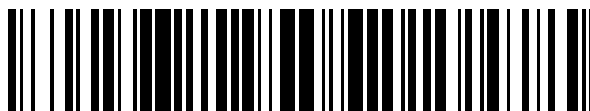


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 879**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
C08F 4/00 (2006.01)
C08F 220/58 (2006.01)
C08F 8/04 (2006.01)
C08F 8/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06794542 .8**
96 Fecha de presentación: **12.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1926757**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **Conjugado de anticuerpo - polímero de peine.**

30 Prioridad:
14.09.2005 GB 0518771
09.01.2006 GB 0600315

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

73 Titular/es:
UCB PHARMA, S.A.
60, ALLÉE DE LA RECHERCHE
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
NORMAN, Timothy, John;
CANDOLE, Benjamin, Charles de y
ALI, Mezher, Hussein

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 382 879 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugado de anticuerpo - polímero de peine.

5 La presente invención se refiere a compuestos para uso en la unión de moléculas efectoras a anticuerpos. Más específicamente la invención se refiere a moléculas que comprenden conjugados de anticuerpo - polímero de peine a las que se unen moléculas efectoras y restos solubilizantes. También se proporcionan métodos para la producción de tales moléculas y composiciones farmacéuticas que las contienen.

10 La especificidad de unión de los anticuerpos se puede usar para administrar moléculas efectoras, tales como fármacos, a dianas terapéuticas específicas tales como células tumorales. Las moléculas efectoras pueden unirse a anticuerpos usando diversos métodos que incluyen, por ejemplo, la unión directa (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.677.425; EP 0948544) o la unión mediante un enlazador (véase, por ejemplo, el documento US 6.214.345).

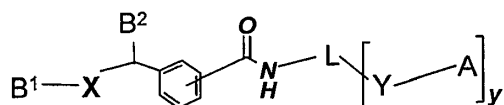
15 Se puede unir polietilenglicol (PEG) a proteínas o polipéptidos para reducir la inmunogenicidad, incrementar la semivida de circulación *in vivo* y para incrementar la solubilidad de la proteína. Se puede unir PEG a la proteína como un polímero de peine (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/113394).

20 La presente invención proporciona nuevos conjugados de anticuerpo - polímero de peine a los que se pueden unir tanto moléculas efectoras como restos solubilizantes.

Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos que constan esencialmente de uno o más anticuerpos unidos a uno o más polímeros de peine en los que el polímero de peine comprende una o más moléculas efectoras y opcionalmente uno o más grupos solubilizantes.

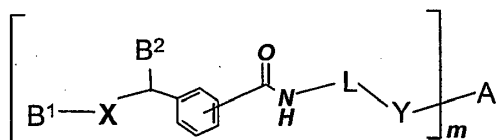
25

En consecuencia la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib):



(Ia)

30



(Ib)

en las que:

35 y es 1, 2 o 3

m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

B¹ representa un halógeno

40

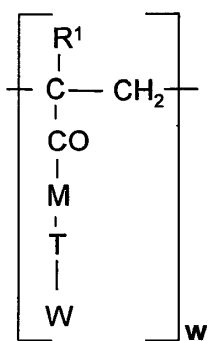
B² representa H o un halógeno

A representa el residuo de un anticuerpo o uno de sus fragmentos

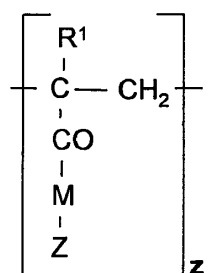
45 Y representa un grupo espaciador

L representa un grupo enlazador

50 X representa un resto de polímero de peine que comprende w equivalentes de una o más moléculas efectoras y z equivalentes de uno o más restos solubilizantes en agua, en el que X comprende los componentes de fórmula (III) y (IV) en cualquier orden:



(III)



(IV)

5 en las que:

w es al menos 1;

z es 0 o mayor;

10

T no está o es un grupo enlazador;

W es una molécula efectora

15

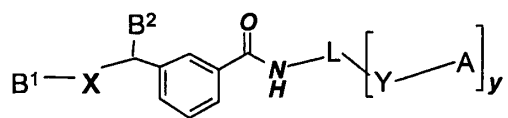
Z es un resto solubilizante en agua;

M es NH u O; y

20

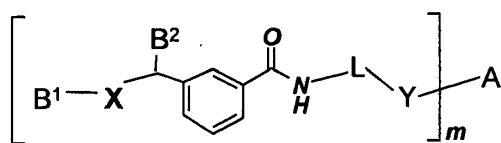
R¹ es metilo o H.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (Ia) tiene la fórmula (IIa).



(IIa)

25 Preferentemente, el compuesto de fórmula (Ib) tiene la fórmula (IIb).



(IIb)

De manera adecuada m es 1 o 2.

5 En una realización, y es 1.

Preferentemente el halógeno para uso en la presente invención es o bien bromo o bien cloro. Preferentemente cloro.

10 Como se usa en el presente documento, el término "residuo" se entenderá que significa la parte de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que permanece después de haber experimentado una reacción de sustitución como tal terminología es conocida para la persona experta en la técnica.

15 El residuo A incluye residuos de anticuerpos enteros y sus fragmentos o derivados funcionalmente activos y pueden ser, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados o quiméricos, anticuerpos de una sola cadena, fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores.

20 Se apreciará que el residuo A incluye residuos de anticuerpos entrecruzados. Tales anticuerpos entrecruzados son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.262.524). El término "anticuerpos entrecruzados" como se usa en el presente documento se refiere a dos, tres o cuatro anticuerpos o sus fragmentos, enlazados mediante una estructura de conexión. La estructura de conexión puede ser cualquier estructura molecular capaz de enlazar los anticuerpos o sus fragmentos juntos véase, por ejemplo, el documento WO 92/22583, que describe proteínas de unión a antígeno mono-específicas tri- y tetra-valentes que comprenden fragmentos Fab' unidos entre sí mediante una estructura de conexión. En una realización el anticuerpo entrecruzado comprende tres fragmentos de anticuerpo, preferentemente fragmentos Fab' conectados como se describe en el documento WO 25 2005/113605, publicado el 1 de diciembre de 2005. En otra realización el anticuerpo entrecruzado comprende dos fragmentos de anticuerpo conectados como se describe en el documento WO 2005/061005.

30 Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que específicamente une un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

35 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica tal como técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495 - 497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", p. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

40 Los anticuerpos para uso en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpo de linfocitos individuales mediante clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, por los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843 - 7848, en los documentos WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

45 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

50 Los anticuerpos quiméricos son los anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que se han modificado por ingeniería genética de manera que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

55 Los anticuerpos para uso en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41 - 50; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177 - 186; Kettleborough *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952 - 958; Persic *et al.*, *Gene*, 1997 187, 9 - 18; y Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191 - 280; los documentos WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401; y los documentos US 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047,

5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108. También se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de una sola cadena, tales como los descritos en el documento US 4.946.778, para producir anticuerpos de una sola cadena. También se pueden usar, ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

5 En un ejemplo los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO 9915549 y WO 98/25971.

10 Otros fragmentos de anticuerpo incluyen los descritos en los documentos WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171.

De manera adecuada los fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención contienen un único tiol libre, preferentemente en la región bisagra.

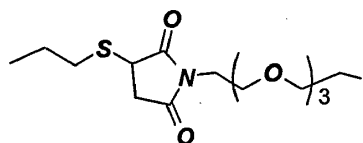
15 Los anticuerpos o sus fragmentos de la presente invención en general serán capaces de unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a células, por ejemplo un antígeno de superficie sobre células tales como células bacterianas, células de levaduras, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también pueden ser cualquier antígeno médicamente pertinente, tales como los antígenos regulados por incremento durante la enfermedad o infección, por ejemplo receptores y / o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos particulares de antígenos de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas $\beta 1$ por ejemplo, VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD70, CD134, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, antígenos de MHC de Clase I y antígenos de MHC de Clase II y VEGF y, cuando sea apropiado, sus receptores. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos víricos por ejemplo antígenos de virus respiratorio sincicial o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores de estimulación de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, cuando sea apropiado, sus receptores.

El grupo espaciador para uso en la presente invención, comprenderá de manera adecuada cualquier resto conocido para la persona experta en la técnica que sea capaz de formar un puente entre el enlazador y el anticuerpo o su fragmento. En particular el grupo espaciador Y comprenderá de manera adecuada un resto conocido para la persona experta en la técnica que sea capaz de formar un puente entre el enlazador L y el residuo A. En un ejemplo, cuando A es el residuo de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que contiene un residuo de cisteína, el correspondiente grupo espaciador Y será de manera adecuada succinimida (es decir, el producto de reacción de un residuo de maleimida con el residuo A de polipéptido que contiene cisteína a través de un enlace tiol y el enlazador L a través del átomo de nitrógeno de la maleimida).

40 El grupo enlazador L comprenderá de manera adecuada cualquier resto conocido para la persona experta en la técnica que sea capaz de formar un puente entre el grupo espaciador Y y el átomo de N del grupo amida. L puede ser de cadena lineal o ramificada.

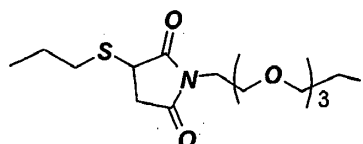
45 Los ejemplos típicos de L incluyen:

$-(CH_2)_n-$ en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;



50 Por consiguiente, en una realización, L representa $-(CH_2)_n-$. Preferentemente n es 2.

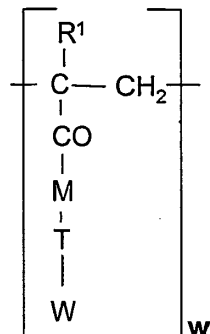
En otra realización, L representa



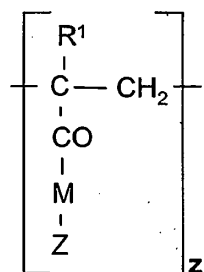
55 En la presente invención, X representa un resto de polímero de peine que comprende w equivalentes de una o más

moléculas efectoras y z equivalentes de un resto solubilizante en agua.

Por lo tanto, de manera adecuada, X comprende los componentes de fórmula III y IV en cualquier orden.



5 (III)

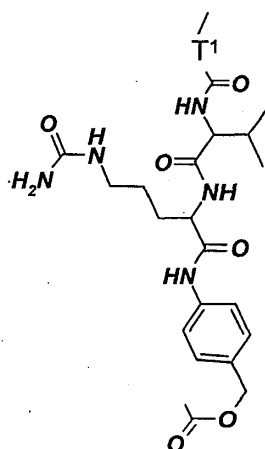


(IV)

en las que:

- 10 w es al menos 1;
z es 0 o mayor;
- 15 T no está o es un grupo enlazador;
W es una molécula efectora;
- 20 Z es un resto solubilizante en agua;
M es NH u O;
R¹ es metilo o H.
- 25 De manera adecuada M es NH.
- Típicamente w está entre 1 y 300. De manera adecuada w está entre 1 y 200. En una realización w está entre 1 y 100. En una realización w está entre 1 y 50. En una realización w está entre 1 y 20.
- 30 Típicamente z está entre 0 y 300. De manera adecuada z está entre 0 y 200. De manera adecuada z es al menos 1. En una realización z está entre 1 y 200. En una realización z está entre 1 y 100. En una realización z está entre 1 y 50. En una realización z está entre 1 y 20.
- 35 La cantidad total de compuestos III y IV (es decir, w+z) presente en X es al menos 1. Típicamente w+z está entre 1 y 300. En una realización w+z es 15. En una realización w+z es 13. En una realización w+z es 41. En una realización w+z es 96. En una realización w+z es 165. En una realización w+z es 262. Cuando w+z es 41 preferentemente w es 6 y preferentemente z es 35.
- 40 Los enlazadores adecuados, T, cuando están presentes, son bien conocidos en la técnica. Los enlazadores particularmente preferidos son enlazadores autodestructivos. Ejemplos de enlazadores autodestructivos se

describen en el documento US 6.214.345. Particularmente preferido es un enlazador que tiene la fórmula (V) siguiente:



(V)

5 en la que T^1 representa $[CH_2]_t$ o $CH_2CH_2[OCH_2CH_2]_n$ donde t está entre 1 y 10 y n está entre 5 y 100. En una realización, T^1 representa $[CH_2]_t$. En una realización t es 5. En una realización T^1 representa $CH_2CH_2[OCH_2CH_2]_n$. En una realización n está entre 5 y 30, preferentemente 12 o 24. En otra realización n está entre 40 y 100, preferentemente entre 40 y 80.

10 Se apreciará que la molécula efectora, W , puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas enlazadas de manera que forman un único resto. Los ejemplos de tales restos incluyen moléculas efectoras enlazadas mediante estructuras de conexión ramificadas.

15 También se apreciará que cuando w es mayor que 1, cada W puede ser igual o diferente.

Las moléculas efectoras para uso en la presente invención incluyen compuestos biológicamente activos adecuados para uso médico o de diagnóstico en el tratamiento de animales, incluyendo seres humanos. Tales moléculas incluyen ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos tales como los enumerados en el documento US 6.214.345, columna 8, línea 49 a columna 9 línea 13.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que mata) las células. Los ejemplos incluyen moléculas de unión al surco menor (véanse, por ejemplo, los compuestos proporcionados en Expert Opinion in Therapeutic Patents, 2004, 14, 1693 - 1724), combrestatinas, dolastatinas, auristatinas, epotilones, estaurosporina, maitansinoides, espongiestatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos. En una realización el agente citotóxico es el residuo de un compuesto 1-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-[indol-5-il condensado con el anillo (derivado de amina)] 3-sustituido o uno de sus análogos como se describe en el documento WO 03/097635. En una realización el agente citotóxico es el residuo de 1-(clorometil)-3-[(2E)-3-(4-metoxifenil)-2-propenoil]-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-5-amina.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , bismuto 213 , californio 252 , iridio 192 y tungsteno 188 /renio 188 ; o fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxinas de pseudomonas o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α ,
 5 interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógenos de tejido, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e
 10 inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnosis. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en
 15 tomografía por emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase en general la patente de EE.UU. n° 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar a anticuerpos para uso como herramienta de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminescentes adecuados incluyen
 20 luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

Otras moléculas efectoras pueden incluir proteínas o polímeros u otros compuestos que se pueden usar para
 25 prolongar la semivida y/o disminuir la inmunogenicidad del compuesto de la presente invención. Los ejemplos de proteínas adecuadas incluyen albúmina y proteínas de unión a albúmina o ácidos grasos de unión a albúmina. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen los descritos más adelante, en particular polímeros de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos tal como poli(etilenglicol).

30 El resto solubilizante en agua, Z, para uso en la presente invención incluye cualquier resto solubilizante conocido en la técnica tales como especies cargadas (positivas y negativas) tales como ácidos, aminas, aminas cuaternarias, especies bipolares tales como aminoácidos, polímeros tal como polietilenglicol, mono o poli hidroxialcanos, alcoholes (mono, di y tri) y azúcares. Un ejemplo particular de una amina adecuada es la fosfocolina.

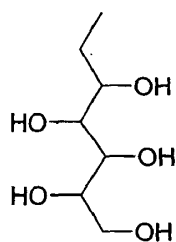
35 Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen cualquier polímero sintético o de origen natural sustancialmente soluble en agua, sustancialmente no antigénico, incluyendo, por ejemplo, polímeros de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o polisacáridos ramificados o no ramificados, por ejemplo, un homo- o hetero- polisacárido tal como lactosa, amilosa, dextrano o glucógeno. Los
 40 sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxí, metilo o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos, o sus derivados, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol).

45 Preferentemente el polímero es un óxido de polialquileno tal como polietilenglicol (PEG). Con respecto a las unión de restos de PEG en general, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York; " Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC; y
 50 "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

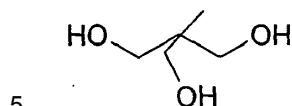
El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular medio entre 150 y 100.000 Da, preferentemente entre 2.000 y 50.000 Da, más preferentemente entre 10.000 y
 55 40.000 Da y todavía más preferentemente entre 20.000 y 40.000 Da.

Se apreciará que cuando z es mayor que 1, cada Z puede ser igual o diferente.

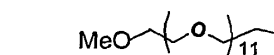
En una realización el resto solubilizante en agua Z es:



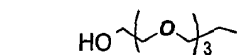
En una realización el resto solubilizante en agua Z es:



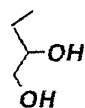
En una realización el resto solubilizante en agua Z es:



En una realización el resto solubilizante en agua Z es:

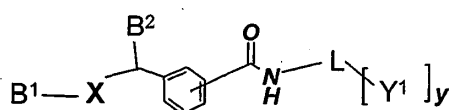


En una realización el resto solubilizante en agua Z es:



20 También se proporcionan por la presente invención compuestos intermedios valiosos adecuados para la unión de un anticuerpo. Dichos compuestos constan esencialmente de los siguientes elementos: un polímero de peine que comprende una o más moléculas efectoras y opcionalmente uno o más grupos solubilizantes y un grupo capaz de unir el residuo A o capaz de convertirse en un grupo tal.

25 En consecuencia la presente invención proporciona compuestos de acuerdo con la fórmula (VI)



(VI)

en la que:

30 Y¹ representa un grupo capaz de unir el residuo A, o capaz de convertirse en tal grupo;

L, X, B¹, B² e y son como se describen en el presente documento anteriormente.

35 Y¹ es un grupo conocido en la técnica adecuado para enlazar L y A o capaz de convertirse en un grupo tal. Por ejemplo Y¹ puede ser un derivado protegido, es decir, está enmascarado por otro grupo, un 'grupo protector' para evitar que Y¹ reaccione con otros grupos del compuesto. Tales derivados protegidos son capaces de convertirse fácilmente en un grupo capaz de unir A. Ejemplos de tales grupos son tioles protegidos donde el grupo protector se puede retirar fácilmente para proporcionar un tiol libre para la reacción con el residuo A. Las condiciones para la retirada del grupo protector son preferentemente tales que la actividad biológica de los componentes del polímero de peine no se ven afectados. Los tioles protegidos adecuados se conocen en la técnica e incluyen tioéteres (por ejemplo, protegidos con tritilo), tioésteres (por ejemplo, protegidos con acetilo o propionilo), tiocarbonatos, tiocarbamatos y sulfenilos.

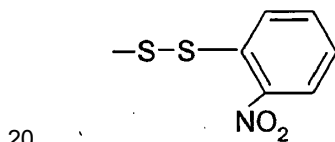
40

El grupo Y¹ puede unirse al residuo A mediante cualquier grupo funcional disponible de cadena lateral de aminoácido o de aminoácido terminal localizado en el anticuerpo o su fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden ser de naturales en, por ejemplo, el fragmento de anticuerpo o pueden estar introducidos artificialmente en el anticuerpo o su fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.219.996 y US 5.677.425). En un aspecto preferido de la invención los dos grupos están covalentemente enlazados mediante un grupo tiol de un resto de cisteína localizado en el anticuerpo o su fragmento, preferentemente en la bisagra. El enlace covalente en general será un enlace disulfuro o un enlace sulfuro-carbono, preferentemente el último. En un ejemplo cuando se usa un grupo tiol como el punto de unión se pueden usar grupos activados apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos de tiol tal como maleimida.

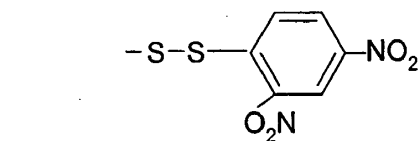
Y¹ puede ser cualquier grupo adecuado incluyendo cualquiera de los enumerados en el documento WO 2004/113394 páginas 9 - 11.

Y¹ puede ser -S-S-R² en el que R² es cualquier alquilo C₁₋₆ de cadena lineal o ramificada o aromático sustituido.

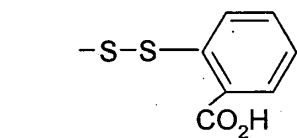
Y¹ puede ser



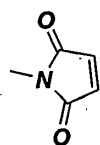
Y¹ puede ser



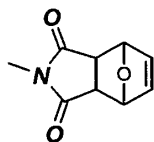
Y¹ puede ser



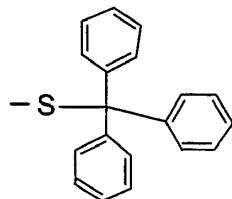
Y¹ puede ser



Y¹ puede ser



Y¹ puede ser



Y¹ puede ser

5

-SH

Y¹ puede ser

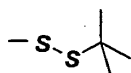
10

-S-SO₃⁻

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que contienen de 1 a 6 átomos de carbono. Tales grupos son metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Preferentemente R² se selecciona entre metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo. Preferentemente R² es *terc*-butilo.

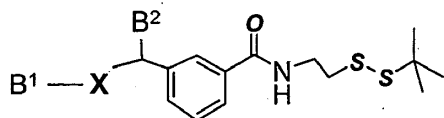
15

En una característica preferida, Y¹ representa



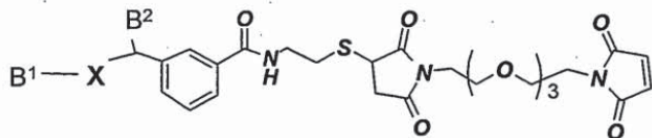
20

En consecuencia, un compuesto ilustrativo de fórmula (VI) anterior se representa por el compuesto de fórmula (VII):



(VII)

25 En una característica preferida, Y¹ representa un derivado de maleimida unido al resto de la molécula mediante el átomo de nitrógeno de la maleimida. De acuerdo con lo anterior, un compuesto ilustrativo de fórmula (VI) anterior está representado por el compuesto de fórmula (VIII):



(VIII)

30

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib) en asociación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

35

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden tomar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación.

40

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente

aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metil celulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse en forma de un producto seco para constituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según sea apropiado.

Las preparaciones para la administración oral se pueden formular de manera adecuada para proporcionar la liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados para chupar de manera convencional.

Los compuestos de fórmula (Ia) o (Ib) se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas de vidrio o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo, viales de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización, conservantes y/o de dispersión. De manera alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos de fórmula (Ia) o (Ib) también se pueden formular en forma de una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de actuación prolongada se puede administrar mediante implante o por inyección intramuscular.

Para administración nasal o administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en la forma de una presentación de pulverizador de aerosol para envases a presión o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas o mezcla de gases adecuados.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración.

Para la administración tópica los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera conveniente en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, vaselina líquida, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. De manera alternativa, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular en una loción adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.

Para la administración oftálmica los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera conveniente como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, con pH ajustado, con o sin un conservante tal como agente bactericida o fungicida, por ejemplo nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio o acetato de clorhexidina. De manera alternativa, para la administración oftálmica se pueden formular compuestos en una pomada tal como vaselina.

Para la administración rectal los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera conveniente en forma de supositorios. Éstos se pueden preparar mezclando el componente activo con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y de esta manera se funde en el recto para liberar el componente activo. Tales materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

La cantidad de un compuesto de la invención requerida para la profilaxis o tratamiento de una afección particular variará dependiendo del compuesto elegido y del estado del paciente que se va a tratar. Sin embargo, en general, las dosificaciones diarias pueden variar desde alrededor de 10 ng/kg hasta 1000 mg/kg, típicamente desde 100 ng/kg hasta 100 mg/kg, por ejemplo, alrededor de 0,01 mg/kg y 40 mg/kg de peso corporal para la administración oral o bucal, entre alrededor de 10 ng/kg y 50 mg/kg de peso corporal para la administración parenteral, y entre alrededor de 0,05 mg y alrededor de 1000 mg, por ejemplo, entre alrededor de 0,5 mg y alrededor de 1000 mg, para la administración nasal o administración por inhalación o insuflación.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante el uso de los métodos análogos a los de los Ejemplos proporcionados en el presente documento.

- 5 Típicamente los compuestos de fórmula (Ia) y (Ib) se pueden preparar mediante un proceso que comprende la unión del residuo A a un compuesto de fórmula (VI) usando procedimientos que son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Donde el compuesto de fórmula (VI) se usa para producir el compuesto de fórmula (Ib) se apreciará que $y=1$.
- 10 El resto polímero de peine X se puede preparar usando cualquier método de polimerización conocido en la técnica. Los métodos adecuados incluyen sistemas de polimerización viva por radicales libres, véanse por ejemplo los documentos WO 96/30421 y WO 97/18247. Preferentemente el método de polimerización usado es la polimerización viva por radicales como se describe en los documentos WO 2004/113394, WO 97/47661 y WO 99/28362. Opcionalmente, la polimerización también puede incluir un agente aceptor que no se puede polimerizar, por ejemplo un disulfuro.
- 15 un disulfuro.

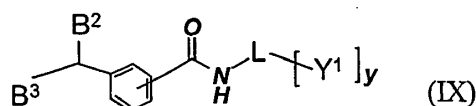
En consecuencia, la presente invención también proporciona un proceso para producir un polímero de peine que comprende las etapas de:

- 20 a) proporcionar:

(i) $(w+z)$ equivalentes molares de un monómero;

(ii) un equivalente molar de un compuesto iniciador de fórmula (IX)

25



en la que B^3 es un halógeno e Y^1 , L, B^2 , y y $(w+z)$ son como se han definido anteriormente;

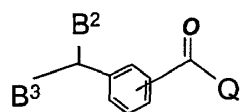
- 30 (iii) un catalizador capaz de catalizar la polimerización de una pluralidad de los monómeros para producir el polímero de peine; y

b) hacer que el catalizador catalice, en combinación con el iniciador, la polimerización de una pluralidad de los monómeros (i) para producir el polímero de peine.

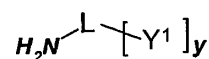
35

El compuesto de fórmula (IX) es un compuesto novedoso y por lo tanto constituye una característica adicional de la presente invención.

- 40 El compuesto de fórmula (IX) se puede preparar mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (X) con un compuesto de fórmula (XI):



(X)



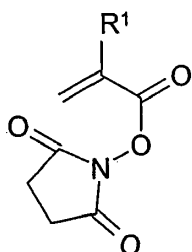
(XI)

45

en las que:

Q es un grupo saliente adecuado. El grupo saliente Q es típicamente un átomo de halógeno, por ejemplo, cloro.

- 50 El monómero para uso en la etapa (i) del proceso puede ser cualquier monómero para uso en la producción de la estructura central del peine al que los restos efectores y solubilizantes se pueden unir posteriormente. Ejemplos de tales monómeros son:



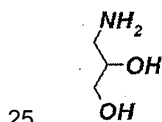
5 La invención también proporciona un proceso para producir un polímero de peine que comprende moléculas efectoras y opcionalmente restos solubilizantes comprendiendo además dicho método la etapa (c) en la que el polímero de peine producido en la etapa (b) se hace reaccionar con w equivalentes de una o más moléculas efectoras y z equivalentes de uno o más restos solubilizantes en los que w y z son como se establece anteriormente. Los polímeros producidos mediante las etapas (b) y (c) del método anterior son compuestos novedosos y constituyen una característica adicional de la presente invención.

10 La invención también proporciona un proceso para producir un polímero de peine unido a al menos un anticuerpo o uno de sus fragmentos, comprendiendo dicho proceso la unión del polímero de peine producido en la etapa (b) o la etapa (c) a al menos un anticuerpo o uno de sus fragmentos. Los conjugados de anticuerpo - polímero de peine producidos por este proceso son compuestos novedosos y constituyen una característica adicional de la presente invención.

15 Preferentemente el resto de molécula efectora para uso en la etapa (c) tiene la fórmula H_2N-T-W donde T y W son como se han definido anteriormente. Cuando está presente, T preferentemente tiene la fórmula (V) como se ha representado anteriormente.

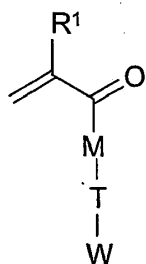
20 Preferentemente el resto solubilizante para uso en la etapa (c) tiene la fórmula H_2N-Z donde Z es como se ha definido anteriormente.

Preferentemente el resto solubilizante para uso en la etapa (c) tiene la fórmula:

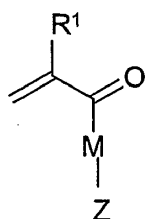


30 De manera alternativa, en el proceso de la presente invención, los monómeros para uso en la etapa (i) pueden comprender ya los restos efectores y/o solubilizantes. Los monómeros adecuados son bien conocidos en la técnica y comprenderán restos Z, T y W como se ha definido anteriormente.

En un ejemplo donde el monómero comprende el resto efector, el monómero tiene la fórmula:



35 En un ejemplo donde el monómero comprende el resto solubilizante, el monómero tiene la fórmula:



en la que R¹, M, T, W y Z son como se han definido en el presente documento anteriormente.

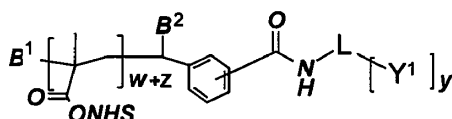
El catalizador para uso en la etapa (a) del proceso es cualquier catalizador adecuado conocido en la técnica. Ejemplos de tales catalizadores se han proporcionado en los documentos WO 96/30421, WO 97/18247, WO 2004/113394, WO 97/47661 y WO 99/28362. Típicamente el catalizador es una sal de metal de transición donde el metal de transición tiene un estado de oxidación capaz de oxidarse por un estado de oxidación formal más una organodiimina. Se apreciará que el catalizador puede ser una mezcla. De manera adecuada el catalizador es una mezcla de Cu(I)Cl y N-(n-propil)-2-piridil metanimina (NMPI). De manera adecuada el catalizador se usa en la relación de compuesto iniciador de fórmula (IX):Cu(I)Cl:NMPI de 1:1:2.

La cantidad de monómero requerida en la etapa (i) del proceso dependerá del número de unidades requeridas en el polímero. Por ejemplo, cuando se requiere un polímero de 15 unidades se puede usar una relación de 15:1 de monómero e iniciador. Las longitudes típicas de los polímeros están en el intervalo de 1-300 unidades. En una realización preferida la longitud de unidades es de 41.

Cuando se obtiene una mezcla de productos a partir de cualquiera de los procesos descritos anteriormente para la preparación de compuestos de acuerdo con la invención, el producto deseado se puede separar de ella en una fase apropiada mediante métodos convencionales tales como precipitación, diálisis, filtración por peso molecular, cromatografía de permeación en gel; intercambio de cationes o aniones; HPLC preparativa; o cromatografía en columna utilizando, por ejemplo, sílice y/o alúmina junto con un sistema disolvente adecuado.

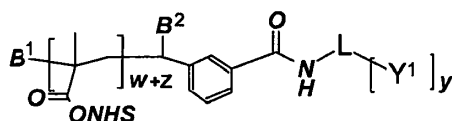
Durante cualquiera de las secuencias sintéticas anteriores puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos sobre cualquiera de las moléculas implicadas. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales, tales como los descritos en *Protective Groups in Organic Chemistry*, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; y T.W. Greene & P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 3^a edición, 1999. Los grupos protectores se pueden retirar en cualquier fase posterior conveniente utilizando métodos conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona compuestos que constan esencialmente de los siguientes elementos: un polímero de peine adecuado para la unión de restos efectoros y opcionalmente solubilizantes y un anticuerpo. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos novedosos que son intermedios valiosos para la unión de moléculas efectoras, restos solubilizantes y anticuerpos o sus fragmentos de los que A es un residuo. Los compuestos alternativos incluyen los de fórmula (XII):



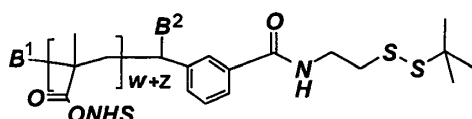
(XII)

De manera adecuada el compuesto de fórmula (XII) tiene la fórmula (XIII)



(XIII)

De manera adecuada el compuesto de fórmula (XIII) tiene la fórmula (XIV)



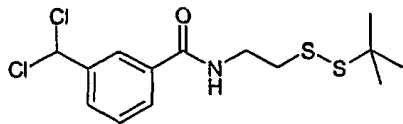
(XIV)

Los compuestos de fórmula XII, XIII y XIV son ejemplos del producto de la etapa (b) del método descrito anteriormente.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención.

Ejemplos

Síntesis del iniciador



5

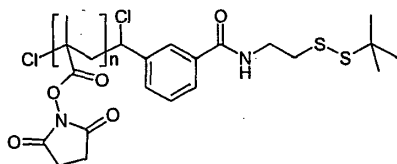
A una solución de clorhidrato de 2-(*t*-butilditio)-etilamina (síntesis descrita en JACS, (1961), 83, 4414-17) (5,101 g, 0,025 mol) y diisopropiletil amina (8,16 g, 0,063 mol) en diclorometano (100 ml) a 0 °C se le añadió durante 10 minutos una solución de cloruro de 3-(diclorometil) benzoilo (5,929 g, 0,027 mol) en diclorometano (20 ml). La solución se agitó a 0 °C durante media hora después se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La reacción se lavó con HCl 0,1 M (100 ml) y agua (100 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se retiró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de sílice eluyendo con acetato de etilo al 20 % hexano al 80 % proporcionando el producto en forma de un sólido incoloro 8,52 g, 96 %.

10

15 δ H (d₆DMSO) 1,31 (9H, s), 2,92 (2H, t, J7,02 Hz), 3,54 (2H, c), 7,55 (1H, s), 7,57 (1H, t, J7,73Hz), 7,78 (1H, dt, J8,37Hz, J1,41Hz), 7,89 (1H, dt, J7,89 Hz, J1,38 Hz), 8,12 (1H, t, J1,73 Hz), 8,79 (1H, t, J5,48 Hz), CLEM (ES+) 373,7 (MNa⁺, 100 %), 351,7 (MH⁺, 65 %).

PROCEDIMIENTO DE POLIMERIZACIÓN

20



Se describe una síntesis típica para el polímero C.

25 Las reacciones se llevaron a cabo en tubos Schlenk cerrados con tapones de goma. Se añadió Cu(I)Cl (0,16 g, 0,00164 mol) al recipiente de reacción y posteriormente se desoxigenó mediante tres ciclos de purga con nitrógeno a vacío consecutivos. A un segundo tubo Schlenk se le añadieron Iniciador (0,58 g, 0,00164 mol), metacrilato de *N*-hidroxi succinimida (NHSMA) (15,0 g, 0,0819 mol), mesitileno (3,0 ml) y sulfóxido de dimetilo (30 ml) y la mezcla se desoxigenó purgando con nitrógeno durante 30 minutos. mesitileno (1 ml) está presente como un marcador estándar para permitir los cálculos de conversión de ¹H RMN. Una vez que la solución se desgasificó completamente se añadió *N*-(*n*-Propil)-2-piridilmetanimina (0,51 ml, 0,00328 mol) por la jeringa estanca a gases secada previamente al tubo Schlenk que contiene el cloruro de cobre. La solución del segundo Schlenk se añadió después al Schlenk que contiene el catalizador mediante una cánula de acero inoxidable purgada con nitrógeno y la mezcla de reacción se colocó inmediatamente en un baño de aceite calentado previamente fijado a 100 °C. Se tomaron muestras usando una jeringa estanca a gases desoxigenada e inmediatamente se desactivaron mediante congelación en nitrógeno líquido. La reacción se terminó mediante enfriamiento rápido y posterior exposición al aire. Se purificaron los polímeros mediante precipitaciones múltiples en acetona usando cantidades copiosas de acetona para retirar por lavado el sulfóxido de dimetilo.

30

35

40 Polímero A

Cu(I)Cl 0,54 g, 0,00546 mol, Iniciador 1,92 g, 0,00546 mol, NHSMA 15,0 g, 0,0819 mol DMSO 30 ml, Mesitileno 3 ml, *N*-(*n*-propil)-2-piridilmetanamina 1,70 ml, 0,0109 mol

45 Polímero B

Cu(I)Cl 0,20 g, 0,00204 mol, Iniciador 0,72 g, 0,00204 mol, NHSMA 15,0 g, 0,0819 mol, DMSO 30 ml, Mesitileno 3 ml, *N*-(*n*-propil)-2-piridilmetanamina 0,64 ml, 0,00409 mol

50 Polímero C

Cu(I)Cl 0,16 g, 0,00164 mol, Iniciador 0,58 g, 0,00164 mol, NHSMA 15,0 g, 0,0819 mol, DMSO 30 ml, Mesitileno 1 ml, *N*-(*n*-propil)-2-piridilmetanamina 0,51 ml, 0,00328 mol

Polímero D

Cu(I)Cl 0,08 g, 0,00082 mol, Iniciador 0,29 g, 0,00082 mol, NHSMA 15,0 g, 0,0819 mol DMSO 30 ml, Mesitileno 1 ml, N-(n-propil)-2-piridilmetanamina 0,26 ml, 0,00164 mol

5 Polímero E

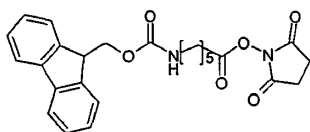
Cu(I)Cl 0,07 g, 0,00073 mol, Iniciador 0,26 g, 0,00073 mol, NHSMA 20,0 g, 0,1092 mol, DMSO 40 ml, Mesitileno 1 ml, N-(n-propil)-2-piridilmetanamina 0,23 ml, 0,00146 mol

10 Polímero F

Cu(I)Cl 0,036 g, 0,00036 mol, Iniciador 0,13 g, 0,00036 mol, NHSMA 20,0 g, 0,1092 mol, DMSO 40 ml, Mesitileno 1 ml, N-(n-propil)-2-piridilmetanamina 0,11 ml, 0,00073 mol

Polímero	Tiempo (mins)	Conversión	DP (1H RMN)	DP (GPC)	PDI (GPC)
A	40	67 %	5	17	1,19
B	50	66 %	13	24	1,31
C	60	78 %	41	100	1,19
D	60	69 %	96	110	1,20
E	60	72 %	164	175	1,34
F	120	64 %	262	195	1,31

15

Intermedio 1a

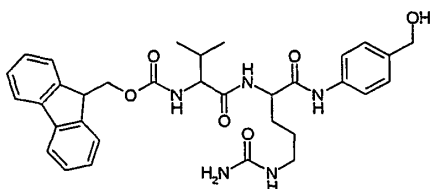
20

Se añadió *N,N*-Diisopropiletilamina (1,8 ml), 10,35 mmol) a una mezcla agitada de ácido *N*-Fmoc-6-aminocaproico (2 g, 5,67 mol) (de Bachem), *N*-hidroxisuccinimida (0,78 g, 6,78 mmol) y dicitohexilcarbodiimida (1,4 g, 6,8 mmol) en DCM (30 ml) y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se concentró mediante evaporación en rotavapor. El producto se cristalizó en éter, se filtró, se lavó varias veces con éter y se secó proporcionando 2,5 g (98 %). $^1\text{H.RMN}$ (CDCl_3), δ 7,75 - 7,70 (d, 2H), 7,64 - 7,50 (d, 2H), 7,4 (dd, 1H), 7,3 (dd, 1H), 4,38 - 5,0 (a, 1H), 4,30 - 4,42 (m, 2H), 4,20 - 4,30 (m, 1H), 3,45 (ddd, 1H), 3,10 - 3,25 (m, 2H), 2,70 - 2,85 (a, 4H), 2,50 - 2,65 (m, 3H), CLEM, (ES+), 449,2 (MH^+), 473 (MNa^+).

25

Intermedio 1b

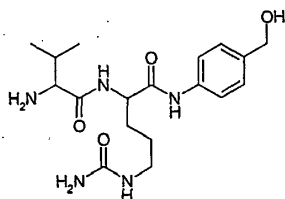
30



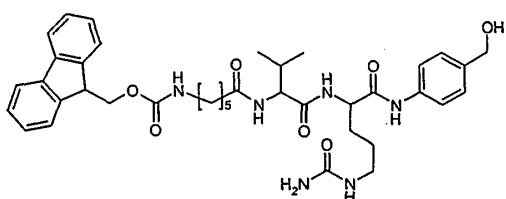
Una mezcla de Fmoc-Val-Cit (5,32 g, 10,70 mmol) (preparado como se describe en Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855 - 869), EEDQ (5,32 g, 21,54 mmol), y alcohol *p*-aminobencílico (2,65 g, 21,50 mmol) en DCM-MeOH, 2:1 (150 ml) se agitó durante toda una noche. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y el producto sólido se trituró, se filtró, se lavó varias veces con acetato de etilo, después DCM y se secó proporcionando 5,05 (78 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO-d_6), δ 9,97 (sa, 1H), 8,10 (d, 1H), 7,90 (d; 2H), 7,75 (t, 2H), 7,55 (d, 2H), 7,42 (t, 3H), 7,33 (t, 2H), 7,24 (d, 2H), 5,96 (a, 1H), 5,40 (sa, 2H), 5,09 (t, 1H), 4,43 (m, 3H), 4,2 - 4,35 (m, 3H), 3,94 (t, 1H), 2,93 - 3,04 (m, 2H), 1,99 (a, 1H), 1,58 - 1,75 (m, 2H), 1,40 - 1,50 (m, 2H), 0,87 (m, 6H), CLEM (ES+), 603 (MH^+), 625 (MNa^+).

35

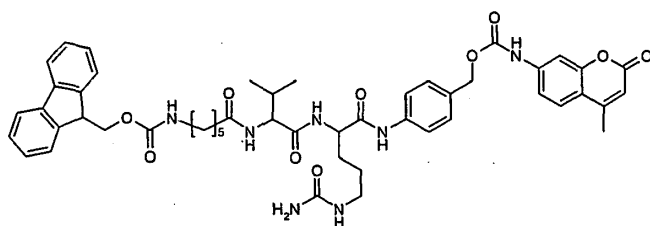
40

Intermedio 1c

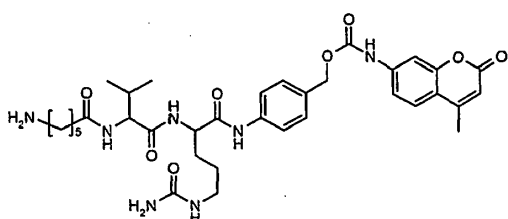
- 5 Se añadió una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 ml) a una solución agitada de Intermedio 1b (1 g, 1,66 mol) en DMF (10 ml) y la mezcla se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró y el resto se repartió entre agua y DCM. La fase acuosa se lavó tres veces con DCM después se concentró y se secó por congelación proporcionando 0,62 g (98 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,03 (s, 1H), 8,14 (a, 1H), 7,24 (d, 2H), 5,97 (t, 1H), 5,40 (a, 2H), 5,10 (a, 1H), 4,43 (a, 3H), 2,30 (a, 1H), 2,92 - 3,12 (m, 3H), 1,95 (m, 2H), 1,50 - 1,78 (m, 4H), 0,89 (d, 3H), 0,79 (d, 3H), CLEM 381 (MH⁺), 403 (MNa⁺).

Intermedio 1d

- 15 Se disolvió intermedio 1c (0,5 g, 1,316 mol) en DMF (5 ml), se agitó a temperatura ambiente y se añadieron Intermedio 1a (0,592 g, 1,316 mmol) y DIPEA de manera secuencial. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y la mezcla se vertió con agitación en hielo-agua y se retiró el producto precipitado se retiró por filtración, se lavó varias veces con agua y se secó proporcionando 0,73 g (78 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 9,90 (s, 1H), 8,05 (d, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,80 (d, 1H), 7,69 (d, 2H), 7,58 (d, 2H), 7,45 (t, 2H), 7,24 (d, 2H), 5,96 (t, 1H), 5,4 (a, 2H), 5,10 (t, 1H), 4,15 - 4,47 (m, 7H), 2,40 - 3,07 (m, 4H), 2,16 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 0,96 - 1,77 (m), 0,81 (m, 7H), CLEM (ES⁺), 715 (MH⁺) 737 (MNa⁺).

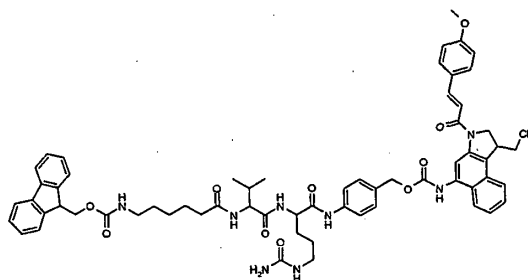
Intermedio 1e

- 25 Se disolvió intermedio 1d (0,5 g, 0,70 mmol) en DMF (5 ml) calentando la suspensión. Después se agitó la solución transparente bajo N₂ y se añadió 7-Isocianato-4-metil-cromen-2-ona (0,22 g, 1,09 mol) (preparada como se describe en Anal. Biochem., 1992, 200, 400 - 404) y la mezcla de reacción se agitó bajo N₂ en la oscuridad durante toda una noche. La mezcla de reacción solidificada se digirió completamente en DCM, se filtró, se lavó varias veces con DCM, después éter, y se secó proporcionando 0,57 g (90 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,27 (s, 1H), 10,22 (s, 1H), 7,22-8,04 (m, 22H), 6,23 (s, 2H), 5,98 (t, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,18 - 4,44 (m, 6H), 2,87 - 3,20 (m), 2,38 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,25 - 2,23 (m), 0,85 (m, 6H), CLEM (ES⁺), 938 (MNa⁺).

Especie efectora (I)

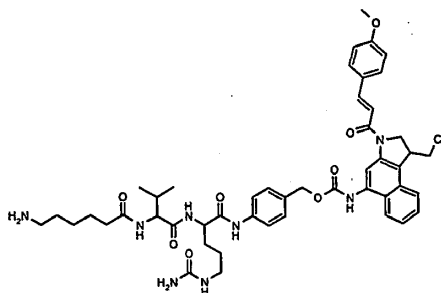
Se suspendió intermedio 1e (0,57 g, 0,62 mol) en DMF (10 ml) y se añadió una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h durante las cuales el material de partida se disolvió gradualmente para formar una solución transparente. La mezcla se evaporó en rotavapor a presión reducida y el producto bruto residual se trituró en EtOAc-MeOH, 9:1, se filtró, se lavó con el mismo disolvente y se secó proporcionando 0,42 g (97 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,00 (s, 2H), 8,07 (d, 2H), 7,80 (d, 2H), 7,34-7,70 (m, 8H), 6,24 (m, 2H), 5,98 (t, 1H), 5,4 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,40 (m, 1H), 3,01 (m), 2,38 (s), 2,4 (s), 2,1-2,2 (m), 1,9-2,04 (m), 1,15-1,78 (m), 0,8-0,9 (m), CLEM (ES+), 694 (MH⁺).

10 Intermedio 2a

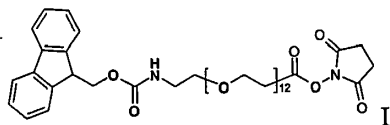


Se trató 1-(Clorometil)-3-[(2E)-3-(4-metoxifenil)-2-propenoil]-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-5-amina (55 mg, 0,14 mmol), (preparada como se describe en el documento WO 03/097635) en acetonitrilo con fosgeno al 20 % en tolueno (1,5 ml) durante 1,5 h. La solución transparente resultante se evaporó hasta sequedad a presión reducida, se coevaporó dos veces con DCM anhidro y se dejó en la línea de vacío durante 1 h. El producto bruto se volvió a disolver en acetonitrilo (4 ml) y se añadió gota a gota a una solución de 1d (100 mg, 0,14 mmol) en DMF (1,5 ml) seguido de DMAP (170 mg, 1,39 mmol) que se había secado previamente a vacío sobre hidróxido de sodio y la mezcla de reacción se agitó durante 2,5 h. La CCF (DCM-MeOH, 9:1) mostró la formación del producto y algo de péptido de material de partida sin reaccionar. La mezcla semisólida se vertió en agua helada y se recogió el sólido de color amarillo por filtración, se lavó varias veces con agua helada y se secó por succión de aire. La CL/EM del bruto mostró que la relación del producto y el péptido sin reaccionar era de 2:1. Se disolvió en DMF y el producto requerido se separó usando CCF preparativa (espesor de gel de sílice de 1 mm) en DCM- MeOH, 9:1 proporcionando el producto de cómo un sólido de color amarillo (60 mg, 38 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 9,97 (sa, 1H), 9,59 (a, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,01 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,73 - 7,81 (m, 2H), 7,62 - 7,73 (m, 3H), 7,54 - 7,62 (m, 3H), 7,4 - 7,46 (t, 1H), 7,25 - 7,34 (m, 3H), 7,06 - 7,24 (m, 3H), 6,88 - 6,96 (d, 2H), 6,15 (a, 1H), 5,48 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,50 (m, 2H), 4,4,08 - 4,25 (m, 4H), 3,75 (s, 3H), 3,10 (a, 1H), 2,9 - 3,03 (m, 3H), 2,18 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,38 (m), 1,38 (m, 2H), 1,12 - 1,32 (m, 6H), 0,72 - 0,85 (m, 6H), CL/EM T_R 3,63 min, m/z 1133 (M)⁺.

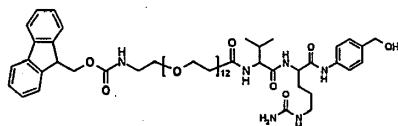
Especie efectora (II)



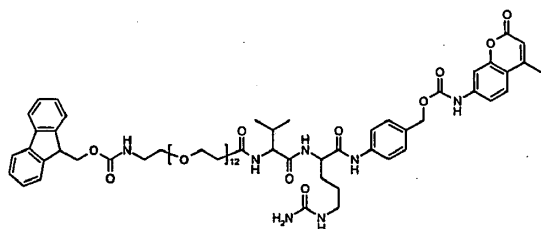
Se añadió piperidina al 20 % en DMF (1,5 ml) a una solución de 2a (60 mg, 52,98 mmol) en DMF (3 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h cuando la CCF (DCM-MeOH, 9:1) mostró el consumo total del material de partida. Se retiraron todos los compuestos volátiles por evaporación en rotavapor y el resto se digirió en DCM-éter, 1:1, se filtró, se lavó varias veces con el mismo disolvente y se secó proporcionando 45 mg (93 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,0 (sa, 1H), 8,68 (a, 1H), 8,10 (m, 1H), 8,02 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,80 (m, 3H), 7,66 (m, 3H), 7,56 (t, 1H), 7,42 (m, 3H), 7,10 (d, 1H), 7,02 (d, 2H), 6,00 (a, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,53 (m, 2H), 4,39 (m, 2H), 4,19 (t, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 2,90 - 3,06 (m, 3H), 2,55 (m, 2H), 2,18 (m, 2H), 2,0 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,50 (m, 3H), 1,38 (m, 2H), 1,23 (m, 2H), 0,8 - 0,88 (m, 6H), CL/EM T_R 2,57 min, m/z 911 (M)⁺.

Intermedio 3a

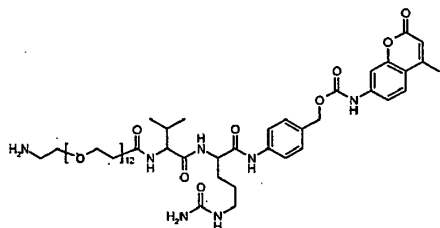
- 5 A una solución de ácido N-Fmoc-amido-dPEGTM₁₂ (1,0 g, 1,19 mol) de Quanta Biodesign en DCM (10 ml) se le añadió N-hidroxisuccinimida (150 mg, 1,3 mol), DCC (270 mg, 1,31 mmol), y DIPEA (517 µl, 2,97mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante toda una noche. La CL/EM mostró solamente un 50 % de reacción y no mejoró tras la adición de más reactivos y agitación prolongada. Por lo tanto, el sólido se retiró por filtración y el filtrado se lavó con solución de bicarbonato, se secó (MgSO₄) y se concentró. La cromatografía en columna DCM-MeOH, 20:1
- 10 proporcionó el producto puro (0,355 g, 32 % y 60 % basado en el material de partida recuperado). Después la columna se eluyó con MeOH para recuperar el material de partida sin recuperar (0.47 g). ¹H.RMN (CDCl₃), δ 7,76 (d, 2H), 7,61 (d, 2H), 7,38 (dd, 2H), 7,31 (dd, 2H), 5,48 (a, 1H), 4,41 (d, 2H), 4,24 (m, 1H), 3,85 (t, 2H), 3,65 (a, PEG), 3,39 (a, 2H), 2,87 (t, 1H), 2,84 (a, 3H), 1,74(a, 4H), CL/EM T_R 3,17 min, m/z 937 (M)⁺, 938 (M+1)⁺.

15 Intermedio 3b

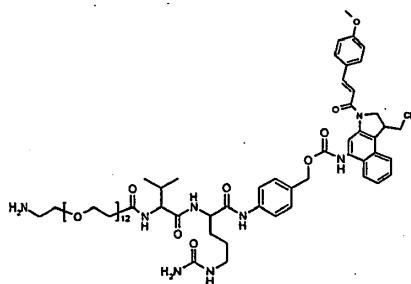
- Se añadió 1c (0,144 g, 0,379 mmol) a una solución de 3a (0,355 g, 0,379 mmol) en DMF (3 ml) seguido de DIPEA
- 20 (165 µl, 0,95 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante toda una noche. La CL/EM reveló que el medio básico había provocado la hidrólisis del grupo protector Fmoc de parte del producto proporcionando una mezcla del producto requerido con algo de amina no protegida. Se añadió agua helada y se retiró por filtración una pequeña cantidad de sólido de color blanco y el filtrado se secó por congelación. Se recogió el semisólido en agua-acetonitrilo, 1:1 (10 ml) y se agitó con bicarbonato de sodio (50 mg, 0,6 mmol) y Fmoc-O-Su (150 mg, 0,45 mmol)
- 25 durante 20 min. La CL/EM mostró la finalización de la reacción proporcionando un producto principal. Se retiró todo el material insoluble mediante filtración y el filtrado se concentró y se cargó en una columna C18 eluyendo primero con agua, después MeOH al 20 %, 40 %, 60 % y 80 %. El producto requerido se eluyó en las fracciones de MeOH al 80 %; éstas se concentraron y se secaron por congelación proporcionando 220 mg, (48 %). ¹H.RMN (MeOD), δ 7,82 (d, 2H), 7,67 (d, 2H), 7,59 (d, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,33 (m, 2H), 4,55 (m, 1H), 4,38 (d, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,78 (m, 2H), 3,6-3,68 (a, PEG), 3,54 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 2,14(m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,8 (m, 1H), 1,62 (m, 2H), 1,00 (m, 6H), CL/EM T_R 2,9 min, m/z 1202 (M)⁺.
- 30

Intermedio 3c

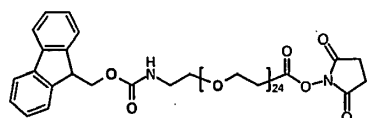
- 35 Una solución de 3b (164 mg, 0,136 mol) en DMF (2 ml) se agitó bajo N₂ y 7-isocianato-4-metil-cromen-2-ona (55 mg, 0,273 mmol) (preparada como se describe en Anal. Biochem., 1992, 200, 400 - 404) se añadió y se agitó a 45 °C durante 3 h. La CL/EM mostró aproximadamente un 60 % de reacción y por lo tanto se añadió más 7-isocianato-4-metil-cromen-2-ona (30 mg, 0,149 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 h adicionales. La CL/EM mostró solamente una traza de 3b sin reaccionar, se retiró el disolvente por evaporación en rotavapor y el residuo se trituró en EtOAc-MeOH, 4:1, se filtró y se lavó varias veces con el mismo disolvente y se secó proporcionando 180 mg (94 %). ¹H.RMN (300 MHz, DMSO-d₆), δ 9,65 (a, 1H), 7,80-7,96 (m, 1H), 7,22-7,78 (m, 9H), 6,23 (s, 1H), 5,39 (s, 1H), 5:13 (s, 1H), 4,16-4,50 (m, 2H), 4,0-4,12 (m, 1H), 3,38-3,88 (m, incluye PEG), 3,08-3,21 (m, 1H), 2,9-3,9 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 1,21-1,84 (m, 3H), 0,85 (t, 3H), CL/EM T_R 3,154 min, m/z 1402 (M)⁺, 1425 (M+Na)⁺.
- 40
- 45

Especie efectora (III)

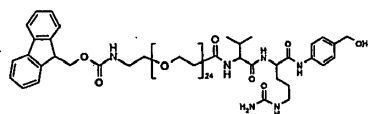
5 Se suspendió 3c (60 mg, 42,8 mmol) en DMF (1 ml) y se añadió piperidina al 20 % en solución de DMF (1 ml) para formar una solución transparente, que se agitó durante 1,5 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, el residuo se trituró en EtOAc y se filtró el sólido, se lavó varias veces con EtOAc y se secó a vacío proporcionando 40 mg (79 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,0 (s, 1H), 8,11(d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,70 (d, 1H), 7,64 (d, 2H), 7,56 (d, 1H), 7,38-7,43 (m, 3H), 6,24 (s, 1H), 5,98 (m, 1H), 5,41 (a, 2H), 5,13 (a, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,39 - 3,55 m, incluye PEG), 3,33 (m, 1H), 2,89-3,1 (m, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 1,98 (m, 1H), 1,74 (m, 1H), 1,61 (m, 1H), 10 1,31 - 1,52 M, 2H), 0,57 - 0,69 (m, 3H), CL/EM T_R 2,40 min., m/z 1181 (M+1)⁺.

Especie efectora (IV)

15 Se trató 1-(Clorometil)-3-[(2E)-3-(4-metoxifenil)-2-propenoil]-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-5-amina (36 mg, 91,72 μmol), (preparada como se describe en el documento WO 03/097635) en acetonitrilo con solución al 20 % de fosgeno en tolueno (600 μl) durante 4 h después se evaporó hasta sequedad, se coevaporó dos veces con acetonitrilo y se dejó en la línea de vacío durante 0,5 h. El producto bruto resultante se disolvió en acetonitrilo (3 ml) y se añadió a otra solución de 3b (112 mg, 93,2 μmol) en acetonitrilo (3 ml) bajo nitrógeno seguido de DMAP (360 mg, 2,95 mmol, 32 eq.). Se añadió DMF (200 μl) obteniendo una solución transparente, que después se agitó en la oscuridad bajo nitrógeno durante 0,5 h. La CL/EM reveló que el producto requerido se había formado pero que había perdido el grupo protector Fmoc proporcionando la amina terminal libre (T_R = 2,925 min) comparado con T_R = 3,377 min para el producto amino protegido. La mezcla de reacción se concentró primero para retirar el exceso de acetonitrilo después se diluyó con agua y se cargó en una columna C18 eluida primero con agua, después MeOH-agua, 1:1, que retiró toda la DMAP después el producto requerido se eluyó usando una relación 2:1. se concentraron estas fracciones y se secaron por congelación proporcionando 75 mg (58 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 9,88 (s, 1H), 8,99 (a, 1H), 8,65 (a, 1H), 8,07 - 8,11 (m, 2H), 7,78 (d, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,53 - 7,68 (m, 2H), 7,37 - 7,46 (m, 2H), 20 7,29 - 7,35 (m, 2H), 7,00 - 7,02 (m, 2H), 6,57 - 6,59 (m, 1H), 6,58 (m, 1H), 6,01 (m, 1H), 5,4 (a, 1H), 4,18 - 4,47 (m, 4H), 4,00 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,28 - 3,63 (m, que incluye PEG), 2,40 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,33 - 1,52 (m, 2H), 0,76 - 0,87 (m, 6H), CL/EM T_R 2,906 min, m/z 1398 (M)⁺.

Intermedio 5a

35 Una mezcla de ácido N-Fmoc-amido-dPEGTM₂₄ (100 mg, 73,1 mol) comprado en Quanta Biodesign, N-hidroxisuccinimida (18 mg, 0,156 mol), DCC (33,1 mg, 0,16 mol) y DIPEA (65 μl) en DCM (2 ml) se agitó durante toda una noche. La CL/EM mostró un nuevo producto (T_R 3,042 min) comparado con el ácido de material de partida (T_R 2,962 min). El sólido se retiró por filtración y el filtrado se concentró y se trituró varias veces con éter y se secó proporcionando 210 mg (93 %). ¹H.RMN (CDCl₃), δ 7,77 (d, 2H), 7,61 (d, 2H), 7,39 (t, 2H), 7,31(t, 2H), 5,48 (a, 1H), 4,42 (m, 2H), 4,23 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,64 (s, PEG), 2,90 (m, 2H), 2,84 (m, 4H), CL/EM T_{RT} 3,042 min, m/z 1466 (M+1)⁺.

Intermedio 5b

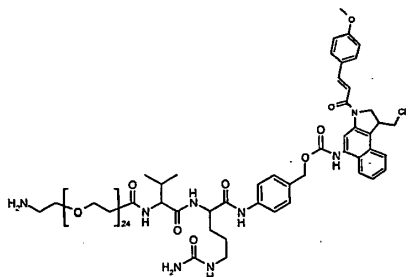
5

Se añadió una solución de 1c (27,2 mg, 71,58 μmol) en DMF (1,5ml) a 5a (105 mg, 71,67 μmol) seguido de DIPEA (50 μl , 287,6 μmol) y se agitó durante toda una noche. La CL/EM mostró la formación del producto (T_R 2,881 min) y algo de material de partida sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentró y el producto se aisló mediante cromatografía de fase inversa como se describe para el 3b proporcionando 68 mg (55 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 9,89 (s, 1H), 8,08 (a, 1H), 7,84 - 7,90 (m, 4H), 7,68 (d, 1H), 7,55 (d, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,33 (m, 2H), 6,97 (m, 1H), 5,40 (a, 2H), 4,21 - 5,40 (m, 6H), 3,22 - 3,71 (m, incluye PEG), 3,15 (m, 1H), 2,9 - 3,08 (m, 2H), 2,4 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 0,76 - 0,9 (m, 6H), CL/EM T_R 2,879 min, m/z 1731(M+1) $^+$.

10

Especie efectora (V)

15

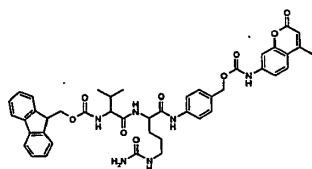


Se trató 1-(Clorometil)-3-[(2E)-3-(4-metoxifenil)-2-propenoil]-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-5-amina (20 mg, 50,96 μmol), (preparada como se describe en el documento WO 03/097635) en acetonitrilo (1,5 ml) con solución al 20 % de fosgeno en tolueno (100 μl) durante 4 h, después se concentró por evaporación en rotavapor y se dejó en la línea de vacío durante 0,5 h. El producto bruto se volvió a disolver en acetonitrilo (1 ml) y se añadió bajo nitrógeno a otra solución del 5b (60 mg, 34,7 μmol) en acetonitrilo (1,5 l) seguido de DMAP (212 mg, 1,738 mmol). La mezcla de reacción se agitó en la oscuridad y se controló por CL/EM que mostró que a la formación del producto le siguió la pérdida de grupo protector Fmoc proporcionando una mezcla de la amina protegida por Fmoc y no protegida. Por lo tanto la mezcla de reacción se concentró y se trató con piperidina al 20 % en DMF durante 3 h. después se concentró de nuevo y el producto bruto se sometió a cromatografía de columna de fase inversa eluyendo con agua-MeOH proporcionando el producto (12 mg, 18 %). $^1\text{H.RMN}$ (CDCl $_3$), δ 9,25 (s, 1H), 8,14 (a, 1H), 7,15-8,05 (m, 15H), 6,04 (a, 1H), 5,17 (m, 1H), 3,94-4,75 (m, 6H), 3,86 (s, 3H), 3,45-3,72 (m, incluye PEG), 3,25 (m, 1H), 2,6 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,96 (m, 1H), 1,72 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 0,76-0,9 (m, 6H), CL/EM T_R 2,908 min, m/z 1927(M) $^+$.

20

25

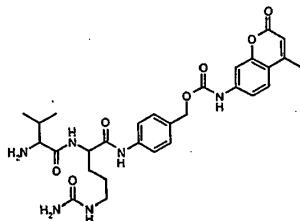
30

Intermedio 6a

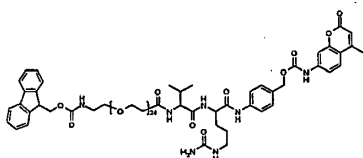
35

A una solución de 1b (250 mg, 0,415 mmol) en DMF (2,5 ml) se le añadió 7-isocianato-4-metil-cromen-2-ona (167 mg, 0,83 mmol) (preparada como se describe en Anal. Biochem., 1992, 200, 400 - 404) y la mezcla de reacción se agitó a 50 $^{\circ}\text{C}$ hasta que la CL/EM indicó la finalización de la reacción (2 h). Se retiró el disolvente a vacío y el producto bruto se sometió a cromatografía en columna usando DCM-MeOH, 9:1 proporcionando el producto (109 mg, 33 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 10,26 (s, 1H), 10,10 (s, 1H), 8,11 (m, 1H), 7,89 (m, 2H), 7,56-7,76 (m, 5H), 7,29-7,46 (m, 8H), 6,24 (s, 1H), 6,00 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,23-4,41 (m, 3H), 3,93 (m, 1H), 2,85-3,18 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,00 (run, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,32-1,52 (m, 2H), 0,80-0,9 (m, 6H), CL/EM T_R 3,329 min, m/z 803 (M) $^+$, 804 (M+1) $^+$.

40

Intermedio 6b

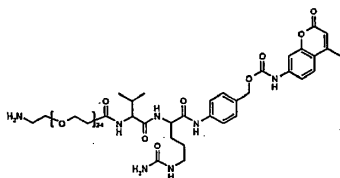
- 5 Se suspendió 6a (105 mg, 0.131 mmol) en DMF (2 ml) y se le añadió una solución al 20 % de piperidina en DMF (1 ml) y se agitó durante 1 h. La solución transparente se evaporó en rotavapor hasta sequedad y el producto bruto residual se trituró en DCM, se filtró, se lavó repetidamente con DCM y se secó proporcionando 69 mg (91 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 10,26 (s, 1H), 10,15 (s, 1H), 7,62 - 7,71 (m, 3H), 7,39 - 7,42 (m, 2H), 6,24 (a, 1H), 5,40 (a, 1H), 5,14 (a, 1H), 2,89 - 3,18 (m, 3H), 2,41 (s, 3H), 1,98 (m, 1H), 1,66, (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 0,90 (d, 3H), 0,79 (d, 3H), CL/EM T_R 2,339 min, m/z 581 (M) $^+$, 582 (M+1) $^+$.

Intermedio 6c

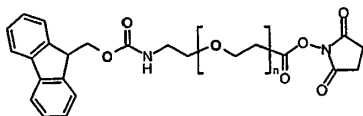
- 15 Una mezcla de 5a (100 mg, 68,26 μmol), 6b (39,7mg, 68,3 μmol) y DIPEA (30 μl , 172,6 μmol) en DMF (1,5 ml) se agitó durante toda una noche cuando la CL/EM mostró la finalización de la reacción. Se retiraron todos los compuestos volátiles por evaporación en rotavapor y el residuo se trituró varias veces con éter-DCM, 9:1, se filtró, se lavó con el mismo disolvente y se secó proporcionando (80 mg, 54 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 10,25 (s, 1H), 10,01 (s, 1H), 8,11 (m, 1H), 7,89 (m, 2H), 7,63-7,72 (m, 4H), 7,31-7,42 (m, 5H), 6,24 (s, 1H), 6,00 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 4,13-4,40 (m, 3H), 3,50-3,72 (m, incluye PEG), 3,13-3,33 (m, 2H), 2,89-3,13 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,00 (m, 1H), 1,19-1,80 (m, 5H), 0,80 (m, 6H), CL/EM T_R 3,052 min, m/z 581 (M) $^+$, 582 (M+1) $^+$.

Especie efectora (VI)

25



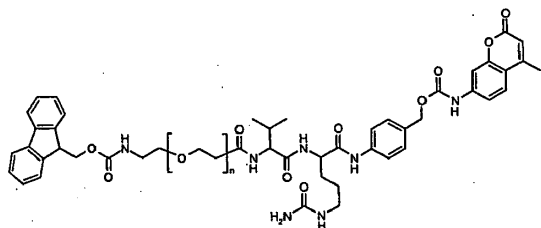
- 30 Se trató 6c (74 mg, 34,24 μmol) en DMF (2ml) con solución de piperidina al 20 % en DMF (2ml) durante 2 h. La solución se evaporó hasta sequedad y se trituró repetidamente en éter-DCM, 4:1, se filtró, se lavó con el mismo disolvente y se secó proporcionando 38 mg (57 %). $^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 10,25 (s, 1H), 10,02 (s, 1H), 8,11 (m, 1H), 7,88 (m, 1H), 7,55 - 7,71 (m, 6H), 7,35 - 7,49 (m, 5H), 6,24 (s, 1H), 6,00 (m, 1H), 5,42 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,10 - 4,18 (m, incluye PEG), 3,00 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 1,98 (m, 1H), 1,71 (m, 1H), 1,61 (m, 1H), 1,30-1,52 (m, 2H), 0,86 (m, 6H), CL/EM T_R 2,479 min.

Intermedio 7a

- 40 Se agitó Boc-PEG-NHS PM 3400 Da (100 mg, 29,4 μmol) comprado en Nektar en TFA al 50 % en DCM que contenía triisopropilsilano al 2 % durante 40 min, después la solución se evaporó hasta sequedad, se coevaporó tres veces con DCM y se dejó en la línea de vacío durante 2 h. La RMN del producto bruto (CDCl $_3$) mostró claramente la retirada del grupo Boc. Se disolvió en acetonitrilo-agua, 1:1 (2 ml) y se trató con Fmoc-OSu (12 mg, 35,61 μmol) y DIPEA (50 μl , 0,29 mmol) durante 1 h. La CL/EM (siguiendo el modo de ionización) mostró la conversión completa a un nuevo producto a T_R 2,186 min, comparado con el material de partida T_R 2,186 min (modo de ionización). La

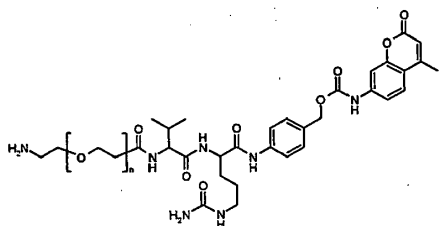
mezcla de reacción se concentró para eliminar los compuestos orgánicos después se diluyó con agua y se secó por congelación. El sólido se trituró varias veces con éter, se filtró y se lavó repetidamente con éter proporcionando 104 mg. Esto se disolvió inmediatamente en DCM (2,5ml) y *N*-hidroxisuccinimida (4 mg, 34,78 μ mol), DCC (7 mg, 34 μ mol) y DIPEA (15 μ l, 86,3 μ mol) se añadieron secuencialmente y la mezcla de reacción se agitó durante 3,5 h. Se filtró a través de un pequeño tapón de Celite, se evaporó en rotavapor hasta sequedad y el sólido se cristalizó en éter, se filtró, se lavó repetidamente con éter y se secó a vacío proporcionando 105 mg (92 % global). La RMN (CDCl₃) del material cristalino era difícil de interpretar exactamente.

Intermedio 7b



Una mezcla de 7a (100 mg, 28,393 μ mol), 6b (16,5 mg, 28,4 μ mol) y DIPEA (15 μ l, 86,28 μ mol) en DMF (1 ml) se agitó hasta que la CL/EM indicó el consumo de II (48 h). Después se evaporó hasta sequedad y se digirió en éter-DCM, 4:1, se filtró y se lavó con el mismo disolvente después éter y se secó proporcionando 96 mg (85 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,25 (s, 1H), 10,22 (s, 1H), 9,44 (s, 1H), 8,65 (m, 1H), 8,12 (m, 1H), 7,62 - 7,72 (m, 5H), 7,39 - 7,49 (m, 3H), 7,18 (m, 1H), 6,25 (s, 1H), 6,00 (m, 1H), 5,14 (s, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,22 - 3,64 (m, incluye PEG), 2,42 (m, 3H), 2,08 (m, 1H), 1,73 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,36 - 1,57 (m, 2H), 1,24 (m, 3H), 0,93 (m, 3H), T_R para el máximo de ionización 2,648 min.

Especie efectora (VII)



Se trató 7b (86 mg, 21,56 μ mol) en DMF (2ml) con piperidina al 20 % en solución de DMF (1 ml) durante 2 h. La solución resultante se evaporó en rotavapor hasta sequedad y el sólido residual se digirió en éter-DCM, 4:1, se filtró, se lavó con el mismo disolvente y se secó (32 mg, 39 %). ¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,25 (s, 1H), 10,66 (s, 1H), 9,5 (a, 1H), 8,22 (a, 1H), 7,62 - 7,74 (m, 4H), 7,34 - 7,44 (m, 2H), 7,18 (m, 1H), 6,22 (s, 1H), 6,00 (m, 1H), 5,4 (s, 1H), 5,12 (a, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,42 - 3,64 (m, incluye PEG), 3,12 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 2,42 (m, 3H), 1,90 (m, 1H), 1,1,54 - 1,79 (m, 3H), 1,33 - 1,53 (m, 2H), 0,74 - 0,93 (m, 6H). T_R para el pico de ionización 2,579 min.

Especies solubilizantes

(i) 3-amino-1,2-propanodiol

(ii) alcohol amino-dPEGTM₄ comprado en Quanta Biodesign

(iii) m-dPEGTM₁₂ amina comprada en Quanta Biodesign

(iv) m-dPEGTM₄ amina comprada en Quanta Biodesign

(v) m-dPEGTM₂₄ amina comprada en Quanta Biodesign

(vi) Etanaminio, 2-[[[2-aminoetoxi]hidroxifosfinil]oxi]-N,N,N-trimetil-, sal interna preparada como se describe en la bibliografía

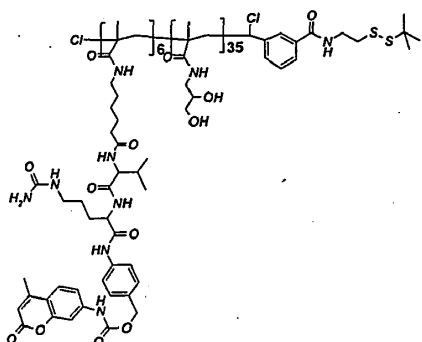
Un procedimiento general para la carga de polímero

El polímero deseado (uno de A-F) (usualmente 10 - 25 mg) se disuelve en DMF anhidra (2 - 2,5 ml) mediante calentamiento y la solución transparente se enfría después hasta temperatura ambiente. Se añaden los equivalentes

molares deseados de la especie efectora (una de (I)-(VII)) que se quiere cargar seguidos de dos veces este número de equivalentes de DIPEA y la mezcla se agita a 45 °C. El progreso de la reacción se sigue mediante CL/EM controlando el consumo de la especie efectora en la mezcla de reacción. Tras la finalización de la reacción (usualmente 24 - 48 h) se añade un exceso de la especie solubilizante (una de (i)-(vi)) y la reacción se agita durante 16 - 24 h adicionales, de nuevo a 45 °C. Después se retiran todos los compuestos volátiles por evaporación en rotavapor a presión reducida y el resto se disuelve en agua y se filtra a través de o bien Celite o un filtro de 0,2 µmetros. Después el filtrado se transfiere a un tubo de filtración de centrífuga con una membrana de 5000 o 10000 NMCO (depende del peso molecular del polímero cargado) y la filtración centrífuga se lleva a cabo a 4000 rpm. El tubo se rellena con agua limpia y el proceso se repite 4 veces. Todo el material incapaz de pasar a través del filtro se recoge y se seca por congelación proporcionando el polímero cargado deseado.

Ejemplo 1 de polímero cargado

Basado en el polímero C (DP=41)



¹H.RMN (DMSO-d₆), δ 10,00 (s), 7,10-8,15 (m), 6,23 (m), 5,36-5,4 (m), 5,05 - 5,12 (m), 4,25 - 4,45 (m), 4,08 - 4,24 (m), 2,78-3,71 (m), 2,64 - 2,76 (m), 0,5 - 2,4 (m).

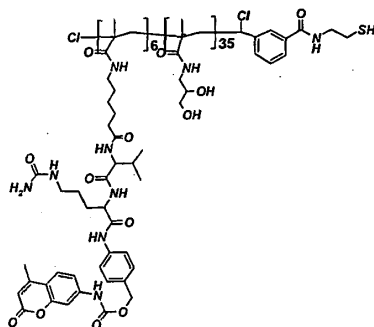
Se apreciará que los restos efectores y solubilizantes están unidos al azar a la estructura central del polímero de peine.

Un procedimiento general para la reducción de disulfuro de los polímeros cargados

El polímero cargado (usualmente 5 - 20 mg) se disuelve en tampón fosfato pH 7,8 - 8,0 (0,5 - 1 ml) y se agita bajo nitrógeno. Después se añade una solución del agente reductor, tri-hidroxipropilfosfina (usualmente 5 equivalentes molares) en el mismo tampón y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se diluye con agua carbonatada (~ pH 5) y se filtra a través de Celite o un filtro de 0,2 µmetros. La solución se somete después a filtración centrífuga como se describe anteriormente usando agua carbonatada, y se seca por congelación proporcionando el polímero cargado terminado en tiol con 80 - 95 % de rendimiento.

Ejemplo 1 de polímero reducido

Basado en el Polímero C (DP=41)



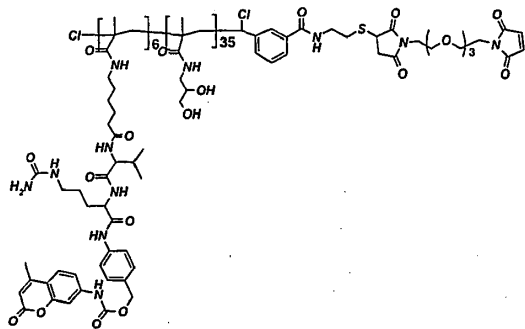
Se apreciará que los restos efectores y solubilizantes están unidos al azar a la estructura central del polímero de peine.

Un procedimiento general para la derivatización de la maleimida de los polímeros cargados

A una solución de polímero reducido (aprox 5 mg) en etanol agua, 1:1 (200 μ l) se añade una solución de 10 equivalentes molares de una bis maleimida tal como 1,11- bis-maleimidotetraetilenglicol también en etanol-agua, 1:1 (200 μ l). Después de agitar durante 1,5 h la reacción se diluye con agua y se somete a filtración centrífuga como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1 de polímero de maleimida

Basado en Polímero C (D=41).



$^1\text{H.RMN}$ (DMSO- d_6), δ 10,25 (s, 1H), 10,02 (s, 1H), 7,02 - 8,10 (m), 5,98 - 6,24 (m), 5,42 - 5,68 (m), 5,13 (bs), 4,30 - 5,05 (m), 2,60 - 3,94 (m), 2,36 (sa), 0,29 - 2,24 (m).

Se apreciará que los restos efectores y solubilizantes están unidos al azar a la estructura central del polímero de peine.

Polímeros cargados preparados

Polímero	Especie efectora / número	Especie de disolución	Producción de polímero cargado	¿Polímero reducido?	¿Polímero derivatizado con maleimida?
C	(I) / 6	(i)	110 mg (83 %)	√	√
E	(I) / 25	(i)	24 mg (71 %)	√	√
E	(I) / 50	(i)	15 mg (66 %)	√	
C	(I) / 12	(i)	11,5 mg, (52 %)	√	√
C	(II) / (6)	(i)	18 mg (88 %)	√	√
C	(II) / (12)	(i)	25 mg (70 %)		
C	(I) / 6	(vi)	30 mg (54 %)		
B	(III) / (2)	(i)	22 mg (53 %)		
C	(I) / 6	(iv)	12,1 mg (55 %)		
C	(III) / (6)	(ii)	8,4 mg (70 %)		
C	(III) / (6)	(iii)	18,1 mg (89 %)	√	
B	(III) / (6)	(iii)	13 mg (97 %)	√	
B	(VII) / (13)	-	16,9mg (94 %)	√	
C	(VI) / (6)	(v)	12,1 mg (79 %)	√	
C	(V) / (6)	(V)	15 mg (88 %)	√	
C	(IV) / (6)	(iii)	13,8 mg (66 %)	√	

Conjugado 1 de polímero

MÉTODO 1

- 5 El Ejemplo 1 de Polímero de Maleimida en DMF se incubó con Fab' reducido (preparado por reducción con 2-mercaptoetilamina 5 mM durante 30 min a 37 °C y la retirada del exceso de reductor por columna PD-10) en fosfato de sodio 0,1 M, EDTA 2 mM, tampón pH 6,0. Se usaron relaciones molares de Ejemplo 1 de Polímero de Maleimida:Fab' de 2, 5, 10, 15, 20 y 25:1. Las concentraciones finales de Fab' fueron de 2 mg/ml y la DMF estaba presente a 20 % final. La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 hr y durante toda una noche a 4 °C y
- 10 después se determinó el alcance de la reacción mediante análisis de SDS PAGE en condiciones tanto no reductoras como reductoras y por GPC HPLC en fosfato 0,2 M, pH 7,0 / EtOH al 10 %.

MÉTODO 2

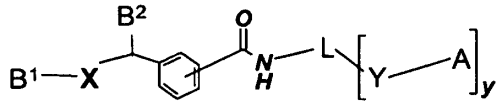
- 15 Se incubó Fab' reducido (preparado como antes) con un exceso de 5 veces de 1,11- bismaleimidotetraetileneglicol a TA durante 1 hr y durante toda una noche a 4 °C. Se eliminó el exceso de 1,11-bismaleimidotetraetileneglicol por columna de PD-10 y el conjugado de Fab'-(1,11-bismaleimidotetraetileneglicol) resultante se incubó con Ejemplo 1 de Polímero Reducido en fosfato de sodio 0,1 M, EDTA 2 mM, tampón pH 6,0 a relaciones molares de conjugado de Intermedio 6:Fab' 2, 5, 10, 15, 20 y 25:1. la concentración final de conjugado Fab' era 2 mg/ml y DMF estaba presente a 20 % final.
- 20

PURIFICACIÓN DEL CONJUGADO 1 DEL POLÍMERO

- 25 Las mezclas de reacción combinadas de cualquiera de los dos métodos anteriores se aplicaron en una columna de SP-Sefarosa HP en acetato de sodio 50 mM, tampón pH 4,50. Se eluyeron los productos usando un gradiente de sal de 0 - 250 mM a lo largo de 20 volúmenes de columna. Se aisló el producto como evidencia el análisis de las fracciones por SDS PAGE y por MALDI-TOF que mostró que se había preparado y aislado una especie con el ion molecular correcto.

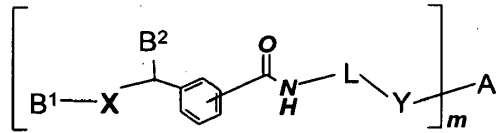
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine que tiene la fórmula (Ia) o (Ib):



(Ia)

5



(Ib)

en las que:

10

y es 1, 2 o 3;

m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

15

B¹ representa un halógeno;

B² representa H o un halógeno;

A representa el residuo de un anticuerpo o uno de sus fragmentos;

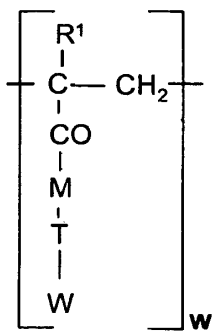
20

L representa un grupo enlazador;

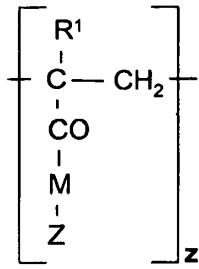
Y representa un grupo espaciador; y

25

X representa un resto de polímero de peine que comprende w equivalentes de una o más moléculas efectoras y z equivalentes de uno o más restos solubilizantes en agua, en la que X comprende los componentes de fórmula (III) y (IV) en cualquier orden:



(III)



(IV)

en las que:

5 w es al menos 1;

z es 0 o mayor;

T no está o es un grupo enlazador;

10

W es una molécula efectora;

Z es un resto solubilizante en agua;

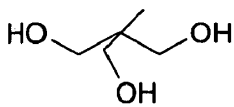
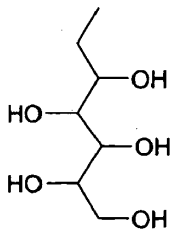
15

M es NH u O; y

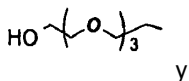
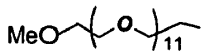
R¹ es metilo o H.

20

2. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el resto solubilizante en agua Z se selecciona entre:

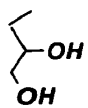


25

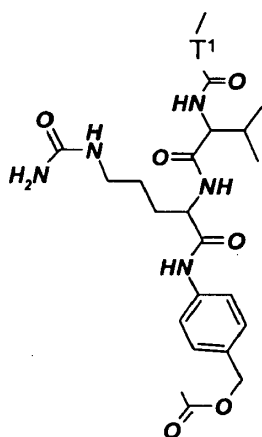


y

30



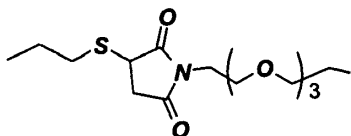
3. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que T es:



(V)

en la que T^1 representa $[\text{CH}_2]_t$ o $\text{CH}_2\text{CH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ donde t está entre 1 y 10 y n está entre 5 y 100.

- 5 4. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que m es 1 o 2.
5. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que y es 1.
- 10 6. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que L se selecciona entre:
- 15 $-(\text{CH}_2)_n-$ en la que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6; y



7. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con la reivindicación 6, en el que n es 2.
- 20 8. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que M es NH .
9. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que w está entre 1 y 20.
- 25 10. Un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que z está entre 1 y 20.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo - polímero de peine de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en asociación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.