de molécula pequeña**

25 [0052] Los fármacos de molécula pequeña útiles en el método incluyen cualquier fármaco de molécula pequeña que tenga un grupo tiol para unirse al agente de unión celular. La invención incluye fármacos conocidos así como aquellos que pueden llegar a conocerse. Los fármacos de molécula pequeña especialmente preferidos incluyen agentes citotóxicos.

30 [0053] El agente citotóxico puede ser cualquier compuesto que provoque la muerte de una célula, o induzca la muerte celular, o en de algún modo disminuya la viabilidad celular, donde cada agente citotóxico comprende un resto tiol. Los agentes citotóxicos preferidos son compuestos de maitansinoide, compuestos de taxano, compuestos de CC-1065, compuestos de daunorrubicina y compuestos de doxorubicina, y análogos y derivados de los mismos, algunos de los cuales se describen a continuación.

35 Maitansinoides

[0054] Los maitansinoides que pueden usarse en la presente invención son bien conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o prepararse sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos.

40 [0055] Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

45 [0056] Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

- 50 (1) C-19-descloro (patente de Estados Unidos N° 4.256.746) (preparado por reducción con LAH de ansamitocina P2);
 (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patentes de Estados Unidos N° 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y
 (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de Estados Unidos N° 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

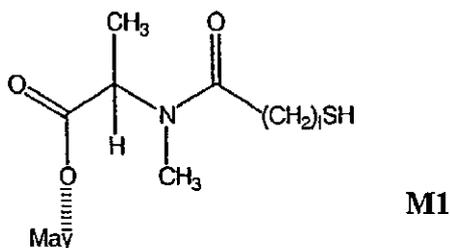
55 [0057] Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

- 60 (1) C-9-SH (patente de Estados Unidos N° 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);
 (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH₂OR) (patente de Estados Unidos N° 4.331.598);
 (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de Estados Unidos N° 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*);
 (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de Estados Unidos N° 4.364.866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);
 (5) C-15-metoxi (patentes de Estados Unidos N° 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);
 65 (6) C-18-N-desmetilo (patentes de Estados Unidos N° 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y
 (7) 4,5-desoxi (patente de Estados Unidos N° 4.371.533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH del maitansinol).

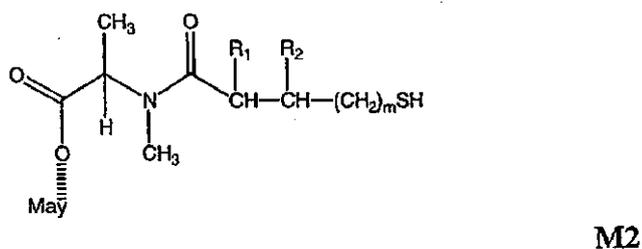
[0058] La síntesis de maitansinoides que contienen tiol útiles en la presente invención se describe completamente en las patentes de Estados Unidos N° 5.208.020 y 5.416.064.

5 **[0059]** Se espera que todos los maitansinoides con un resto tiol en la posición C-3, la posición C-14, la posición C-15 o la posición C-20 sean útiles. Se prefiere la posición C-3 y es especialmente preferida la posición C-3 de maitansinol. También se prefiere un maitansinoide con un resto C-3 tiol que contenga *N*-metil-alanina, y un maitansinoide con un resto C-3 tiol que contenga *N*-metil-cisteína, y análogos de cada uno.

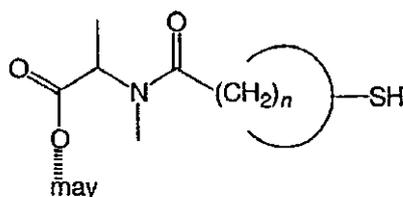
10 **[0060]** Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con un resto C-3 tiol que contenga *N*-metil-alanina útiles en la presente invención están representados por las fórmulas **M1**, **M2**, **M3**, **M6** y **M7**.



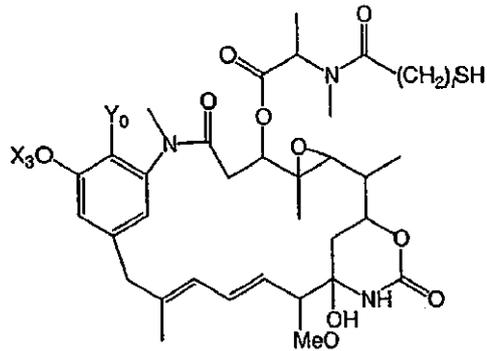
15 en la que:
/ es un número entero de 1 a 10; y
may es un maitansinoide.



20 en la que:
R₁ y R₂ son H, CH₃ o CH₂CH₃, y pueden ser iguales o diferentes;
m es 0, 1, 2 ó 3; y
may es un maitansinoide.

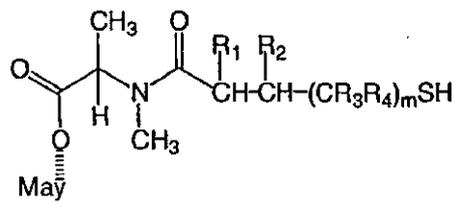


en la que:
n es un número entero de 3 a 8; y
may es un maitansinoide.



M6

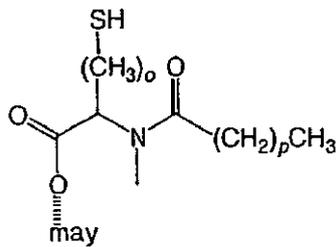
- 5 en la que:
 l es 1, 2 ó 3;
 Y_0 es Cl o H; y
 X_3 es H o CH_3 .



M7

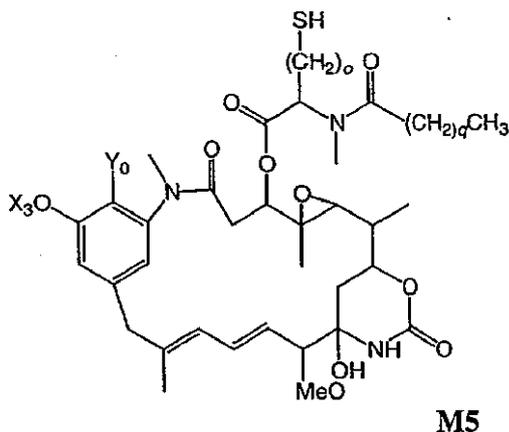
- 10 en la que:
 R_1, R_2, R_3, R_4 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser iguales o diferentes;
 m es 0, 1, 2 ó 3; y
 may es un maitansinoide.

[0061] Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con un resto C-3 tior que contiene *N*-metil-cisteína útiles en la presente invención están representados por las fórmulas M4 y M5.



M4

- 15 en la que:
 o es 1, 2 ó 3;
 p es un número entero de 0 a 10; y
 may es un maitansinoide.

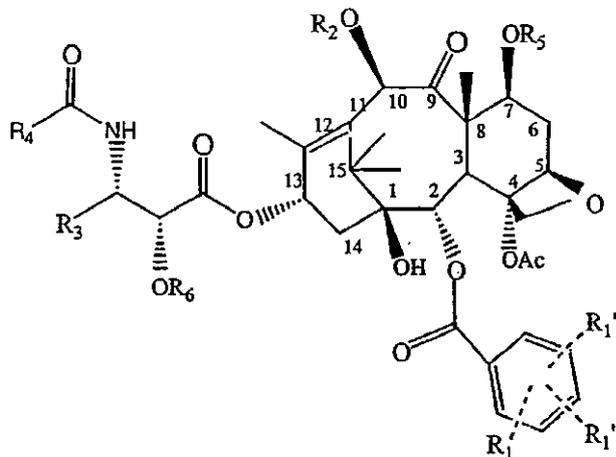


en la que:

- 5 o es 1, 2 ó 3;
 q es un número entero de 0 a 10;
 Y_0 es Cl o H; y
 X_3 es H o CH_3 .

Taxanos

- 10 **[0062]** El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención, también puede ser un taxano.
[0063] Los taxanos que pueden usarse en la presente invención se han modificado para que contengan un resto tiol. Algunos taxanos útiles en la presente invención tienen la fórmula **T1** mostrada a continuación:



- 15 **[0064]** A continuación se describen cuatro realizaciones de estos nuevos taxanos.

- [0065]** En las realizaciones (1), (2), (3), y (4), R_1 , R_1' , y R_1'' son iguales o diferentes y son H, un grupo aceptor de electrones, tales como F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , o CF_3 o un grupo donador de electrones, tal como $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-NR_7R_8$, $-OR_9$, donde R_7 y R_8 son iguales o diferentes y son grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, la cantidad de átomos de carbono para R_7 y R_8 es de 1 a 4. Además, preferiblemente R_7 y R_8 son iguales. Los ejemplos de grupos $-NR_7R_8$ preferidos incluyen dimetilamino, dietilamino, dipropilamino, y dibutilamino, donde el resto butilo es cualquiera de primario, secundario, terciario o isobutilo. R_9 es alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.
- 20
- 25

- [0066]** R₁ preferiblemente es OCH₃, F, NO₂, o CF₃.
- [0067]** Además, preferiblemente, R₁ está en posición meta y R₁' y R₁'' son H u OCH₃.
- 5 **[0068]** R₂ en las realizaciones (1), (2) y (4), es H, un éster heterocíclico, lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un éter heterocíclico, lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de fórmula -CONR₁₀R₁₁, donde R₁₀ y R₁₁ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Para ésteres, los ejemplos preferidos incluyen -COCH₂CH₃ y -COCH₂CH₂CH₃. Para éteres, los ejemplos preferidos incluyen -CH₂CH₃ y -CH₂CH₂CH₃. Para carbamatos, los ejemplos preferidos incluyen -CONHCH₂CH₃, -CONHCH₂CH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperazino, -CO-piperidino, o -CO-*N*-metilpiperazino.
- 10 **[0069]** R₂ en la realización (3), es un resto que contiene tiol.
- 15 **[0070]** R₃ en las realizaciones (1), (3) y (4), es arilo, o es alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente -CH₂CH(CH₃)₂.
- 20 **[0071]** R₃ en la realización (2), es -CH=C(CH₃)₂.
- [0072]** R₄ en las cuatro realizaciones, es -OC(CH₃)₃ o -C₆H₅.
- [0073]** R₅ en las realizaciones (1) y (2), es un resto que contiene tiol y R₆ tiene la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4).
- 25 **[0074]** R₅ y R₆ en la realización (3), son iguales o diferentes, y tienen la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4).
- 30 **[0075]** R₅ en la realización (4), tiene la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4) y R₆, es un resto tiol.
- [0076]** Las posiciones preferidas para la introducción del resto que contiene tiol son R₂ y R₅, siendo R₂ la más preferida.
- 35 **[0077]** La cadena lateral que porta el resto tiol puede ser lineal o ramificado, aromático o heterocíclico. Un especialista en la técnica puede identificar fácilmente las cadenas laterales adecuadas. Los ejemplos específicos de restos tiol incluyen -(CH₂)_nSH, -CO(CH₂)_nSH, -(CH₂)CH(CH₃)SK-CO(CH₂)_nCH(CH₃)SH, -(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, -CONR₁₂(CH₂)_nSH, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)SH, o -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, -CO-morfolino-XSH, -CO-piperazino-XSH, -CO-piperidino-XSH, y -CO-*N*-metilpiperazino-XSH donde X es un alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono, R₁₂ es un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico, y puede ser H, y n es un número entero de 0 a 10.
- 40 **[0078]** Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.
- [0079]** Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.
- 45 **[0080]** Los ejemplos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.
- [0081]** Los ejemplos de arilos simples incluyen fenilo y naftilo.
- [0082]** Los ejemplos de arilos sustituidos incluyen arilos tales como los descritos anteriormente sustituidos con grupos alquilo, con halógenos, tales como Cl, Br, F, grupos nitro, grupos amino, grupos ácido sulfónico, grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo o grupos alcoxi.
- 50 **[0083]** Los ejemplos de heterocíclicos son compuestos en los que los heteroátomos se seleccionan entre O, N, y S, e incluyen morfolino, piperidino, piperazino, *N*-metilpiperazino, pirrolilo, piridilo, furilo y tiofeno.
- 55 **[0084]** Los taxanos que tienen un resto tiol pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos. El material de partida para la síntesis es la 10-desacetilbaccatina III disponible en el mercado. La química para introducir diversos sustituyentes se describe en varias publicaciones (Ojima et al., J. Med. Chem. 39:3889-3896 (1996); Ojima et al., J. Med. Chem. 40: 267-278 (1997); Ojima et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:4256-4261 (1999); patente de Estados Unidos N° 5.475.011 y patente de Estados Unidos N° 5.811.452).
- 60 **[0085]** El sustituyente R₁ en el anillo fenilo y la posición del sustituyente R₁ pueden variarse hasta obtenerse un compuesto de la toxicidad deseada. Además, el grado de sustitución en el anillo fenilo
- 70

puede variarse para conseguir una toxicidad deseada. Es decir, el anillo fenilo puede tener uno o más sustituyentes (por ejemplo, mono-, di-, o tri-sustitución del anillo fenilo) lo que proporciona otro medio para conseguir una toxicidad deseada. Un especialista en la técnica puede determinar el resto químico apropiado para R₁ y la posición apropiada para R₁ usando solamente experimentación rutinaria.

5 **[0086]** Por ejemplo, grupos aceptores de electrones en la posición meta aumentan la potencia citotóxica, mientras que no se espera que la sustitución en la posición para aumente la potencia en comparación con el taxano precursor. Típicamente, inicialmente se prepararán unos pocos taxanos representativos con sustituyentes en las diferentes posiciones (orto, meta y para) y se evaluarán para la citotoxicidad *in vitro*.

10

[0087] El resto tiol puede introducirse en una de las posiciones en las que ya existe un grupo hidroxilo. La química proteger los diversos grupos hidroxilo, haciendo reaccionar al mismo tiempo el deseado, se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, las referencias citadas *supra*). El sustituyente se introduce convirtiendo simplemente el grupo hidroxilo libre en un éter que contiene disulfuro, un éster que contiene disulfuro, o un carbamato que contiene disulfuro. Esta transformación se consigue del siguiente modo. El grupo hidroxilo deseado se desprotona por tratamiento con el reactivo disponible en el mercado hexametildisilazano de litio (1,2 equivalentes) en tetrahidrofurano a -40°C como se describe en Ojima et al. (1999), *supra*. El anión alcóxido resultante después se hace reaccionar con un exceso de un compuesto dihalo, tal como dibromoetano, para dar un halo éter. El desplazamiento del halógeno con un tiol (por reacción con tioacetato de potasio y tratamiento con una base suave o hidroxilamina) proporcionará el taxano que contiene tiol deseado.

15

20

25

[0088] Como alternativa, el grupo hidroxilo deseado puede esterificarse directamente por reacción con un haluro de acilo, tal como cloruro de 3-bromopropionilo, para dar un éster de bromo. El desplazamiento del grupo bromo por tratamiento con tioacetato de potasio y procesamiento adicional como se ha descrito anteriormente proporcionará el éster de taxano que contiene tiol.

Análogos de CC-1065

30

[0089] El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención también puede ser un análogo de CC-1065.

35

40

[0090] De acuerdo con la presente invención, los análogos de CC-1065 contienen una subunidad A y una subunidad B o B-C. Las subunidades A son CPI (unidad de ciclopropapirrolindol) en su forma ciclopropilo cerrada natural o en su forma clorometilo abierta, o la unidad CBI estrechamente relacionada (unidad ciclopropilbenzindol) en la forma ciclopropilo cerrada o la forma clorometilo abierta. Las subunidades B y C de los análogos de CC-1065 son muy similares y son derivados 2-carboxi-indol y 2-carboxi-benzofurano. Para la actividad, los análogos de CC-1065 necesitan al menos una dicha subunidad 2-carboxi-indol o subunidad 2-carboxi-benzofurano, aunque dos subunidades (es decir, B-C) vuelven al análogo más potente. Como es obvio a partir del CC-1065 natural y a partir de los análogos publicados (por ejemplo, Warpehoski et al, J. Med Chem. 31:590-603 (1988)), las subunidades B y C también pueden portar diferentes sustituyentes en diferentes posiciones en los anillos indol o benzofurano.

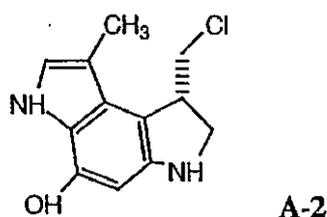
45

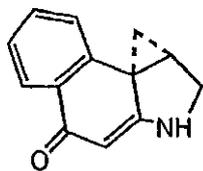
50

[0091] Los análogos de CC-1065 que contienen un resto tiol pueden ser cualquiera de las siguientes subunidades A de fórmulas **A-1** {CPI (forma ciclopropilo)}, **A-2** {CPI (forma clorometilo)}, **A-3** {CBI (forma ciclopropilo)}, y **A-4** {CBI (forma clorometilo)} unida covalentemente mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A con el grupo carboxi C-2 de la subunidad B de fórmula **F-1** o una B-C de fórmulas **F-3** o **F-7**.

Subunidades A

[0092]





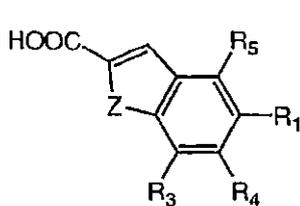
A-3



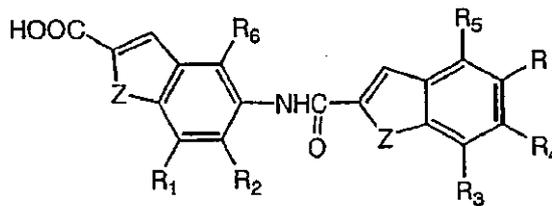
A-4

Subunidades B y B y C unidades covalentemente

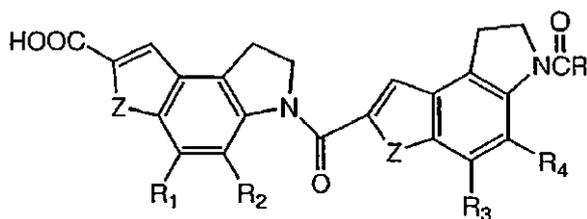
5 [0093]



F-1



F-3



F-7

10 en las que cada Z puede ser igual o diferente y puede ser O o NH; y en las que, en la Fórmula F-1, R₄ es un resto tiol, en la Fórmula F-3 uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula F-7 uno de R' o R₄ es un resto que contiene tiol; cuando R o R' es un resto tiol, entonces de R₁ a R₆, que pueden ser iguales o diferentes, son hidrógeno, alquilo lineal C₁-C₃, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido; y cuando R₄ es un resto tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser iguales o diferentes, son hidrógeno, alquilo lineal C₁-C₃, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido, y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido.

15 [0094] En una realización preferida, R y R' son restos tiol y R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno. En otra realización preferida, R y R' son restos tiol y de R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

20 [0095] En una realización especialmente preferida, R o R₄ es -NHCO(CH₂)_lSH-NHCO(C₆H₄(CH₂)_lSH, u -O(CH₂)_lSH, y R' es -(CH₂)_lSH, -NH(CH₂)_lSH u -O(CH₂)_lSH donde l es un número entero de 1 a 10.

[0096] Los ejemplos de aminas primarias incluyen metilamina, etilamina e isopropilamina.

25 [0097] Los ejemplos de aminas secundarias incluyen dimetilamina, dietilamina y etilpropilamina.

[0098] Los ejemplos de aminas terciarias incluyen trimetilamina, trietilamina, y etil-isopropil-metilamina.

30 [0099] Los ejemplos de grupos amido incluyen N-metilacetamido, N-metil-propionamido, N-acetamido, y N-propionamido.

[00100] Los ejemplos de alquilo representados por R', cuando R' no es un grupo enlazador, incluyen alquilo lineal o ramificado C₁-C₅.

35 [00101] Los ejemplos de O-alquilo representados por R', cuando R' no es un grupo enlazador, incluyen compuestos en los que el resto alquilo es un alquilo lineal o ramificado C₁-C₅.

[00102] Los análogos de CC-1065 descritos anteriormente pueden aislarse de fuentes naturales y los métodos para su preparación, que implican su posterior modificación, preparación sintética, o una

combinación de ambos, están bien descritos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545).

Análogos de daunorrubicina/doxorubicina

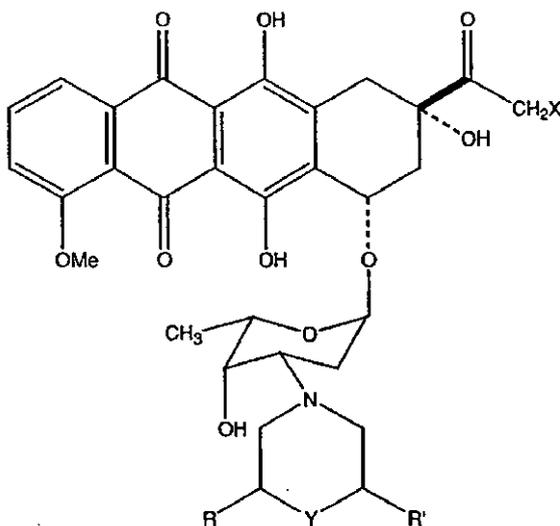
5

[00103] El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención también puede ser un análogo de daunorrubicina o un análogo de doxorubicina.

10

[00104] Los análogos de daunorrubicina y doxorubicina de la presente invención puede modificarse para que comprenden un resto tiol.

[00105] Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados útiles en la presente invención tienen la fórmula **D1** mostrada a continuación:



D1

15

en la que,

X es H u OH;

Y es O o NR₂, donde R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono; y

20

R' es un resto tiol, H, u -OR₁, donde R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono;

con la condición de que R y R' no sean resto tiol al mismo tiempo.

[00106] En una realización preferida, NR₂ es NCH₃. En otra realización preferida, R' es -O.

25

[00107] En una realización especialmente preferida, el resto tiol es -(CH₂)_nSH, -O(CH₂)_nSH, -(CH₂)_nCH(CH₃)SH, -O(CH₂)_nCH(CH₃)SH, -(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, donde n es un número entero de 0 a 10.

30

[00108] Los ejemplos del alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, representados por R, R₁, y R₂, incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, y pentilo, en cualquiera de sus ocho disposiciones isoméricas.

[00109] R₁ y R₂ preferiblemente son metilo.

35

[00110] Los ejemplos de alquilo lineal incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

[00111] Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

40

[00112] Cuando R o R' no es un grupo enlazador, el sustituyente en esa posición puede variarse hasta obtener un compuesto de la toxicidad deseada. La alta toxicidad se define como que tiene una IC₅₀ hacia células cancerosas cultivadas en el intervalo de 1 x 10⁻¹² a 1 x 10⁻⁹ M, después de un tiempo de exposición de 72 horas. Los ejemplos representativos de sustituyentes son H, alquilo, y O-alquilo, como se ha descrito anteriormente. Un especialista en la técnica puede determinar el resto químico apropiado para R y R' usando solamente experimentación rutinaria.

45

[00113] Por ejemplo, se espera que los sustituyentes metilo y metoxi aumenten la potencia citotóxica, mientras que no se espera que un hidrógeno aumente la potencia en comparación con los análogos de daunorrubicina precursores con sustituyentes en las diferentes posiciones que se prepararán inicialmente y evaluarán para la citotoxicidad *in vitro*.

[00114] Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados de la presente invención, que tienen un resto tiol se describen en el documento WO 01/38318. Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados pueden sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.146.064).

Análogos y derivados

[00115] Un especialista en la técnica de agentes citotóxicos entenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en este documento pueden modificarse de tal modo que el compuesto resultante aún retenga la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El especialista en la técnica también entenderá que pueden usarse muchos de estos compuestos en lugar de los agentes citotóxicos descritos en este documento. Por tanto, los agentes citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en este documento.

EJEMPLOS

[00116] La invención se describirá ahora por referencia a los siguientes ejemplos. Salvo los ejemplos. Salvo que se especifique de otro modo, todos los porcentajes y proporciones son en volumen.

[00117] **Ejemplo 1: Síntesis de ácido 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoico (NitroPPA, 8a).** Un matraz de 2 cuellos de 100 l se equipó con una barra de agitación, un embudo de adición y un termómetro. El matraz se cargó con 1,3-dibromobutano (**6**) (5,2 g, 24 mmol) y dimetilsulfóxido (30 ml). El embudo de adición se cargó con una solución de cianuro sódico (1,16 g, 24 mmol) en 5 ml de agua desionizada. Los contenidos del matraz se agitaron vigorosamente según se añadió gota a gota la solución de cianuro sódico una velocidad que no permitía que la temperatura de reacción excediera de 65°C. Después de completarse la adición, la reacción se agitó durante una noche. La mezcla se extrajo con agua desionizada (30 ml) y una solución 1:1 de acetato de etilo:hexanos (55 ml). La capa orgánica se retuvo y la capa acuosa se extrajo una segunda vez con 40 ml de acetato de etilo:hexanos 1:1. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron secuencialmente con agua desionizada (25 ml) y cloruro sódico acuoso saturado (25 ml). El disolvente se retiró de la capa orgánica por evaporación rotatoria a presión reducida (~1,99 kPa (15 torr)). El residuo se recogió en 15 ml de etanol de calidad reactiva y se transfirió a un matraz de 100 ml. El residuo se trató con una solución de tiourea (2,6 g, 34 mmol) en H₂O (21 ml). El matraz se equipó con un condensador de reflujo y se calentó en un baño de aceite con agitación para dar un reflujo suave. Después de 4 horas, se retiró el baño de aceite y el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió una solución de hidróxido sódico acuoso 10 M (25 ml) y la mezcla se calentó con un baño de aceite a un reflujo suave con agitación durante una noche. El baño de aceite se retiró y el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se transfirió a un embudo de decantación y se lavó con acetato de etilo (2 x 25 ml). La capa acuosa se transfirió a un matraz de 100 ml y se enfrió en un baño de hielo/agua. Se añadió acetato de etilo (40 ml) y los contenidos se agitaron rápidamente según se añadía HCl concentrado hasta que la capa acuosa estuvo a aproximadamente pH 2. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo. La capa orgánica se retuvo y la capa acuosa se extrajo una segunda vez con 45 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas que contenía el producto **7** en bruto se combinaron y se concentraron por evaporación rotatoria a temperatura ambiente hasta aproximadamente 20 ml.

[00118] Un matraz de 250 ml que contenía una barra de agitación se cargó con 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina) (14,5 g, 47 mmol), tetrahidrofurano (170 ml) y diisopropiletilamina (12,6 ml, 72 mmol). El matraz se equipó con un embudo de adición que contenía la solución del ácido de tiol **7**, que se añadió gota a gota durante aproximadamente 8 min. La reacción se agitó durante 1 hora adicional. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria y el residuo se recogió en un mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en sílice. La columna se eluyó usando un gradiente por etapas, partiendo con hexanos:acetato de etilo (4:1), hasta que se retiró toda la 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina) sin reaccionar. La columna después se eluyó con hexanos:acetato de etilo 4:1 que contenía ácido acético al 2%. Las fracciones que contenían ácido 4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoico se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria dando **8a** puro (2,3 g, rendimiento global del 35%). MS (M⁺ + Na) ¹H RMN (CDCl₃) 9,26 (d, 1 H, J = 2,5 Hz), 8,39 (dd, 1 H J = 2,5, 8,9 Hz), 7,89 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 3,08 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 1,36 (d, 3H, J = 6,7 Hz).

[00119] **Ejemplo 2: 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoato de N-succinimidilo (1, SNPP).** Un matraz de 50 ml se cargó con ácido 4-(5-nitro-2-piridilditio) pentanoico (**8a**, 0,51 g, 1,9 mmol), N-hidroxisuccinimida (0,24 g, 2,1 mmol) y una mezcla de tetrahidrofurano:cloruro de metileno 1:1 (35 ml). Los contenidos se agitaron vigorosamente según se añadía una solución de 0,41 g de clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,41 g, 2,1 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después, el disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío. El residuo se disolvió en un volumen mínimo de cloruro de metileno y se purificó por cromatografía

en sílice usando una fase móvil de tetrahidrofurano:hexano 1:1,5 (v/v) que contenía ácido acético al 0,5%. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío para dar el compuesto deseado **1**. ¹H RMN (CDCl₃) 9,26 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 8,38 (dd, 1H, J = 2,5 y 8,9 Hz), 7,84 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 3,13 (m, 1H), 2,85 (m, 6H), 2,04 (m, 2H), 1,38 (d, 3H, J = 6,7 Hz).

[00120] Ejemplo 3. 4-(5-nitro-2-piridilditio)-pentanoato de N-sulfosuccinimidilo (2, SSNPP). Un matraz de 10 ml se cargó con ácido 4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoico (**8a**, 0,11 g, 0,41 mmol), *N*-hidroxisulfosuccinimida (0,83 g, 0,38 mmol), dicitclohexilcarbodiimida (0,080 g, 0,39 mmol), y dimetilacetamida (1,5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche. El matraz después se enfrió en un baño de hielo durante 2 horas, y la dicitclohexilurea precipitada se retiró por filtración. Se añadió acetato de etilo (45 ml) al filtrado, la suspensión resultante se agitó durante 2 min., y el precipitado se recogió por filtración. El precipitado se secó durante una noche al vacío a temperatura ambiente, lo que produjo 0,092 g de **2** (rendimiento del 51%). MS 463,9 (M⁺ Na⁺). ¹H RMN (6:1 CDCl₃:DMSO-d₆) 8,68 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 7,93 (dd, 1H, J = 2,5, 8,9 Hz), 7,42 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 3,51 (dd, 1H, J = 8,8, 2,8), 2,6 (m, 5H), 1,46 (m, 2H), 0,82 (d, 3H, J = 6,7 Hz).

[00121] Ejemplo de referencia 4. Síntesis de 4-(2-piridilditio)butanoato de N-succinimidilo (SPDB, 3a). Se preparó una solución de γ -tiobutirrolactona (**9**) (3,0 g, 29,4 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) y agua desionizada (20 ml) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se añadió una solución de hidróxido sódico 5 M (9,86 ml, 49,3 mmol) al matraz de reacción; la reacción procedió en una atmósfera de argón, con agitación, a temperatura ambiente. Después de 3 h, el disolvente se retiró al vacío. Se añadieron acetato de etilo (25 ml) y agua desionizada (25 ml) al aceite en bruto resultante, y la solución resultante se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo, guardando la fase acuosa. La fase acuosa se acidificó a pH 3 usando ácido clorhídrico concentrado y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro sódico saturado (10 ml) y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La fase orgánica resultante que contenía el producto ácido 4-mercaptobutanoico **10** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

[00122] La solución de **10** se transfirió a un embudo de adición y se añadió gota a gota a una solución agitada de forma magnética de disulfuro de 2,2'-dipiridilo (9,0 g, 41 mmol) en 50 ml de alcohol etílico que contenía 1 ml de ácido acético. Después de 3 h, el disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío, después el residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil de hexanos:acetato de etilo:ácido acético (2:1:0,02, v/v/v). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se retiró al vacío para dar ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (**11a**) (5,1 g, rendimiento del 70%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,00-2,09 (2H, m), 2,46-2,55 (2H, m), 2,74 (1H, t, J = 7,0), 2,86 (1H, t, J = 7,0), 7,62-7,71 (1H, m), 7,71-7,78 (1H, m), 8,48-8,51 (1H, m), 11,8 (1H, s a).

[00123] El compuesto **11a** (1,10 g, 4,8 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (0,64 g, 5,5 mmol) se disolvieron en diclorometano (50 ml). La solución se agitó de forma magnética según se añadía 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (1,05 g, 5,5 mmol). Después de 2 h, se añadió acetato de etilo (150 ml) y la solución se transfirió a un embudo de decantación y se lavó consecutivamente con HCl 0,5 M (30 ml) y cloruro sódico saturado (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, y después el disolvente se retiró al vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil de hexanos:acetato de etilo:ácido acético (2,5:1:0,02, v/v/v). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se retiró para dar 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB, **3a**) (1,2 g, rendimiento del 76%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,12-2,19 (2H, m), 2,78-2,87 (6H, m), 2,91 (2H, t, J = 7,0), 7,06-7,12 (1H, m), 7,62-7,71 (2H, m), 8,48 (1H, d, 4,4 Hz). MS (M + Na⁺) Encontrado: 348,8 Calculado: 349,4.

[00124] Ejemplo 5. Síntesis de 4-(5-nitro-2-piridilditio)butanoato de N-sulfosuccinimidilo (SSNPB, 3c). Una solución del ácido mercapto-carboxílico **10** (8,0 mmol) en acetato de etilo (10 ml) se transfirió a un embudo de adición y se añadió gota a gota a una solución en agitación de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (3,0 g, 9,7 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) y 4-metilmorfolina (2,5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación de 250 ml y se trató con una solución de yodo (1,6 g) en acetato de etilo (100 ml). Los contenidos se agitaron vigorosamente durante 5 min., se diluyeron con hexano (40 ml), y después se extrajeron con bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 70 ml). La capa acuosa combinada se acidificó con HCl 1 M y se extrajo con acetato de etilo (80 ml). La capa de acetato de etilo se separó y se secó sobre sulfato sódico, y se filtró. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil compuesta por acetato de etilo:hexanos:ácido acético (85:12:3, v/v/v). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se retiró al vacío para dar el producto ácido 4-(5-nitro-2-piridilditio)butanoico, **11b** (rendimiento del 61%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,87-1,93 (2H, m), 2,43-2,54 (2H, m), 2,82-2,92 (2H, m), 7,89-7,92 (1H, m), 8,34-8,43 (1H, m), 9,23 (1H, s).

[00125] El análisis de HPLC usando una columna C18 en fase inversa de Hewlett Packard (100 x 4,6 mm), eluyendo con un gradiente lineal de acetonitrilo-H₂O (acetonitrilo al 20% a acetonitrilo al 90% en 10 min.) indicó que el producto, que eluía con un tiempo de retención de 5,1 min., tenía una pureza de >98%.

5 **[00126]** Una solución de **11b** (200 mg, 0,73 mmol), sulfo-*N*-hidroxisuccinimida (180 mg, 0,81 mmol) y dicitohexilcarbodiimida (175 mg, 0,85 mmol) en dimetilformamida (4,5 ml) se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Se retiró aproximadamente ½ del disolvente por evaporación rotatoria al vacío y el precipitado resultante se retiró por filtración. El filtrado se trató con 2-propanol (17 ml) que se había enfriado a 4°C. El precipitado se recogió por filtración al vacío y se lavó con éter etílico (6 ml) a 4°C. El disolvente residual se retiró al vacío para dar 207 mg (rendimiento del 60%) del producto **3c**. MS (M + Na⁺) Encontrado: 523,9 Calculado: 523,9, Ion Neg Encontrado: 478,0 Calculado: 478,0.

10 **[00127] Ejemplo 6. Ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (14):** Un matraz de 500 ml se equipó con una barra de agitación y un embudo de adición de 150 ml. El sistema se puso en una atmósfera de argón, y se cargó con tetrahidrofurano anhidro (150 ml) y n-BuLi 2,5 M (75 ml, 18,7 mmol) en hexanos (18,7 mmol). La solución se enfrió a -78°C usando un baño de hielo seco/acetona. Se añadió gota a gota acetoneitrilo (7,3 g, 9,4 ml, 18 mmol) mediante una jeringa durante aproximadamente 5 min. La reacción se agitó durante 30 min., mientras se formaba el precipitado blanco de litio-acetonitrilo. Se disolvió sulfuro de isobutileno (**12**), (15 g, 17 mmol) en 100 ml de THF anhidro y se añadió gota a gota durante aproximadamente 30 min. mediante el embudo de adición. El baño de refrigeración se retiró y la reacción se dejó en agitación durante 3 horas. El matraz se enfrió en un baño de hielo/agua según se añadía gota a gota HCl 0,5 M (38 ml). La capa de THF se retuvo y la capa acuosa se lavó dos veces con 75 ml de acetato de etilo. Las capas de THF y acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre aproximadamente 20 g de sulfato sódico anhidro y se transfirieron a un matraz de 250 ml. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío para dar **13** en bruto. Se añadió etanol (30 ml), y los contenidos se agitaron según se añadía lentamente una solución de NaOH (8,0 g) en agua desionizada (30 ml). El matraz se equipó con un condensador de reflujo y se puso en una atmósfera de argón. La reacción se calentó a reflujo durante una noche y después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua desionizada (60 ml) y la mezcla se lavó con acetato de etilo:hexanos 2:1 (v/v) (2 x 25 ml). La capa acuosa se acidificó a pH 2 con HCl concentrado, y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 ml). Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío para dar 10 g de producto **14** (rendimiento del 39%). El producto se usó sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,38 (6H, s), 1,87-1,93 (2H, m), 2,08 (1H, s), 2,51-2,57 (2H, m).

30 **[00128] Ejemplo 7. Síntesis de ácido 4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoico (15a).** El concentrado que contenía **14** (18 mmol) se transfirió a un embudo de adición y se añadió gota a gota a una solución en agitación de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (10,6 g, 34 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (50 ml), dimetilformamida (150 ml) y 4-metil-morfolina (5,4 g, 53 mmol) La mezcla de reacción se agitó de forma magnética durante una noche. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se recogió en 200 ml de acetato de etilo y se filtró al vacío para retirar el material que no se disolvió. El filtrado se lavó tres veces con HCl 1 M (3 x 50 ml). El disolvente se retiró al vacío y después el residuo se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil compuesta por acetato de etilo:hexanos:ácido acético (85:12:3, v/v/v). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y el disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío para dar 4,1 gramos de producto **15a**. ¹H RMN (CDCl₃): δ 1,38 (6H, s), 1,87-1,93 (2H, m), 2,59-2,63 (2H, m), 7,89-7,92 (1H, m), 8,34-8,43 (1H, m), 9,23 (1H, s).

45 **[00129] Ejemplo 8. Síntesis de sulfo-*N*-succinimidil-4-metil-4-(5-nitro-2-piridilditio)pentanoato (4b).** Una solución de **15a** (0,25 g, 0,83 mmol), sulfo-*N*-hidroxisuccinimida (0,19 g, 0,86 mmol) y dicitohexilcarbodiimida (0,19 g, 0,922 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Aproximadamente ½ del disolvente se retiró por evaporación rotatoria al vacío y el precipitado que se formó se retiró por filtración. El filtrado se trató con 2-propanol (20 ml que se habían enfriado a 4°C). El precipitado se recogió por filtración al vacío y se lavó con éter etílico enfriado en hielo (15 ml). El disolvente residual se retiró al vacío para dar el producto deseado **4b** (240 mg, rendimiento del 58%). MS (M + Na⁺) Encontrado: 496,0 Calculado 496,0. MS (M⁻ - Na⁺): Encontrado 450,1 Calculado. 450,0.

55 **[00130] Ejemplo 9. Síntesis de ácido 4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butanoico (17a).** Una solución de ácido 6-6'-ditiopicotínico (**16a**) (1,6 g, 5,18 mmol) en diclorometano seco (10 ml) y dimetilformamida (4 ml) se preparó en un matraz de reacción de fondo redondo y se trató secuencialmente con clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC-HCl) (2,5 g, 12,9 mmol), dimetilamina (2,1 g, 26 mmol) y 4-metilmorfolina (1,63 g, 12,9 mmol). La reacción se dejó proceder con agitación a temperatura ambiente durante 2 h, tiempo después del cual la reacción parecía completa después del análisis por TLC analítica, eluyendo en diclorometano:metanol:ácido acético (93,9:6:0,1, v/v/v) que indicó que el material de partida **16a** se había convertido completamente en el derivado dimetilamida. La mezcla de reacción se trató con una mezcla de 2:1 de acetato de etilo/hexanos (15 ml) y se lavó secuencialmente usando tampón fosfato potásico 50 mM, pH = 6 (10 ml) y una solución de cloruro sódico saturado (5 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. La evaporación del disolvente dio un residuo bruto. El producto se purificó por cromatografía en sílice, eluyendo en una mezcla de diclorometano:metanol (95:5 v/v respectivamente). Las fracciones que contenían el producto se combinaron; el disolvente se retiró al vacío para dar **16b** en forma de un sólido amarillo (rendimiento del 35%). MS: m/z: Encontrado: 385,0 (M + Na⁺); Calculado: 385,0. ¹H RMN (CDCl₃): δ 2,9 (6H, d, J = 35), 7,6 (2H, dd, J = 35 Hz y 10 Hz), 8,5 (1H, s).

- 5 **[00131]** Una solución de **10** (0,54 g, 4,5 mmol) en acetato de etilo (11,5 ml) se añadió gota a gota en un matraz de reacción que contenía **16b** (2,6 g, 7 mmol) y 4-metilmorfolina (1,63 g, 16 mmol). La reacción se puso en una atmósfera de argón, con agitación, a temperatura ambiente durante 2 h, y el volumen de reacción después se concentró por evaporación rotatoria para producir un aceite amarillo en bruto. El producto se purificó por cromatografía en sílice, eluyendo en una mezcla 96:6:1 (diclorometano:metanol:ácido acético, v/v respectivamente). La adición de tolueno durante la evaporación rotatoria a alto vacío produjo el producto ácido 4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butanoico (**17a**) (rendimiento del 76%). MS: m/z: Encontrado 322,9 (M + Na⁺); Calculado: 323,0.
- 10 **[00132] Ejemplo 10. Síntesis de 4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (**5a**).** Se preparó una solución de **17a** (0,86 g, 2,86 mmol) en diclorometano (30 ml) en un matraz de reacción de fondo redondo y se trató secuencialmente con clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (0,82 g, 4,3 mmol) y *N*-hidroxi succinimida (0,49 g, 4,3 mmol). La reacción procedió en una atmósfera de argón, con agitación, a temperatura ambiente durante dos horas. El análisis por TLC analítica eluyendo en una mezcla de diclorometano:metanol:ácido acético (93,9:6:0,1, v/v/v) mostró que **17a** se había convertido completamente en el éster de succinimida **5a**. Se añadió acetato de etilo (40 ml) a la mezcla de reacción, las fases orgánicas combinadas se lavaron usando tampón fosfato potásico 50 mM (2 x 30 ml) a pH= 6, y una vez usando una solución de cloruro sódico saturado (15 ml). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico anhidro y el volumen se redujo al vacío. Una parte del material en bruto se purificó por TLC preparatoria, eluyendo en una mezcla de diclorometano:metanol:ácido acético (93:6:1, v/v/v). El producto deseado se extrajo de la sílice usando una mezcla 90:10 (diclorometano:metanol) para producir el agente modificador purificado **5a** (rendimiento del 14%). MS: m/z: Encontrado 420,0 (M + Na⁺); Calculado: 420,0
- 15
- 20
- 25 **[00133]** Análisis de HPLC: La pureza se determinó por análisis de HPLC usando una columna C-18 analítica Vydac (longitud: 100 mm, i.d.: 4,6 mm, tamaño de partícula: 3 micrómetros) a un caudal de 1,5 ml/min eluyendo en un gradiente lineal de agua y acetonitrilo del siguiente modo:
- | Tiempo (min) | % de agua | % de acetonitrilo |
|--------------|-----------|-------------------|
| 0 | 80 | 20 |
| 20 | 50 | 50 |
| 25 | 0 | 100 |
- 30 **[00134]** En estas condiciones, **5a** eluía con un tiempo de retención de 7,68 min. y la pureza era del 94,9%.
- 35 **[00135] Ejemplo 11 Síntesis de 4-(5-*N,N*-dimetilcarboxamido-2-piridilditio)butanoato de sulfo-*N*-succinimidilo (**5b**).** Se preparó una solución de **17a** (0,86 g, 2,86 mmol) en dimetilformamida destilada en vidrio (30 ml) en un matraz de reacción de fondo redondo y se trató con sulfo-*N*-hidroxisuccinimida (0,63 g, 2,9 mmol). Se preparó una solución de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,65 g, 3,2 mmol) en dimetilformamida destilada en vidrio (10 ml) y se añadió al matraz de reacción. La reacción procedió en una atmósfera de argón, con agitación, a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción marrón resultante se filtró usando papel de filtro grueso al vacío; la torta de filtro se lavó una vez usando dimetilformamida destilada en vidrio (5 ml). El éster de sulfosuccinimida **5b** se precipitó usando nueve volúmenes de isopropanol, añadido lentamente con agitación. El precipitado resultante se filtró y se transfirió a un pre-alquitranado para producir **5b** en forma de un polvo blanco (rendimiento del 47%). MS m/z: encontrado 521,9 (M + Na⁺); Calculado: 522.
- 40
- 45 **[00136]** Análisis de HPLC: La pureza se determinó por análisis de HPLC usando una columna C-18 analítica Vydac (longitud: 100 mm, i.d.: 4,6 mm, tamaño de partícula: 3 micrómetros) a un caudal de 1,5 ml/min eluyendo en un gradiente lineal de agua y acetonitrilo, yendo de acetonitrilo al 20% a acetonitrilo al 50% durante 20 min. En estas condiciones, **5b** eluyó con un tiempo de retención de 7,48 min. y la pureza era de >90%.
- 50 **[00137] Ejemplo 12: Síntesis de conjugado.** Se disolvió enlazador SPP o SSNPP en etanol a una concentración de aproximadamente 10 mM. El anticuerpo se dializó en tampón A (KPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Para la reacción del enlazador, el anticuerpo estaba a 8 mg/ml, y se añadieron 7 equivalentes del enlazador agitando al mismo tiempo en presencia de etanol al 5% (v/v). La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 90 minutos. El enlazador sin reaccionar se retiró del anticuerpo por filtración en gel Sephadex G25 usando una columna Sephadex G25 equilibrada con tampón A a pH 6,5 o tampón fosfato potásico 150 mM que contenía NaCl 100 mM, pH 7,4 como se indica. Para el enlazador SPP, el grado de modificación se evaluó por liberación de piridina-2-tiona usando DTT 50 mM y midiendo la absorbancia a 343 nm como se describe a continuación ($\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para piridina-2-tiona libre). Para SSNPP, la modificación se evaluó directamente midiendo la absorbancia a 325 nm ($\epsilon_{325} = 10.964 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el grupo 4-nitropiridil-2-ditio unido a anticuerpo). Para la reacción de conjugación, el fármaco que contenía tiol (DM1 o DC4) se disolvió en DMA (*N,N*-dimetilacetamida) a una concentración de aproximadamente 10 mM. El fármaco (exceso molar de 0,8 - 1,7 veces con relación a la cantidad de moléculas enlazadoras por anticuerpo como se indica) se añadió lentamente con agitación al anticuerpo que estaba a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón A (pH 6,5 o pH 7,4) en una concentración final del 3% (v/v) de DMA. La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante los tiempos indicados. El anticuerpo conjugado con fármaco se purificó usando una columna Sephadex
- 55
- 60
- 65

G25 equilibrada con tampón B (PBS, pH 6,5). Para DML, el grado de conjugación de fármaco al anticuerpo se evaluó midiendo la A_{252} y A_{280} del conjugado como se describe a continuación. Se usó un enfoque similar para DC4 (véase a continuación).

- 5 **[00138]** Medición de la concentración de piridina-2-tiona liberable y de Ab del Ab modificado con SPP. La proporción molar de piridina-2-tiona liberada por mol de anticuerpo se calcula midiendo la A_{280} de la muestra y después el aumento en la A_{343} de la muestra después de añadir DTT (50 μ l de DTT 1 M/ml de muestra). La concentración de piridina-2-tiona liberada por DTT se calcula usando una ϵ_{343} de 8080 $M^{-1}cm^{-1}$. La concentración de anticuerpo después puede calcularse usando una ϵ_{280} de 194.712 $M^{-1}cm^{-1}$
- 10 después de sustraer la contribución de la absorbancia de la piridina-2-tiona a 280 nm (A_{343nm} post DTT x 5100/8080) de la A_{280nm} total medida antes de la adición de DTT. Después puede calcular la proporción molar de piridina-2-tiona:Ab. La concentración en mg/ml (g/l) de Ab se calcula usando un peso molecular de 147.000 g/mol.
- 15 **[00139]** Medición de la concentración de grupos 5-nitropiridil-2-ditio unidos al anticuerpo y de Ab del Ab modificado con SSNPP. La proporción molar de los grupos 4-nitropiridil-2-ditio unidos por mol de anticuerpo se calcula midiendo la A_{280} y A_{325} de la muestra sin tratamiento con DTT. La cantidad de grupos 4-nitropiridil-2-ditio unidos por el anticuerpo se calcula usando una ϵ_{325nm} de 10.964 $M^{-1}cm^{-1}$. La concentración de anticuerpo después puede calcularse usando una ϵ_{280nm} de 194.712 $M^{-1}cm^{-1}$ después de sustraer la contribución de la absorbancia del grupo 5-nitropiridil-2-ditio a 280 nm (A_{325nm} x 3344/10964) de la A_{280nm} total medida. Después puede calcularse la proporción molar de los grupos 4-nitropiridil-2-ditio:Ab. La concentración en mg/ml (g/l) de Ab se calcula usando un peso molecular de 147.000 g/mol.
- 20 **[00140]** Cálculo de las concentraciones del componente Ab y DM1 de Ab-DM1. El Ab y DM1 ambos absorben a los dos longitudes de onda usadas para medir cada componente por separado, es decir, 280 y 252 nm. Los componentes se cuantifican usando las siguientes expresiones algebraicas que representan la contribución de cada componente a cada longitud de onda (C_{Ab} es la concentración molar de Ab y C_D es la concentración molar de DM1):
- 25 1) A_{280} Total = $194.712C_{Ab} + 5.700C_D$
- 30 2) A_{252} Total = $(194.712 \times 0,37)C_{Ab} + (4,7 \times 5.700) C_D$
- [00141]** Cada ecuación se resuelve para C_{Ab} :
- 35 1a)
- $$C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5.700C_D}{194.712}$$
- 2a)
- $$C_{Ab} = \frac{A_{252} - 26.790C_D}{72.043}$$
- 40 y se establece una igualdad (ecuación 1a = ecuación 2a) y se resuelve para C_D :
- $$C_D = \frac{A_{252} - 0,37A_{280}}{24.681}$$
- 45 **[00142]** Una vez se ha calculado C_D , el valor se usa para resolver C_{Ab} en la ecuación 1a (o 2a) anterior. Después puede calcularse la proporción DM1:Ab. La concentración en mg/ml (g/l) del anticuerpo se calcula usando un peso molecular de 147.000 g/mol y la concentración de DM1 se calcula usando un peso molecular de 736,5 g/mol (DM1 unido).
- 50 **[00143]** La eficacia del intercambio de disulfuro se aumenta con SSNPP. Como se muestra en la Tabla 1, la eficacia de la conjugación se potencia en reacciones en las que se usa SSNPP como reticulante en comparación con reacciones que usan SPP. El porcentaje de eficacia se calculó dividiendo el valor para DM1 por anticuerpo por la proporción de enlazador por anticuerpo por 100. Las conjugaciones del anticuerpo N901 usando SSNPP produjeron eficacias de entrecruzamiento del 93% a ambos pH 6,5 y 7,4.
- 55 La eficacia de la conjugación de N901 con SPP en estos experimentos fue del 70% a pH 6,5 y del 77% a pH 7,4. La eficacia aumentada con SSNPP demuestra que puede conseguirse una proporción diana de DM1 a anticuerpo usando un anticuerpo que está modificado con una cantidad reducida de moléculas enlazadoras. De hecho, se consiguió una proporción similar de fármaco a anticuerpo (4,3) en el conjugado final con una preparación de anticuerpo que tenía 4,2 grupo (5-nitropiridil-2-ditio) por anticuerpo introducidos con SSNPP en comparación con un anticuerpo que tenía 5,6 grupos piridil-2-ditio introducidos con SPP (Tabla 2). La cantidad de fármaco necesaria para obtener resultados de conjugación comparables fue, por lo tanto, un 25% inferior para el anticuerpo modificado con SSNPP que para el anticuerpo modificado con SPP en estas condiciones. Un beneficio potenciar adicional de la eficacia aumentada con SSNPP es que puede usarse un exceso molar reducido de DM1 en la reacción de conjugación. Una comparación de las proporciones de DM1 por anticuerpo después de la conjugación con un intervalo de equivalentes de fármaco en la reacción (exceso de 0,8 - 1,7 veces) muestra que un exceso molar de 1,1 veces es suficiente para conseguir una eficacia de conjugación del 100% usando el reticulante SSNPP (Figura 7). Se muestra una comparación del transcurso del tiempo de la reacción de DM1 con anticuerpo que se ha modificado con SSNPP o SPP en la Figura 8. En cada caso, el anticuerpo modificado se trató con un exceso molar de 1,1 veces de DM1 por mol de enlazador incorporado. La
- 70

reacción con el anticuerpo modificado con SSNPP es considerablemente más rápida que con el anticuerpo modificado con SPP (Figura 8). Incluso un exceso molar de 1,7 veces no es suficiente para conseguir una eficacia similar usando SPP. La capacidad de usar 1) un exceso molar inferior de DM1 y 2) menos enlazadores por anticuerpo permite una reducción en la cantidad de fármaco necesaria para conseguir una proporción diana de DM1 a anticuerpo en como mucho un 50% cuando se usa SSNPP como reticulante en lugar de SPP.

[00144] La eficacia aumentada de conjugación usando el enlazador SSNPP se consigue sin comprometer el carácter monomérico del conjugado y la cantidad de fármaco no conjugado (libre) asociado con el conjugado de anticuerpo. Se usa análisis SEC para determinar la cantidad de monómero, dímero, trímero, o agregados de mayor peso molecular. Se obtuvieron resultados típicos de más del 90% de monómero con cualquier enlazador como se muestra en la Tabla 1. El nivel de fármaco no conjugado se midió por análisis de HPLC de fase inversa de la muestra de conjugado. El porcentaje de fármaco libre para cualquier reacción fue menor del 2%. Además, son posibles tiempos de reacción de conjugación más cortos con SSNPP en comparación con SPP (5), lo que puede disminuir la pérdida de algunos anticuerpos que son sensibles a una exposición prolongada al disolvente orgánico necesario en la reacción de conjugación. Tiempos de reacción más cortos deben disminuir la pérdida de fármaco debido a la dimerización de DM1, que es una reacción secundaria competitiva durante la conjugación. Los aumentos resultantes en el rendimiento y las reacciones secundarias reducidas deben contribuir adicionalmente a necesidades reducidas de DM1.

[00145] La velocidad y eficacia potenciadas de conjugación cuando se usa SSNPP también se observaron cuando se conjugaba un fármaco diferente con el anticuerpo, lo que demuestra la amplia aplicabilidad de este nuevo reactivo enlazador. Se muestra una comparación de las eficacias de conjugación usando SSNPP y SPP cuando se conjuga el anticuerpo N901 con el fármaco alquilante de ADN, DC4, un análogo de CC-1065, en la Tabla 3. En 2 horas, la reacción que usa el reactivo reticulante SSNPP se había completado mientras que la reacción que usa el reactivo SPP mostró solamente un 73% de completitud en 2 horas y una incorporación significativa de fármaco más allá de 2 horas (el 91% después de 18 horas). Sólo tiempos de reacción muy prolongados pueden conducir a una completitud del 100%.

[00146]

Tabla 1. Comparación del enlazador SSNPP y SPP en la conjugación del anticuerpo N901 con DM1. La conjugación se realizó durante 2 horas al pH indicado usando un exceso molar de 1,7 veces de DM1 por enlazador.

Enlazador	pH	Enlazador /Ab	DM1 /Ab	% Eficacia	% fármaco libre	Análisis SEC			
						Monómero	Dímero	Trímero	HMW
SSNPP	7,4	4,1	3,8	93	0,8	91,9	6,3	0,6	0,1
SPP	7,4	5,6	4,3	77	1,8	93,6	4,9	0,4	0,2
SSNPP	6,5	4,0	3,7	93	0,9	-	-	-	-
SPP	6,5	6,6	4,6	70	1,9	-	-	-	-

[00147]

Tabla 2. Proporción reducida de enlazador a anticuerpo necesaria para alcanzar la proporción diana de DM1 a anticuerpo ratio con SSNPP como enlazador. La conjugación se realizó durante 2 horas a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,1 veces de DM1 por enlazador.

Enlazador	Enlazador/Ab	DM1/Ab
SSNPP	4,2	4,3
SPP	5,6	4,3

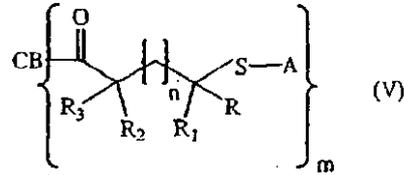
[00148]

Tabla 3. Comparación del enlazador SSNPP y SPP en la conjugación del anticuerpo N901 con DC4. La conjugación se realizó durante el tiempo indicado a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,4 veces de DC4 por enlazador.

Enlazador	Tiempo, h	Enlazador/Ab	DC4/Ab	% eficacia
SSNPP	2	4,2	4,3	102
SSNPP	18	4,2	4,1	98
SPP	2	5,6	4,1	73
SPP	18	5,6	5,1	91

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, en el que dicho conjugado está representado por la fórmula (V):

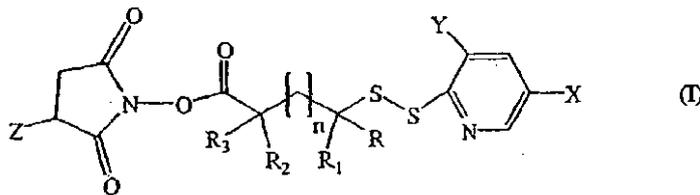


5

en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, y m es un número entero de 1 a 10 o más, comprendiendo dicho método:

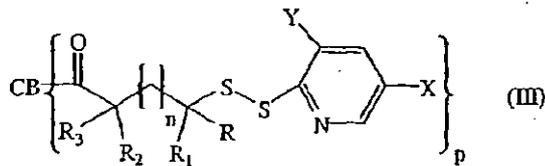
10

- (1) hacer reaccionar el agente de unión celular con un reticulante de fórmula (I):



15

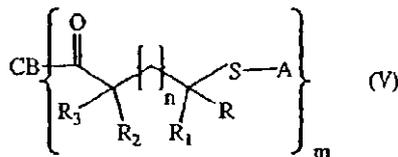
en la que X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂ con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, para dar de este modo un compuesto de fórmula (III):



20

en la que p representa un número entero de 1 a 10 o más, y (2) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (III) con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.

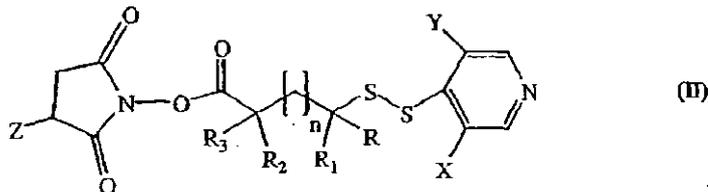
2. Un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, en el que dicho conjugado está representado por la fórmula (V):



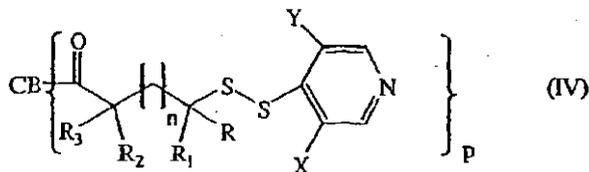
25

en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, y m es un número entero de 1 a 10 o más, comprendiendo dicho método:

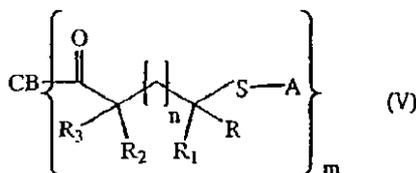
- (1) hacer reaccionar el agente de unión celular con un reticulante de fórmula (II):



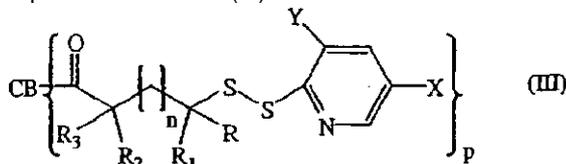
- 5 en la que X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂, con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃⁻M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, para dar de este modo un compuesto de fórmula (IV):



- 10 en la que p representa un número entero de 1 a 10 o más, y
 (2) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IV) con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.
3. Un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, en el que dicho conjugado está representado por la fórmula (V):

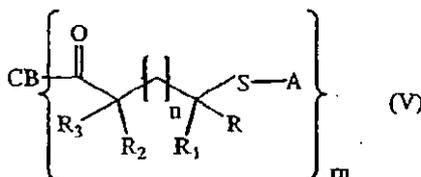


- 15 en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, y m es un número entero de 1 a 10 o más, comprendiendo dicho método: hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III)

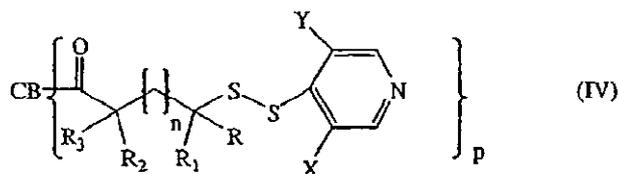


- 20 en la que X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂ con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y p representa un número entero de 1 a 10 o más, con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.

- 25 4. Un método para preparar un conjugado que comprende un agente de unión celular y uno o más fármacos de molécula pequeña, en el que dicho conjugado está representado por la fórmula (V):

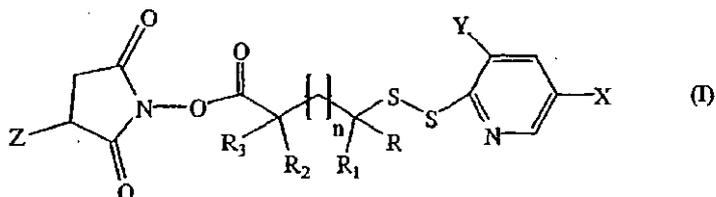


- 30 en la que CB representa el agente de unión celular, A representa el fármaco de molécula pequeña unido por un resto disulfuro, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, y m es un número entero de 1 a 10 o más, comprendiendo dicho método: hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV):



5 en la que X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂, con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y p representa un número entero de 1 a 10 o más, con uno o más fármacos de molécula pequeña que comprenden un grupo tiol libre.

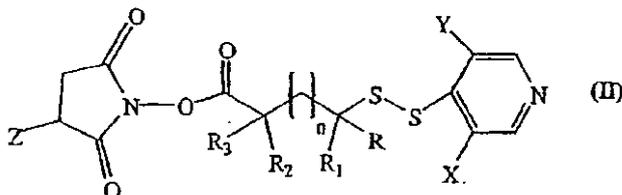
5. Un reticulante de fórmula (I):



10 en la que R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son CONR₄R₅ o NO₂, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, con la condición de que cuando X y/o Y es NO₂ Z no sea H.

15

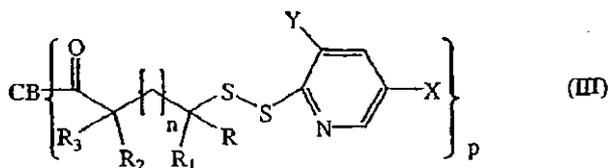
6. Un reticulante de fórmula (II):



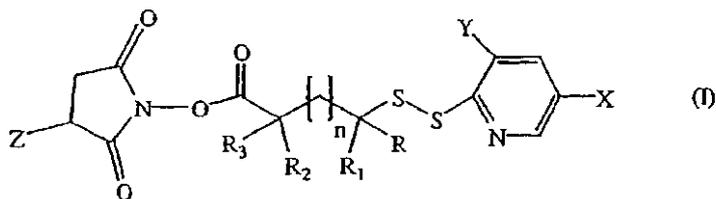
20 en la que R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son CONR₄R₅ o NO₂, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y Z es SO₃M⁺ o H, donde M⁺ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio, con la condición de que cuando X y/o Y es NO₂ Z no sea H.

25

7. Un método para preparar un compuesto de fórmula (III):

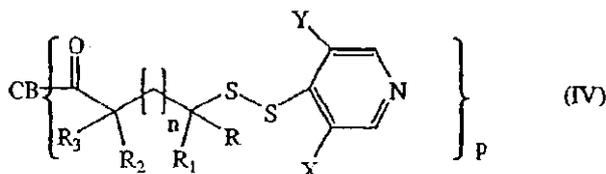


30 en la que CB representa un agente de unión celular, R, R₁, R₂ y R₃ son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR₄R₅ o NO₂ con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R₄ y R₅ son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y p representa un número entero de 1 a 10 o más, que comprende hacer reaccionar el agente de unión celular, CB, con un reticulante de fórmula (I):



en la que Z es SO_3M^+ o H, donde M^+ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio.

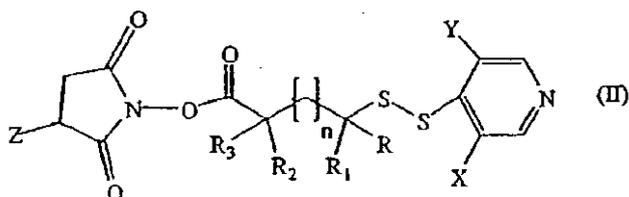
8. Un método para preparar un compuesto de fórmula (IV):



5

en la que CB representa un agente de unión celular, R, R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes y son H, metilo, etilo, o alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, n es 0 o un número entero de 1 a 4, X e Y son iguales o diferentes y son H, CONR_4R_5 o NO_2 con la condición de que X e Y no sean ambos H al mismo tiempo, R_4 y R_5 son iguales o diferentes y son cada uno H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo o terc-butilo, y p representa un número entero de 1 a 10 o más, que comprende hacer reaccionar el agente de unión celular con un reticulante de fórmula (II):

10



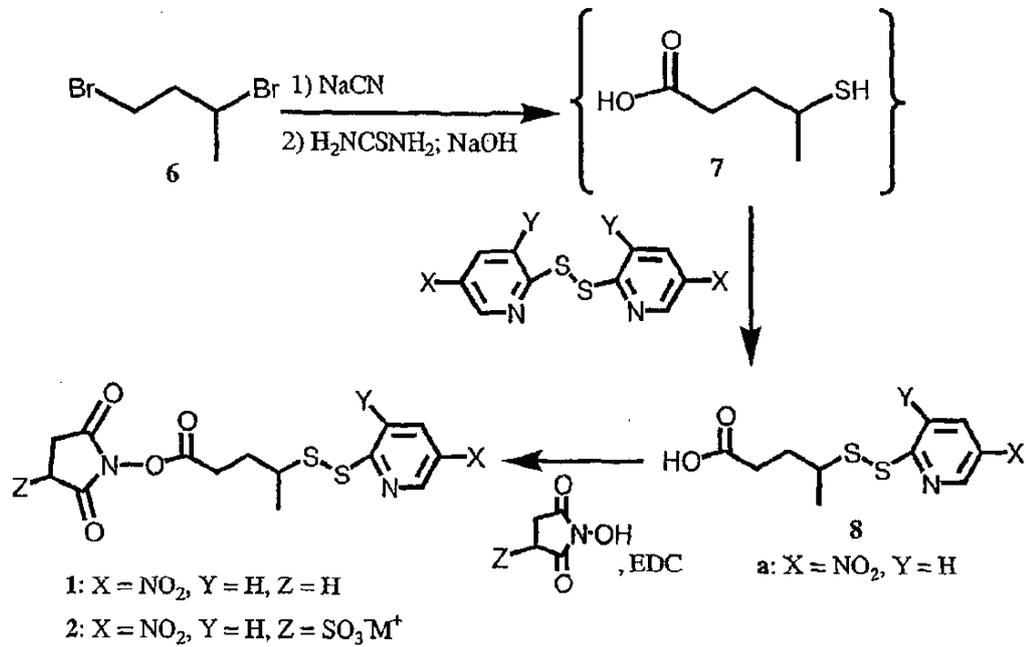
15

en la que Z es SO_3M^+ o H, donde M^+ representa un ión metálico o un ión tetraalquilamonio.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 7, 8, en el que el agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 7, 8, en el que el agente de unión celular es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fármaco de molécula pequeña es un agente citotóxico.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fármaco de molécula pequeña es al menos un miembro seleccionado entre el grupo compuesto por un compuesto de maitansinoide, un compuesto de taxano, un compuesto de CC-1065, un compuesto de daunorrubicina, un compuesto de doxorrubicina, y análogos o derivados de los mismos.
13. El método o reticulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que tanto R como R_1 son H o metilo, o uno de R y R_1 es H y el otro es metilo.
14. El método o reticulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que n es 1, R_1 es metilo, y R, R_2 y R_3 son H.
15. El método o reticulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que n es 1, y R, R_1 , R_2 y R_3 son H.
16. El método o reticulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que n es 1, y R y R_1 son ambos metilo, y R_2 y R_3 son ambos H.

40

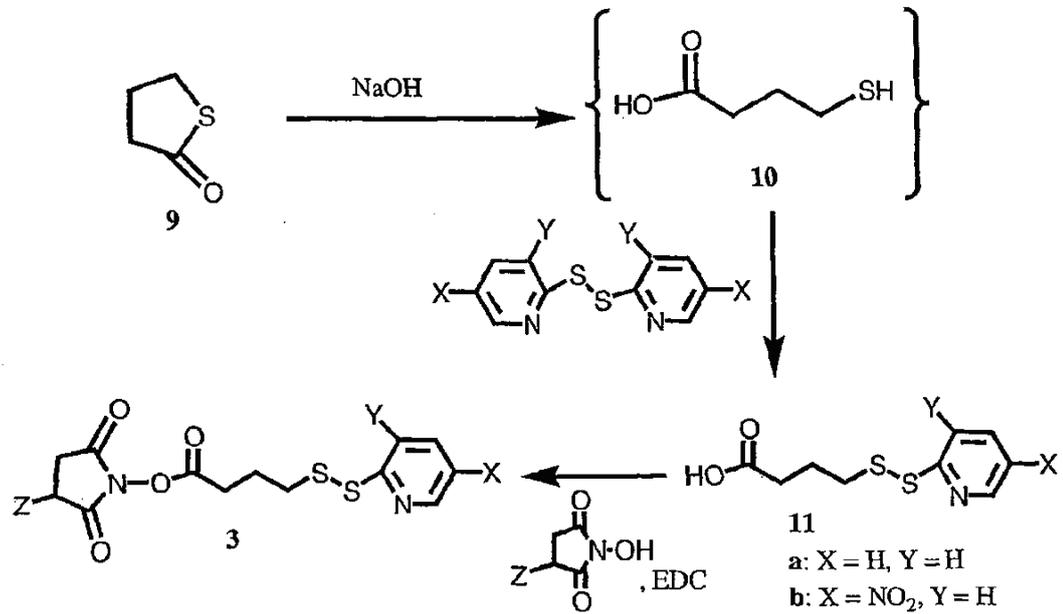
Figura 1



X	Y	Z
NO ₂	H	H
NO ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺
H	NO ₂	H
H	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
NO ₂	NO ₂	H
NO ₂	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
CONMe ₂	H	H
CONMe ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺
H	CONMe ₂	H
H	CONMe ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
CONMe ₂	CONMe ₂	H
CONMe ₂	CONMe ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺

M = Na, K etc

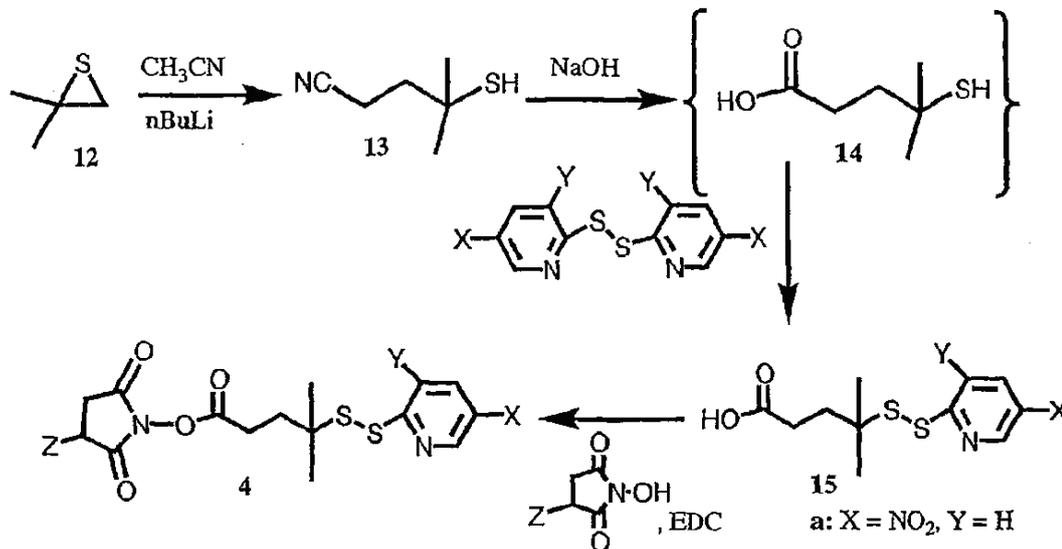
Figura 2



X	Y	Z
H	H	H (Compuesto 3a)
NO ₂	H	H (Compuesto 3b)
NO ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺ (Compuesto 3c)
H	NO ₂	H
H	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
NO ₂	NO ₂	H
NO ₂	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺

M = Na, K etc

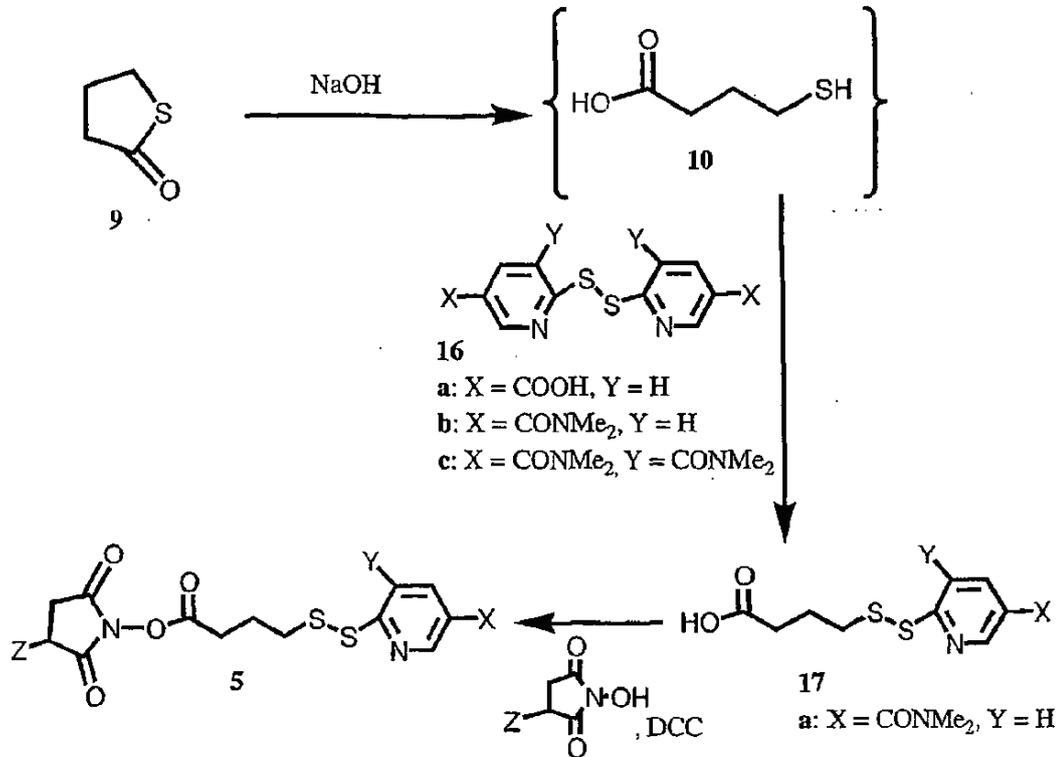
Figura 3



X	Y	Z
NO ₂	H	H (Compuesto 4a)
NO ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺ (Compuesto 4b)
H	NO ₂	H
H	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
NO ₂	NO ₂	H
NO ₂	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
H	H	H
CONMe ₂	H	H
CONMe ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺
H	CONMe ₂	H
H	CONMe ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺
CONMe ₂	CONMe ₂	H
CONMe ₂	CONMe ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺

M = Na, K etc

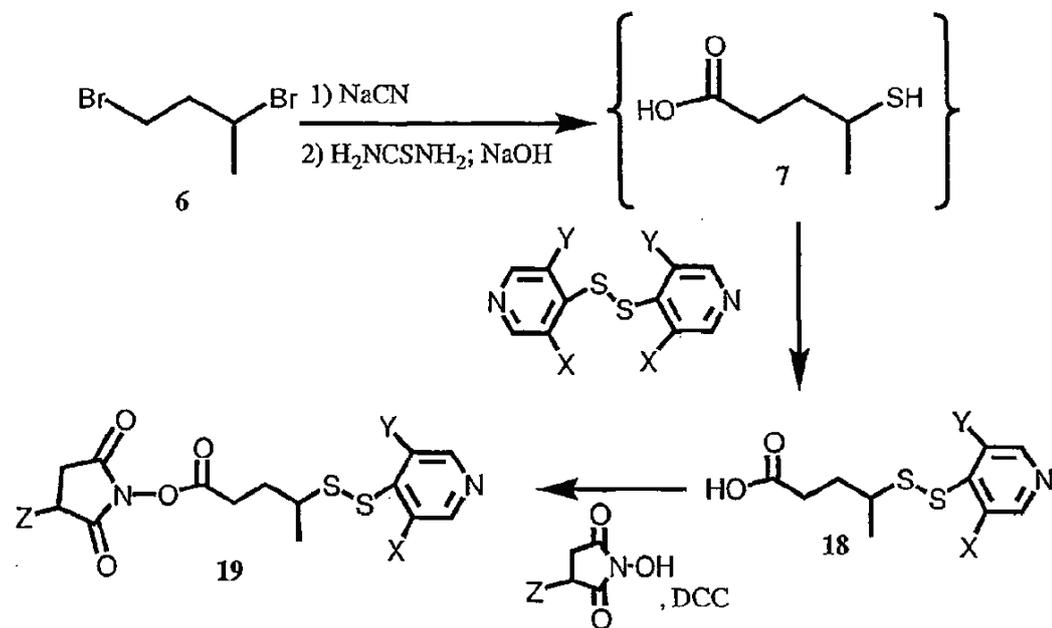
Figura 4



X	Y	Z
CONMe ₂	H	H (Compuesto 5a)
CONMe ₂	H	SO ₃ M ⁺ (Compuesto 5b)
H	CONMe ₂	H
H	CONMe ₂	SO ₃ M ⁺
CONMe ₂	CONMe ₂	H
CONMe ₂	CONMe ₂	SO ₃ M ⁺

M = Na, K etc

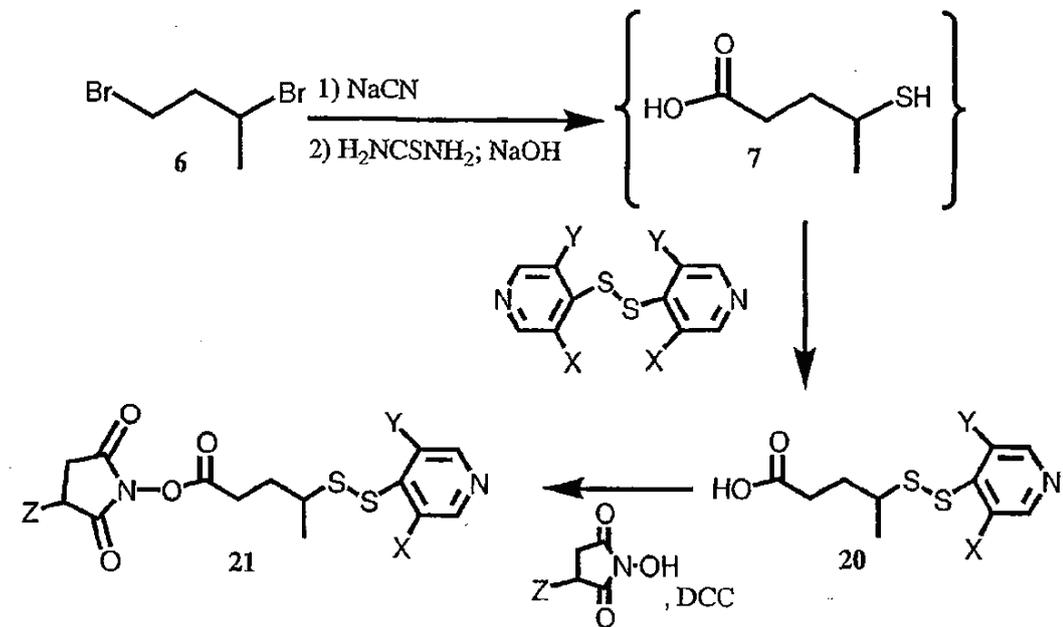
Figura 5



X	Y	Z
CONMe ₂	H	H
CONMe ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺
CONMe ₂	CONMe ₂	H
CONMe ₂	CONMe ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺

M = Na, K etc

Figura 6



X	Y	Z
NO ₂	H	H
NO ₂	H	SO ₃ ⁻ M ⁺
NO ₂	NO ₂	H
NO ₂	NO ₂	SO ₃ ⁻ M ⁺

M = Na, K etc

Figura 7. Comparación de SSNPP y SPP para la eficacia de conjugación con una cantidad creciente de equivalentes de fármacos en la reacción de conjugación.
 a) Proporción de fármaco por anticuerpo; b) % de eficacia de conjugación en base a las proporciones de enlazador a anticuerpo de 4,2 para SSNPP y 5,6 para SPP.

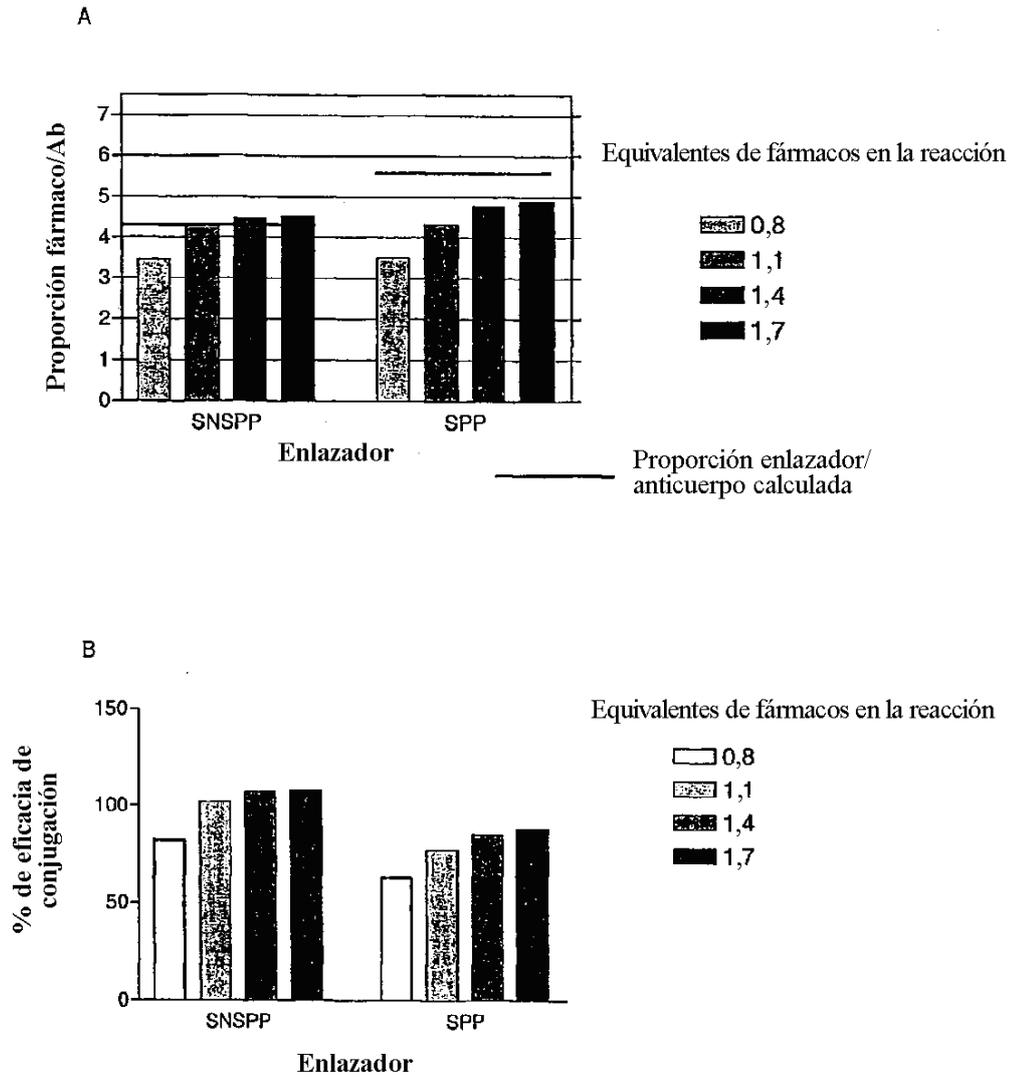
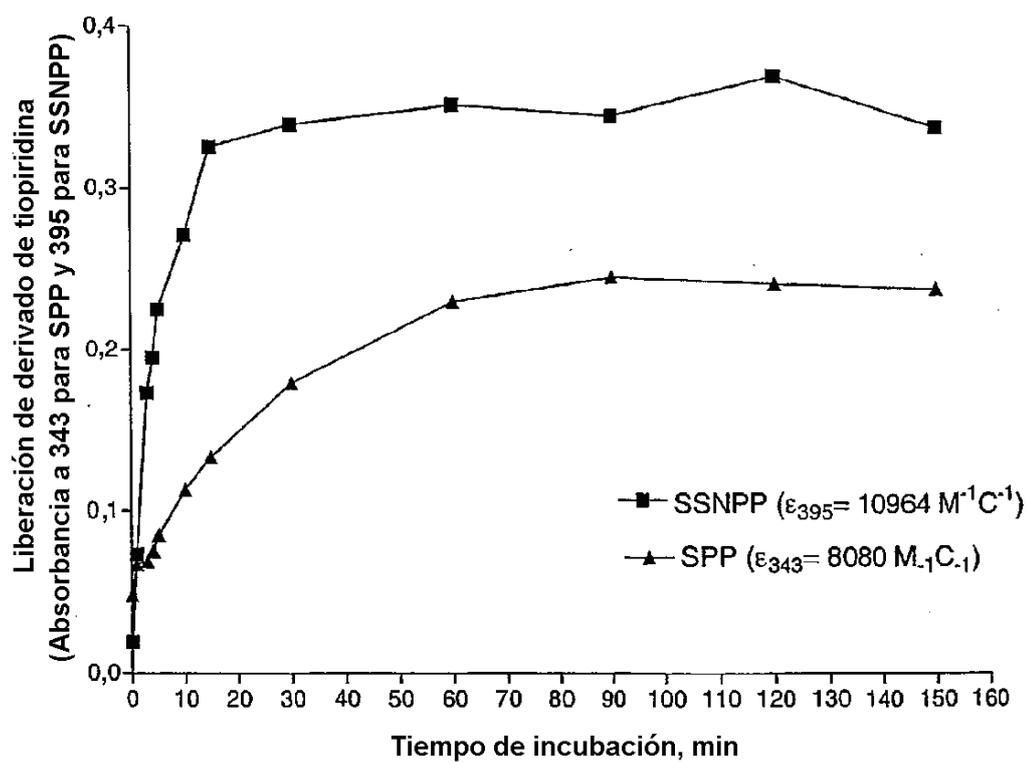


Figura 8. Transcurso de tiempo para el intercambio de tiol con enlazador SSNPP y SPP a pH 7,4. La conjugación se realizó a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,1 veces de DMI por enlazador.



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 60403652 B [0001]
 • US 4563304 A [0004]
 • US 5208020 A [0005] [0058]
 • US 5416064 A [0005] [0058]
 • US 6340701 B1 [0036]
 15 • US 5846545 B1 [0036]
 • US 5585499 B1 [0036]
 • US 5475092 B1 [0036]
 • US 5414064 B1 [0036]
 • US 5208020 B1 [0036]
 20 • US 4563304 B1 [0036]
 • US 5639641 A [0039]
 • US 5885793 A, Griffiths [0040]
 • WO 9201047 A, McCafferty [0040]
 • WO 9906587 A, Liming [0040]
 25 • US 4256746 A [0056]
 • US 4361650 A [0056]
 • US 4307016 A [0056]
 • US 4294757 A [0056]
 • US 4424219 A [0057]
 30 • US 4331598 A [0057]
 • US 4450254 A [0057]
 • US 4364866 A [0057]
 • US 4313946 A [0057]
 • US 4315929 A [0057]
 35 • US 4362663 A [0057]
 • US 4322348 A [0057]
 • US 4371533 A [0057]
 • US 5475011 A [0084]
 • US 5811452 A [0084]
 40 • US 5475092 A [0102]
 • US 5585499 A [0102]
 • US 5846545 A [0102]
 • WO 0138318 A [0114]
 • US 5146064 A [0114]
 45

Documentos no de patentes citados en la descripción

- J. Carlsson et al. Biochem. J., 1978, vol. 173, 723-737 [0004] [0036]
 • Goff D. A. ; Carroll, S. F. BioConjugate Chem., 1990, vol. 1, 381-386 [0004]
 50 • L. Delprino et al. J. Pharm. Sci., 1993, vol. 82, 506-512 [0004] [0036]
 • S. Arpicco et al. BioConjugate Chem, 1997, vol. 8, 327-337 [0004]
 • R.V.J. Chari et al. Cancer Res., 1992, vol. 52, 127-131 [0005]
 • R.V.J. Chari et al. Cancer Research, 1992, vol. 52, 127-131 [0036]
 • R.V.J. Chari et al. Cancer Research, 1995, vol. 55, 4079-4084 [0036]
 55 • Goff D. A. ; Carroll, S. F. 1. BioConjugate Chem., 1990, 381-386 [0036]
 • S. Arpicco et al. Bioconjugate Chem, 1997, vol. 8, 327-337 [0036]
 • Parham. J. Immunol., 1983, vol. 131, 2895-2902 [0039]
 • Spring et al. J. Immunol., 1974, vol. 113, 470-478 [0039]
 • Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys., 1960, vol. 89, 230-244 [0039]
 60 • Burgess. Immunology Today, 1984, vol. 5, 155-158 [0039]
 • O'Keefe et al. J. Biol. Chem., 1985, vol. 260, 932-937 [0039]
 • Roy et al. Blood, 1991, vol. 77, 2404-2412 [0042]
 • Nadler et al. J. Immunol., 1983, vol. 131, 244-250 [0042]
 • Roy et al. J. Nat. Cancer Inst., 1996, vol. 88, 1136-1145 [0042]
 65 • Ojima et al. J. Med. Chem., 1996, vol. 39, 3889-3896 [0084]
 • Ojima et al. J. Med Chem., 1997, vol. 40, 267-278 [0084]
 • Ojima et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, vol. 96, 4256-4261 [0084]
 • Warpehoski et al. J. Med Chem., 1988, vol. 31, 590-603 [0090]