

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 136**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06825196 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1940470**

54 Título: **Conjugados de anticuerpo-fármaco y su uso**

30 Prioridad:

26.09.2005 US 720499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.07.2013

73 Titular/es:

**MEDAREX, INC. (100.0%)
707 State Road
Princeton, NJ 08540 , US**

72 Inventor/es:

**BOYD, SHARON, ELAINE;
CHEN, LIANG;
GANWAR, SANJEEV;
GUERLAVAIS, VINCENT;
HORGAN, KILIAN;
SUFI, BILAL;
CARDARELLI, JOSEPHINE, M.;
PAN, CHIN;
HUANG, HAICHUN y
KING, DAVID, JOHN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 416 136 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de anticuerpo-fármaco y su uso

Campo de la invención

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco que se escinden *in vivo*. Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden formar profármacos y conjugados de citotoxinas.

Antecedentes de la invención

Muchos agentes terapéuticos, en particular los que son especialmente eficaces en la quimioterapia del cáncer, con frecuencia, muestran toxicidad aguda *in vivo*, especialmente toxicidad en la médula ósea y las mucosas, así como toxicidad cardíaca y neurológica crónicas. Dicha alta toxicidad puede limitar sus aplicaciones. El desarrollo de más agentes terapéuticos específicos y más seguros, en particular de agentes antitumorales, es deseable para obtener una mayor eficacia contra las células tumorales y una disminución en el número y la gravedad de los efectos secundarios de estos productos (toxicidad, destrucción de células no tumorales, etc.). Otra dificultad con algunos agentes terapéuticos existentes es su menos que óptima estabilidad en plasma. La adición de grupos funcionales para estabilizar estos compuestos ha producido una disminución significativa de la actividad. Por consiguiente, es deseable identificar modos de estabilizar compuestos, manteniendo a la vez niveles de actividad terapéutica aceptables.

La búsqueda de agentes citotóxicos más selectivos ha sido muy activa durante muchas décadas, siendo la toxicidad limitante de la dosis (es decir, la actividad no deseada de las citotoxinas sobre los tejidos normales) una de las principales causas de los fracasos en la terapia del cáncer. Por ejemplo, CC-1065 y las duocarmicinas son conocidas por ser citotoxinas extremadamente potentes.

CC-1065 fue aislada por primera vez de *Streptomyces zelensis* en 1981 por la empresa Upjohn Company (Hanka *et al.*, *J. Antibiot.* 31: 1211 (1978); Martin *et al.*, *J. Antibiot.* 33: 902 (1980); Martin *et al.*, *J. Antibiot.* 34: 1119 (1981)), y se encontró que tiene una potente actividad antitumoral y antimicrobiana tanto *in vitro* como en animales experimentales (Li *et al.*, *Cancer Res.* 42: 999 (1982)). CC-1065 se une a ADN-B de doble cadena en el surco menor (Swenson *et al.*, *Cancer Res.* 42: 2821 (1982)) con la secuencia de preferencia de 5'-d(A/GNTTA)-3' y 5'-d(AAAAA)-3' y alquilatos de la posición N3 de la 3'-adenina mediante su unidad del lado izquierdo CPI presente en la molécula (Hurley *et al.*, *Science* 226: 843 (1984)). A pesar de su potente y amplia actividad antitumoral, CC-1065 no se puede usar en seres humanos, porque provoca la muerte retardada en animales de experimentación.

En la técnica, se conocen muchos análogos y derivados de CC-1065, así como las duocarmicinas. Se ha revisado la investigación sobre la estructura, la síntesis y las propiedades de muchos de los compuestos. Véase, por ejemplo, Boger *et al.*, *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 1438, (1996); y Borger *et al.*, *Chem. Rev.*, 97, 787, (1997).

Un grupo de la Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ha preparado una serie de derivados de CC-1065. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.101.038; 5.641.780; 5.187.186; 5.070.092; 5.703.080; 5.070.092; 5.641.780; 5.101.038; y 5.084.468; y la solicitud PCT publicada WO 96/10405 y la solicitud de europea publicada 0 537 575 A1.

La Upjohn Company (Farmacia Upjohn) también ha sido activa en la preparación de derivados de CC-1065. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.739.350; 4.978.757; 5.332.837 y 4.912.227.

La investigación también se ha centrado en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que están en forma de profármacos, compuestos que son capaces de convertirse en fármacos (compuestos terapéuticos activos) *in vivo* mediante ciertas modificaciones químicas o enzimáticas de su estructura. Con el fin de reducir la toxicidad, esta conversión está preferentemente confinada al sitio de acción o tejido diana, más que al sistema circulatorio o al tejido no diana. Sin embargo, incluso los profármacos presentan problemas, ya que muchos se caracterizan por una baja estabilidad en sangre y suero debido a la presencia de enzimas que degradan o activan los profármacos antes de que estos alcancen los sitios deseados dentro del cuerpo del paciente.

Bristol-Myers Squibb ha descrito determinados conjugados de fármacos antitumorales escindibles por enzimas lisosómicas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.214.345. Esta patente proporciona un oxicarbonilo de aminobencilo.

Seattle Genetics ha publicado las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 2003/0096743 y 2003/0130189, que describen p-aminobenciléteres en agentes de administración de fármacos. Los engarces descritos en estas solicitudes se limitan a composiciones de aminobenciléter.

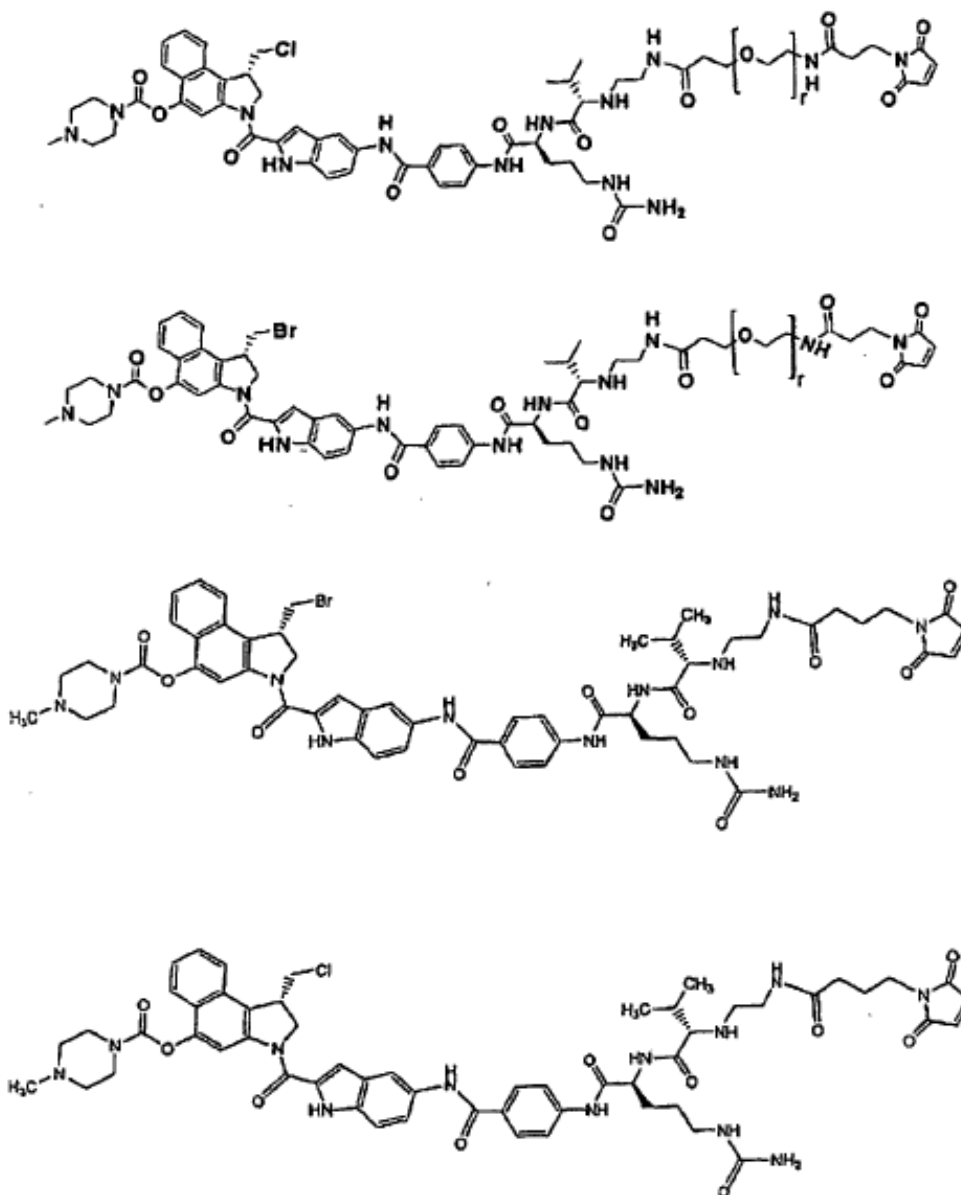
Asimismo, otros grupos han descrito engarces. Véase, por ejemplo, de Groot *et al.*, *J. Med. Chem.*, 42, 5277, (1999); de Groot *et al.*, *J. Org. Chem.*, 43, 3093, (2000); de Groot *et al.*, *J. Med. Chem.*, 66, 8815, (2001); documento WO 02/083180; Carl *et al.*, *J. Med. Chem. Lett.*, 24, 479, (1981); Dubowchik *et al.*, *Bioorg & Med. Chem. Lett.*, 8, 3347, (1998). Estos engarces incluyen espaciadores de aminobenciléter, sistemas espaciadores de ciclación y cascada

electrónica alargada, espaciadores de eliminaciones de ciclaciones tales como aminocarbonilos de ω -amino, y un engarce de p -aminobenci-oxicarbonilo.

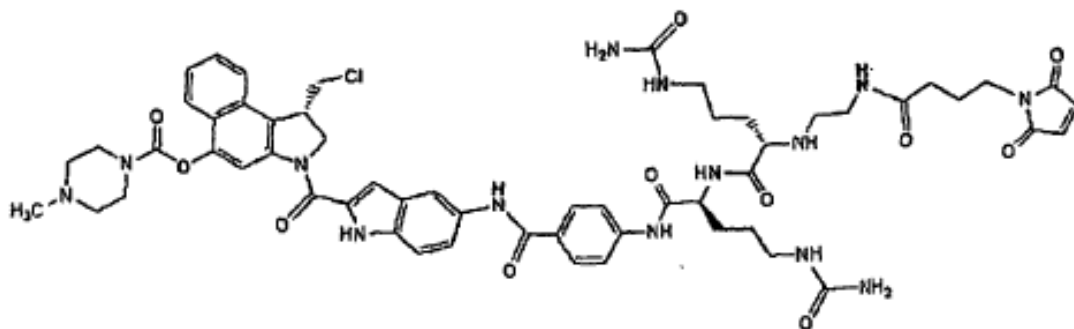
La estabilidad de los fármacos de citotoxinas, incluyendo la estabilidad *in vivo*, todavía es una cuestión importante a la que es necesario enfrentarse. Además, la toxicidad de muchos compuestos les hace ser menos útiles, por lo que se necesitan composiciones que reduzcan la toxicidad del fármaco, tal como la formación de un profármaco escindible. Por lo tanto, a pesar de los avances logrados en la técnica, sigue siendo necesario desarrollar agentes terapéuticos mejorados para el tratamiento de mamíferos, y en particular de seres humanos, más específicamente, citotoxinas que muestren una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida y una estabilidad mejorada en sangre con relación a los compuestos conocidos de estructura similar. La presente invención se enfrenta a estas necesidades.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto seleccionado de entre:



y



en las que r es un número entero que varía 0 a 24.

5 La presente invención se refiere a compuestos que se pueden usar en conjugados de anticuerpo-fármaco en los que el fármaco y el anticuerpo están ligados a través de un engarce de peptídico. Estos conjugados son potentes citotoxinas que se pueden administrar selectivamente a un sitio de acción de interés en forma activa y luego escindirse para liberar el fármaco activo. Los brazos del engarce de la invención se pueden escindir de los fármacos citotóxicos, por ejemplo, por medios enzimáticos o reductores *in vivo*, liberando un resto de fármaco activo del derivado de profármaco.

10 Una realización es un conjugado de anticuerpo-fármaco que incluye un anticuerpo que tiene especificidad al menos por un tipo de tumor; un fármaco; y un engarce que acopla el fármaco al anticuerpo. El engarce es escindible en presencia del tumor. El conjugado de anticuerpo-fármaco retarda o detiene el crecimiento del tumor cuando se administra en una cantidad correspondiente a una dosis diaria de $1 \mu\text{mol/kg}$ o inferior. Preferentemente, el conjugado de anticuerpo-fármaco retarda el crecimiento del tumor cuando se administra en una cantidad correspondiente a una dosis diaria de $1 \mu\text{mol/kg}$ o inferior (refiriéndose a moles del fármaco) durante un período de al menos cinco días.

El tumor es un tumor de tipo humano de un ratón SCID. Como ejemplo, el ratón SCID puede ser un ratón CB17.SCID (disponible en Taconic, Germantown, NY).

20 En otro aspecto más, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas. Dichas formulaciones comprenden típicamente un compuesto de conjugado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la invención se refiere a procedimientos de uso de los compuestos de conjugado de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona compuestos para su uso en la destrucción de una célula, en la que se administra un compuesto de conjugado de la invención a la célula en una cantidad suficiente para matarla. En una realización preferida, la célula es una célula tumoral. En otra realización, la invención proporciona compuestos para su uso en el retardo o la detención del crecimiento de un tumor en un sujeto mamífero, en la que se administra un compuesto de conjugado de la invención al sujeto en una cantidad suficiente para retardar o detener el crecimiento del tumor.

Otros aspectos, ventajas y objetos de la invención resultarán evidentes al revisar la descripción detallada que figura más adelante. El alcance de la protección se define en las reivindicaciones.

30 **Breve descripción de las figuras**

Las realizaciones de la presente invención se describen con referencia a las siguientes figuras. Para facilitar la comprensión de la presente invención, se hará referencia a la siguiente descripción detallada que se deberá leer en relación con las figuras adjuntas, en las que:

35 la Fig. 1 es una gráfica de los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido un conjugado de anticuerpo control de isotipo-fármaco, un conjugado de anticuerpo α -PSMA-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

la Fig. 2 es una gráfica de los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido diversas cantidades de un conjugado de anticuerpo α -PSMA-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

40 la Fig. 3 es una gráfica de los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido diversas cantidades de un conjugado de anticuerpo control de isotipo-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

la Fig. 4 es una gráfica de los cambios producidos en el peso corporal a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido diversas cantidades de un conjugado de anticuerpo control de isotipo-fármaco o solo un tampón de

conjugación (vehículo);

la Fig. 5 es una gráfica de los cambios producidos en el peso corporal a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido diversas cantidades de un conjugado de anticuerpo α -PSMA-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

la Fig. 6 es una gráfica de los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo, para los tumores que tienen un volumen tumoral medio inicial de 240 mm³, para los ratones que han recibido un conjugado de anticuerpo control de isotipo-fármaco, un conjugado de anticuerpo α -PSMA-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

la Fig. 7 es una gráfica de los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo, para los tumores que tienen un volumen tumoral medio inicial de 430 mm³, para los ratones que han recibido un conjugado de anticuerpo α -PSMA-fármaco o solo un tampón de conjugación (vehículo);

la Fig. 8 es una gráfica que compara los cambios producidos en el volumen tumoral a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido un control de isotipo y conjugados de toxina-anticuerpo; y

la Fig. 9 es una gráfica que compara los cambios producidos en el peso corporal a lo largo del tiempo para los ratones que han recibido un control de isotipo y conjugados de toxina-anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

Como se usa en la presente memoria, "Ala" se refiere a alanina.

"Boc" se refiere a *t*-butiloxicarbonilo.

"CPI" se refiere a ciclopropapirrolindol.

"Cbz" es carbobenzoxi.

Como se usa en la presente memoria, DCM se refiere a diclorometano.

"DDQ" se refiere a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona.

"DIPEA" es diisopropiletilamina.

"DMDA" es *N,N'*-dimetiletilendiamina.

"RBF" es un matraz de fondo redondo.

"DMF" es *N,N*-dimetilformamida.

"HATU" es *N*-óxido de hexafluorofosfato de *N*-[[[(dimetilamin)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]-piridin-1-*il*]metil]-*N*-metilmetanamonio.

Como se usa en la presente memoria, el símbolo "E" representa un grupo escindible enzimáticamente.

"EDCI" es 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.

Como se usa en la presente memoria, "Fmoc" se refiere a 9-fluorenilmetiloxicarbonilo.

"Fmoc" se refiere a 9-fluorenilmetoxicarbonilo.

"HOAt" es 7-aza-1-hidroxibenzotriazol.

"Leu" es leucina.

"PABA" se refiere a ácido *para*-aminobenzoico.

"PEG" se refiere a polietilenglicol.

"PMB" se refiere a *para*-metoxibencilo.

"TBAF" se refiere a fluoruro de tetrabutilamonio.

La abreviatura "TBSO" se refiere a *t*-butildimetilsililéter.

Como se usa en la presente memoria, "TEA" se refiere a trietilamina.

"TFA" se refiere a ácido trifluoroacético.

El símbolo "Q" se refiere a un agente terapéutico, agente de diagnóstico o marcador detectable.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen, en general, el mismo significado comúnmente conocido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio en el cultivo de células, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos descritos más adelante son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

Para la síntesis de péptidos y ácidos nucleicos se usan las técnicas convencionales. Generalmente, las reacciones enzimáticas y las etapas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase, de manera general, Sambrook *et al.*, "MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL", II ed., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan a lo largo del presente documento. La nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos más adelante son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Para las síntesis químicas y los análisis químicos, se usan las técnicas convencionales o modificaciones de las mismas.

La expresión "agente terapéutico" pretende significar un compuesto que, cuando está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz, produce un efecto terapéutico deseado sobre un mamífero. Para el tratamiento de

carcinomas, es deseable que el agente terapéutico también sea capaz de entrar en la célula diana.

El término "citotoxina" pretende significar un agente terapéutico que tiene el efecto deseado de ser citotóxico para las células cancerosas. "Citotóxico" significa que el agente detiene el crecimiento de, o mata, las células. Las citotoxinas ejemplares incluyen combretastatinas, duocarmicinas, los antibióticos antitumorales CC-1065, antraciclinas y compuestos relacionados. Otras citotoxinas incluyen micotoxinas, ricina y sus análogos, caliquamicinas, doxirrubicina y maitansinoides.

El término "profármaco" y la expresión "conjugado de fármaco" se usan en la presente memoria de manera intercambiable. Ambos se refieren a un compuesto que es relativamente inocuo para las células mientras está aún en la forma conjugada, pero que se degrada de manera selectiva a una forma farmacológicamente activa debido a condiciones, por ejemplo, enzimas, ubicadas dentro o en la proximidad de las células diana.

El término "marcador" pretende significar un compuesto útil en la caracterización de tumores u otro estado médico, por ejemplo, diagnosis, progresión de un tumor y ensayo de los factores secretados por células tumorales. Los marcadores se consideran un subconjunto de los "agentes de diagnóstico".

El término "selectivo" usado en relación con medios de escisión enzimáticos significa que la velocidad de escisión del resto de engarce es superior a la velocidad de escisión de un péptido que tiene una secuencia aleatoria de aminoácidos.

Las expresiones "grupo de direccionamiento" y "agente de direccionamiento" pretenden significar un resto que es (1) capaz de dirigir la entidad a la que está unido (por ejemplo, agente terapéutico o marcador) hacia una célula diana, por ejemplo, hacia un tipo específico de célula tumoral o (2) se activa preferentemente en un tejido diana, por ejemplo, un tumor. El grupo de direccionamiento o agente de direccionamiento puede ser una molécula pequeña, que pretende incluir tanto los no péptidos como los péptidos. El grupo de direccionamiento también puede ser una macromolécula, que incluye sacáridos, lectinas, receptores, ligandos de receptores, proteínas tales como BSA, anticuerpos, etcétera. En una realización preferida de la presente invención, el grupo de direccionamiento es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo monoclonal.

La expresión "espaciador autoinmolador" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de ligar de manera covalente dos restos químicos dentro de una molécula tripartita normalmente estable. El espaciador autoinmolador es capaz de separarse de manera espontánea del segundo resto si se escinde la unión con el primer resto.

La expresión "marcador detectable" pretende significar un resto que tiene una propiedad física o química detectable.

La expresión "grupo escindible" pretende significar un resto que es inestable *in vivo*. Preferentemente, el "grupo escindible" permite la activación del marcador o agente terapéutico por escisión del marcador o agente del resto del conjugado. En términos operativos, el engarce es escindido preferentemente *in vivo* por el entorno biológico. La escisión puede venir de cualquier procedimiento sin limitación, por ejemplo, enzimática, reductora, pH, etc. Preferentemente, el grupo escindible se selecciona para que la activación tenga lugar en el sitio de acción deseado, que puede ser un sitio en o cerca de las células diana (por ejemplo, células de carcinoma) o tejidos tales como los del sitio de acción terapéutica o de actividad del marcador. Dicha escisión puede ser enzimática, y los grupos enzimáticamente escindibles ejemplares incluyen aminoácidos naturales o secuencias de péptidos que terminan con un aminoácido natural y están unidos en su extremo carboxilo terminal al engarce. Aunque el grado de mejora de la velocidad de escisión no es importante para la invención, los ejemplos preferidos de engarces escindibles son aquellos en los que al menos aproximadamente el 10% de los grupos escindibles se escinden en el torrente sanguíneo en las 24 horas posteriores a su administración, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 35%.

El término "ligando" significa cualquier molécula que se une específicamente o se asocia de manera reactiva o forma complejos con un receptor, sustrato, determinante antigénico u otro sitio de unión en una célula o tejido diana. Los ejemplos de ligandos incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo), enzimas (por ejemplo, enzimas fibrinolíticas), modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interleucinas, interferones, eritropoyetina o factores estimuladores de colonias), hormonas peptídicas y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Las expresiones "engarce de hidrazina" y "engarce de hidrazina de autociclación" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Estas expresiones se refieren a un resto de engarce que, tras un cambio en las condiciones, tal como un cambio de pH, se someterá a una reacción de ciclación para formar uno o más anillos. El resto de hidrazina se convierte en una hidrazona al unirse. Esta unión puede ocurrir, por ejemplo, a través de una reacción con un grupo cetona en el resto L⁴. Por lo tanto, la expresión "engarce de hidrazona" también se puede usar para describir el engarce de la presente invención, debido a esta conversión en una hidrazona tras la unión.

La expresión "engarce de hidrazina de cinco miembros" o "engarce de hidrazina de 5 miembros" se refiere a restos moleculares que contienen hidrazina que, tras un cambio en las condiciones, tal como un cambio de pH, se someterá a una reacción de ciclación para formar uno o más anillos de 5 miembros. De manera alternativa, este

engarce de cinco miembros se puede describir de manera similar como un engarce de hidrazona de cinco miembros o un engarce de hidrazona de 5 miembros.

La expresión "engarce de hidrazina de seis miembros" o "engarce de hidrazina de 6 miembros" se refiere a restos moleculares que contienen hidrazina que, tras un cambio en las condiciones, tal como un cambio de pH, se someterá a una reacción de ciclación para formar uno o más anillos de 6 miembros. Este engarce de seis miembros se puede describir de manera similar como un engarce de hidrazona de seis miembros o un engarce de hidrazona de 6 miembros.

La expresión "reacción de ciclación", cuando se refiere a la ciclación de un péptido, una hidrazina o un engarce de disulfuro, indica la ciclación de ese engarce en un anillo e inicia la separación del complejo de fármaco-ligando. Esta tasa se puede medir *ex situ*, y se completa cuando se forma al menos el 90%, 95% o 100% del producto.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un mimético químico artificial del correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales y a polímeros de aminoácidos no naturales. Estos términos también engloban el término "anticuerpo".

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos sintéticos y naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los "análogos de aminoácidos" se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil-sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o las estructuras peptídicas principales modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Un aminoácido que se puede usar en particular es la citrulina, que es un precursor de la arginina y está implicado en la formación de urea en el hígado. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido natural. La expresión "aminoácido no natural" pretende representar la forma estereoquímica "D" de los veinte aminoácidos naturales descritos anteriormente. Además, se entiende que la expresión "aminoácido no natural" incluye homólogos de los aminoácidos naturales, y formas modificadas sintéticamente de los aminoácidos naturales. Las formas modificadas sintéticamente incluyen aminoácidos que tienen cadenas alqueno acortadas o alargadas en hasta dos átomos de carbono, aminoácidos que comprenden grupos arilo opcionalmente sustituidos y aminoácidos que comprenden grupos halogenados, preferentemente grupos alquilo y arilo halogenados. Cuando están unidos a un engarce o un conjugado de la invención, el aminoácido está en la forma de "una cadena lateral de aminoácido", en la que el grupo ácido carboxílico del aminoácido se ha reemplazado por un grupo ceto (C(O)). Así pues, por ejemplo, una cadena lateral de alanina es $\text{-C(O)-CH(NH}_2\text{)-CH}_3$, etc.

Los aminoácidos y péptidos se pueden proteger mediante grupos de bloqueo. Un grupo de bloqueo es un átomo o un resto químico que protege el terminal N de un aminoácido o un péptido de reacciones no deseadas y se puede usar durante la síntesis de un conjugado de fármaco-ligando. Debería permanecer unido al terminal N durante la síntesis, pudiéndose eliminar una vez completada la síntesis del conjugado de fármaco mediante condiciones químicas u otras condiciones que logren su eliminación de manera selectiva. Los grupos de bloqueo adecuados para la protección del terminal N son bien conocidos en la técnica de la química de péptidos. Los grupos de bloqueo ejemplares incluyen hidrógeno, D-aminoácido y cloruro de carbobenzoilo (Cbz).

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos bien en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos, o residuos o enlaces de estructuras principales modificadas, que son sintéticos, naturales o no naturales, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente las variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden realizar mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o la totalidad) de los codones seleccionados está sustituida con residuos de desoxiinosina y/o de bases mezcladas (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 19, 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260, 2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8, 91-98 (1994)). El término "ácido nucleico" se usa de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

El símbolo , cuando se utiliza como un enlace o se representa perpendicular a un enlace, indica el punto en el

que el resto representado está unido a la parte restante de la molécula, soporte sólido, etc.

El término “alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se establezca lo contrario, un radical de hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede estar totalmente saturado, mono- o poli-insaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término “alquilo”, a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle más adelante, tales como “heteroalquilo”. Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarburo se denominan “homoealquilo”.

El término “alquileo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente obtenido de un alcano, tal como se ejemplifica mediante -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e incluye además aquellos grupos descritos más adelante como “heteroalquileo”. Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono los preferidos en la presente invención. Un “alquilo inferior” o “alquileo inferior” es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

El término “heteroalquilo”, por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se establezca lo contrario, un radical hidrocarburo cíclico, o de cadena lineal o ramificada, estable, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado de entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno, carbono y azufre pueden opcionalmente estar oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede opcionalmente estar cuaternizado. El/los heteroátomo/s O, N y S y Si pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-, -S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃, y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De manera similar, el término “heteroalquileo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica mediante -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar bien uno o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilenodiamino y similares). Los términos “heteroalquilo” y “heteroalquileo” engloban poli(etilenglicol) y sus derivados (véase, por ejemplo, Shearwater Polymers Catalog, 2001). Además, para los grupos de unión de alquileo y heteroalquileo, la orientación del grupo de unión no está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R'- representa tanto -C(O)₂R'- como -R'C(O)₂-.

El término “inferior” en combinación con los términos “alquilo” o “heteroalquilo” se refiere a un resto que tienen de 1 a 6 átomos de carbono.

Los términos “alcoxi”, “alquilamino”, “alquilsulfonilo” y “alquiltio” (o tialcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino, un grupo SO₂ o un átomo de azufre, respectivamente. El término “arilsulfonilo” se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula mediante un grupo SO₂, y el término “sulfhidrilo” se refiere a un grupo SH.

En general, un “sustituyente acilo” también se selecciona de entre el grupo establecido anteriormente. Como se usa en la presente memoria, el término “sustituyente acilo” se refiere a grupos unidos a, y que completan la valencia de un átomo carbonilo que está unido bien directa o indirectamente al núcleo policíclico de los compuestos de la presente invención.

Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se establezca lo contrario, versiones cíclicas de “alquilo” sustituido o no sustituido y “heteroalquilo” sustituido o no sustituido, respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo. Los ejemplos de heterocicloalquilos incluyen 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperacinilo, 2-piperacinilo. Los heteroátomos y átomos de carbono de las estructuras cíclicas están opcionalmente oxidados.

Los términos “halo” o “halógeno”, por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos tales como “haloalquilo” pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término haloalquilo (C₁-C₄) se entiende que incluye trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo.

El término “arilo” significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarburo, aromático, poliinsaturado sustituido o no sustituido, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos), que están condensados conjuntamente o unidos covalentemente. El término “heteroarilo” se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de entre N, O, y S, en los que los átomos de nitrógeno, carbono y azufre están opcionalmente oxidados, y el/los átomo/s de nitrógeno está/n opcionalmente cuaternizado/s. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula mediante un heteroátomo. Los ejemplos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, piracínilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-soxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalínilo, 5-quinoxalínilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo anteriormente indicados se seleccionan de entre el grupo de sustituyentes aceptables descrito más adelante. “Arilo” y “heteroarilo” también abarcan sistemas de anillos en los que uno o más sistemas de anillos no aromáticos están condensados, o unidos de otra forma, a un sistema arilo o heteroarilo.

Para abreviar, el término “arilo” cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo según lo definido anteriormente. Así pues, el término “arilalquilo” pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, “alquilo”, “heteroalquilo”, “arilo” y “heteroarilo”) incluye tanto las formas sustituidas como las no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan más adelante.

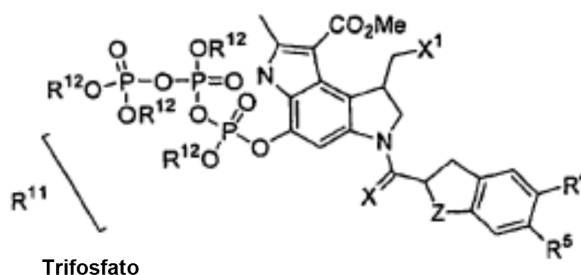
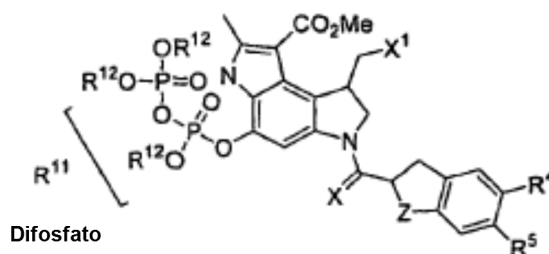
Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos frecuentemente mencionados como alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquilenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilenilo y heterocicloalquilenilo) se denominan generalmente “sustituyentes alquilo” y “sustituyentes heteroalquilo”, respectivamente, y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de entre: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y NO_2 en un número que varía de cero a $(2m' + 1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono de dicho radical. R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno de ellos preferentemente de manera independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o no sustituidos, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de manera independiente tal como cada grupo R' , R'' , R''' y R'''' , cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la anterior descripción de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término “alquilo” pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes arilo y los sustituyentes heteroarilo se denominan “sustituyentes arilo” y “sustituyentes heteroarilo” en general, respectivamente y son diversos y se seleccionan de entre, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-R'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y NO_2 , $-R'$, $-N_3$, $-CN(Ph)_2$, fluoroalcoxi (C_1-C_4), y fluoroalquilo (C_1-C_4), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas del sistema de anillo aromático; y en los que R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan preferentemente de manera independiente de entre hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) y heteroalquilo, arilo y heteroarilo no sustituido, (arilo no sustituido)-alquilo (C_1-C_4) y (arilo no sustituido)-oxialquilo (C_1-C_4). Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de manera independiente como lo son cada grupo R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes arilo de átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, en la que T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en la que A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado se puede reemplazar opcionalmente por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de la fórmula $-C(RR')_s-X-(CR''R''')_d-$, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, o $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R , R' , R'' y R''' se seleccionan preferentemente de manera independiente de entre

hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) sustituido o no sustituido.

Como se usa en la presente memoria, el término “difosfato” incluye un éster de ácido fosfórico que contiene dos grupos fosfato. El término “trifosfato” incluye un éster de ácido fosfórico que contiene tres grupos fosfato. Por ejemplo, los fármacos particulares que tienen un difosfato o trifosfato incluyen:



5

Como se usa en la presente invención, el término “heteroátomo” incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

El símbolo “R” es una abreviatura general que representa un grupo sustituido que se selecciona de entre grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, heteroalquilo sustituidos o no sustituidos, arilo sustituidos o no sustituidos, heteroarilo sustituidos o no sustituidos y heterociclilo sustituidos o no sustituidos.

10

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa en la presente memoria, significa un material, una composición o un vehículo aceptable farmacéuticamente, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, que porta o transporta un agente químico. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” las sales de los compuestos activos que se han preparado con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados sobre los compuestos descritos en la presente memoria. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien en forma pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien en forma pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas de ácidos inorgánicos del tipo de ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrógeno-carbónico, fosfórico, monohidrógeno-fosfórico, dihidrógeno-fosfórico, sulfúrico, monohidrógeno-sulfúrico, yodhídrico o fosforoso, así como las sales obtenidas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos del tipo acético, propiónico, isobutírico, maléico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, *p*-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico. También se incluyen las sales de aminoácidos tales como arginato y sales de ácidos orgánicos del tipo de ácidos glucurónico o galacturónico (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, “Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen tanto funcionalidades ácidas como básicas que permiten convertir los compuestos en bases bien de adición de ácido o de adición de base.

15

20

25

30

Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente mediante el contacto de la sal con una base o un ácido y el aislamiento del compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en disolventes polares, pero, por otra parte, las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

35

Además de las formas de sal, la presente invención proporciona compuestos que están en forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos descritos en la presente memoria son aquellos compuestos que experimentan cambios químicos fácilmente en condiciones fisiológicas, proporcionando los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un reservorio de parche transdérmico con una enzima o un reactivo químico adecuado.

Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y pertenecen al ámbito de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretenden englobar en el ámbito de la presente invención.

Ciertos compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales pertenecen al ámbito de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radioactivos tales como, por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean o no radioactivas, se pretenden englobar en el ámbito de la presente invención.

La expresión "resto de unión" o "resto para unir un grupo de direccionamiento" se refiere a un resto que permite la unión de un grupo de direccionamiento con el engarce. Los grupos de unión típicos incluyen alquilo, aminoalquilo, aminocarbonilalquilo, carboxialquilo, hidroxialquilo, alquil-maleimida, alquil-N-hidroxisuccinimida, poli(etilenglicol)-maleimida y poli(etilenglicol)-N-hidroxisuccinimida, pudiendo estar además todos ellos sustituidos. El engarce también puede tener el resto de unión realmente unido al grupo de direccionamiento.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "grupo saliente" se refiere a una porción de un sustrato que se escinde del sustrato en una reacción

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de tipo disulfuro, o una porción de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} , y puede ser del isotipo μ , δ , γ , α o ϵ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, C_L , que puede ser del isotipo κ o λ . Las regiones V_H y V_L se pueden dividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el terminal amino hacia el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con los tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Las expresiones "fragmento de anticuerpo" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usan en la presente memoria, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la función de unión al antígeno de un anticuerpo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión de "fragmento de anticuerpo" o "porción de unión al anticuerpo" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature*, 341, 544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región de determinación de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes separados, se pueden unir, mediante procedimientos recombinantes, por un engarce sintético que haga posible prepararlos como una cadena de una proteína única, en la que las regiones V_L y V_H se emparejen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science*, 242: 423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también se pretenden incluir en la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y

los fragmentos se rastrean para determinar su utilidad de la misma manera que se hace con los anticuerpos intactos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpos de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión únicas para un determinado epítipo.

- 5 Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, se puede usar cualquier técnica conocida en la materia (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pág. 77-96 en "MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY", Alan R. Liss, Inc. (1985)).

- 10 Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la técnica. Se inmuniza una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o conejos con la proteína usando un adyuvante estándar, tal como el adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. La respuesta inmune del animal a la preparación de inmunógeno se controla tomando muestras de sangre y determinando el título de reactividad hacia las subunidades beta. Cuando se obtienen apropiadamente altos títulos de anticuerpo contra el inmunógeno, se extrae sangre del animal y se preparan antisueros. Si se desea, se puede hacer el fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer en anticuerpos reactivos hacia la proteína.

- 15 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante diversas técnicas que son familiares para los expertos en la materia. En síntesis, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976)). Otros procedimientos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros procedimientos bien conocidos en la técnica.

- 20 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino. Se puede obtener ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera a partir del hibridoma murino de interés y diseñarlo para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) mediante técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, se pueden ligar las regiones variables murinas a las regiones constantes humanas mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.225.539 de Winter, y en la patente de EE.UU. n° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

- 25 En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos humanos se pueden generar mediante la inmunización de ratones transgénicos o transcromosómicos en los que se hayan desactivado los genes de inmunoglobulina de ratón endógenos y se hayan introducido los genes de inmunoglobulina humanos exógenos. Dichos ratones son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299, y 5.770.429; todas ellas de Lonberg y Kay; la patente de EE.UU. N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kuchlerapati *et al.*, y la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*). Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante procedimientos de presentación en fagos para el rastreo de bibliotecas de genes de inmunoglobulinas humanas. Dichos procedimientos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos también se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.223.409; 5.403.484, y 5.571.698 de Ladner *et al.*, patentes de EE.UU. N° 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; patentes de EE.UU. N° 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*; y patentes de EE.UU. n° 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*).

- 35 "Soporte sólido", como se usa en la presente memoria, se refiere a un material que es sustancialmente insoluble en un sistema disolvente seleccionado, o que se puede separar fácilmente (por ejemplo, mediante precipitación) de un sistema disolvente seleccionado en el que es soluble. Los soportes sólidos útiles en la puesta en práctica de la presente invención pueden incluir grupos que se activan o que son capaces de activarse para permitir que especies seleccionadas se unan al soporte sólido. Un soporte sólido también puede ser un sustrato, por ejemplo, un chip, una oblea o un pocillo, sobre el que se une un compuesto individual, o más de un compuesto, de la invención.

- 40 "Grupo funcional reactivo", como se usa en la presente memoria, se refiere a grupos que incluyen, pero sin limitación, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidracinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, ácidos sulfénicos, isonitrilos, amidinas, imidinas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos tiohidroxámicos, alenos, orto-ésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, pseudoureas, semicarbazidas, carbodiimidas, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azo, compuestos azoxi y compuestos nitroso. Los grupos funcionales reactivos también incluyen los usados para preparar bioconjugados, por ejemplo, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida y maleimidas (véase, por ejemplo, Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES" Academic Press, San Diego, (1996)). Los procedimientos para

preparar cada uno de estos grupos funcionales son bien conocidos en la técnica y su aplicación o modificación para un determinado fin pertenece a las capacidades de un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sandler y Karo, eds. "ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS", Academic Press, San Diego, (1989)). Los grupos funcionales reactivos pueden estar protegidos o desprotegidos.

- 5 Los compuestos de la invención se preparan como un solo isómero (por ejemplo, enantiómero, *cis-trans*, posicional, diastereómero) o como una mezcla de isómeros. En una realización preferida, los compuestos se preparan como un sustancialmente isómero único. Los procedimientos de preparación de compuestos sustancialmente isoméricamente puros son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar mezclas enriquecidas enantiómericamente y compuestos enantioméricos puros mediante el uso de productos intermedios de síntesis que sean enantioméricamente puros en combinación con reacciones que bien mantengan la estereoquímica del centro quiral invariable o proporcionen su completa inversión. Como alternativa, el producto final o los productos intermedios de la ruta sintética se pueden resolver en un solo estereoisómero. Las técnicas para la inversión o el mantenimiento de un determinado estereocentro, y las técnicas para la resolución de mezclas de estereoisómeros son bien conocidas en la materia y forman parte de los conocimientos de un experto en la materia para la elección de un procedimiento apropiado para una situación en particular. Véase, de manera general, Furniss *et al.*, (eds.), "VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY", V ed., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, pág. 809-816, (1991); y Heller, *Acc. Chem. Res.*, 23:128, (1990).

Engarces

- 20 La presente invención proporciona conjugados de fármaco-ligando en los que el fármaco está ligado al ligando a través de un engarce químico incluyendo, pero sin limitación, los divulgados en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 11/134.826 y las solicitudes de patente provisionales de EE.UU. N° de serie 60/572.667 y 60/661.174. Este engarce es un engarce de peptidilo y se representa en la presente memoria como $(L^4)_p-F-(L^1)_m$. Además de los engarces unidos a un fármaco, la presente invención también proporciona brazos del engarce escindibles, que son apropiados para la unión a esencialmente cualquier especie molecular. El aspecto de los brazos del engarce de la invención se ejemplifica en la presente memoria por referencia a su unión a un resto terapéutico. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que los engarces pueden estar unidos a diversas especies, incluyendo agentes de diagnóstico, agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, marcadores detectables y similares.

- 30 En un aspecto, la presente invención se refiere a engarces que son útiles para unir grupos de direccionamiento a agentes terapéuticos y marcadores. En otro aspecto, la invención proporciona engarces que confieren estabilidad a los compuestos, reducen su toxicidad *in vivo* o, si no, afectan favorablemente a su farmacocinética, biodisponibilidad y/o farmacodinámica. En general, se prefiere que, en dichas realizaciones, el engarce se escinda, liberando el fármaco activo, una vez que el fármaco se haya administrado a su sitio de acción. Por lo tanto, en una realización de la invención, los engarces de la invención no dejan rastro, de manera que una vez retirado del agente terapéutico o el marcador (tal como durante la activación), no queda rastro de la presencia del engarce.

- 40 En otra realización de la invención, los engarces se caracterizan por su capacidad de ser escindidos en un sitio de o cerca de la célula diana, tal como en el sitio de acción terapéutica o actividad del marcador. Dicha escisión puede ser de naturaleza enzimática. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica del agente terapéutico o del marcador, reducir la toxicidad y los efectos secundarios sistémicos. Los grupos escindibles preferidos para la escisión enzimática incluyen enlaces peptídicos. En otras realizaciones, los engarces son sensibles al pH y se escinden a través de cambios en el pH.

- 45 Un aspecto importante de la presente invención es la capacidad de controlar la velocidad con la que los engarces se escinden. Por ejemplo, los engarces de hidrazina son particularmente útiles porque, en función de la estructura usada en particular, se puede variar la velocidad a la que el engarce se cicla y, por lo tanto, escinde el fármaco del ligando. El documento WO 02/096910 proporciona varios complejos específicos de ligando-fármaco que tienen un engarce de hidrazina. Sin embargo, no hay manera de "sintonizar" la composición del engarce con la velocidad de ciclación requerida, y los compuestos particulares descritos escinden el ligando del fármaco a una velocidad más lenta de lo que se desearía para muchos conjugados de fármaco-engarce. Por el contrario, los engarces de hidrazina proporcionan un intervalo de velocidades de ciclación, de muy rápida a muy lenta, permitiendo de este modo la selección de un determinado engarce de hidrazina en base a la velocidad de ciclación deseada. Por ejemplo, se puede lograr una ciclación muy rápida con engarces de hidrazina que produzcan un solo anillo de 5 miembros al escindirse. Las velocidades de ciclación preferidas para la administración dirigida de un agente citotóxico en las células se logran con engarces de hidrazina que producen, tras la escisión, bien dos anillos de 5 miembros o un solo anillo de 6 miembros procedente de un engarce que tiene dos metilos en la posición geminal. Se ha demostrado que el efecto de *gem*-dimetilo acelera la velocidad de la reacción de ciclación en comparación con un solo anillo de 6 miembros sin los dos metilos en la posición geminal. Esto se debe a la tensión liberada en el anillo. Sin embargo, a veces, los sustituyentes pueden ralentizar la reacción en lugar de acelerarla. A menudo, las razones del retardo se remontan al impedimento estérico. Como se muestra en el Ejemplo 2.4, la sustitución de *gem*-dimetilo permite una reacción de ciclación mucho más rápida en comparación con el caso en el que el carbono geminal es un CH_2 .

Es importante señalar, sin embargo, que en algunas realizaciones, se puede preferir un engarce que se escinda más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación tanto con una liberación rápida como con un componente de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un engarce que se escinde más lentamente. En ciertas realizaciones, se consigue una velocidad lenta de ciclación mediante un engarce de hidrazina que produce, tras la escisión, bien un solo anillo de 6 miembros, sin la sustitución de *gem*-dimetilo, o un solo anillo de 7 miembros.

Los engarces también sirven para estabilizar el agente terapéutico o marcador contra la degradación mientras está en circulación. Esta característica proporciona un beneficio significativo, puesto que dicha estabilización prolonga la semivida en circulación del agente o marcador unido. El engarce también sirve para atenuar la actividad del agente o marcador unido, de manera que el conjugado sea relativamente benigno mientras está en la circulación y tenga el efecto deseado, por ejemplo, sea tóxico, después de la activación en el sitio de acción deseado. Para los conjugados de agente terapéutico, esta característica del engarce sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

Los grupos estabilizadores se seleccionan preferentemente para limitar el aclaramiento y el metabolismo del agente terapéutico o marcador por las enzimas que pueden estar presentes en la sangre o tejido no diana, y también se seleccionan para limitar el transporte del agente o marcador en las células. Los grupos estabilizadores sirven para bloquear la degradación del agente o marcador, pudiendo también actuar para proporcionar otras características físicas del agente o marcador. El grupo estabilizador también puede mejorar la estabilidad del agente o marcador durante el almacenamiento, bien en una forma formulada o no formulada.

Lo ideal es que el grupo estabilizador sirva para estabilizar un agente terapéutico o marcador si sirve para proteger el agente o marcador de la degradación cuando se analiza mediante el almacenamiento del agente o marcador en la sangre humana a 37 °C durante 2 horas, produciendo menos del 20%, preferentemente menos del 10%, más preferentemente menos del 5% y aún más preferentemente menos del 2%, de escisión del agente o marcador por las enzimas presentes en la sangre humana en las condiciones de ensayo dadas.

La presente invención también se refiere a conjugados que contienen estos engarces. Más particularmente, la invención se refiere a profármacos que se pueden usar para el tratamiento de enfermedades, especialmente para la quimioterapia del cáncer. Específicamente, el uso de los engarces descritos en la presente memoria proporciona profármacos que muestran una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida y una estabilidad mejorada en sangre en relación con profármacos de estructura similar.

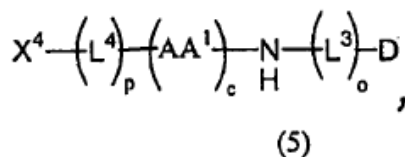
L^4 es un resto de engarce que confiere un aumento de la solubilidad o una disminución de las propiedades de agregación a los conjugados que utilizan un engarce que contiene el resto. El engarce L^4 no tiene que ser autoinmolador. L^4 puede comprender un polímero, tal como un resto de polietilenglicol. Además, el engarce L^4 comprende, por ejemplo, tanto un componente de polímero como un pequeño resto químico.

En una realización preferida, L^4 comprende un resto de polietilenglicol (PEG). La porción de PEG de L^4 puede tener 1-12 unidades de repetición, más preferentemente 3-12 unidades de repetición, más preferentemente 2-6 unidades de repetición, o incluso más preferentemente 3-5 unidades de repetición y lo más preferentemente 4 unidades de repetición. Es útil combinar PEG como parte del resto L^4 para aumentar la hidrosolubilidad del complejo. Además, el resto de PEG reduce el grado de agregación que se puede producir durante la conjugación del fármaco con el anticuerpo.

(1) engarces peptídicos (F)

Como se ha tratado anteriormente, los engarces de peptidilo de la invención se pueden representar mediante la fórmula general: $(L^4)_p-F-(L^1)_m$, en la que F representa la parte de engarce que comprende el resto peptidilo. En todas las realizaciones, la parte F comprende un grupo amino y un grupo espaciador L^3 .

Los conjugados de la invención comprenden una estructura de la Fórmula 5:

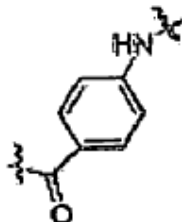


en la que L^4 es un resto que confiere un aumento de la solubilidad o una disminución de las propiedades de agregación, como se describe anteriormente; L^3 es un grupo espaciador que comprende un grupo funcional carboxilo, y el carboxilo de L^3 forma un enlace de tipo amida con un grupo funcional amina colgante de D; y o es 1 y p es 1. AA^1 representa dos aminoácidos; c es 1; y L^1 está ausente (es decir, m es 0 en la fórmula general).

En los engarces peptídicos de la invención, AA^1 está ligado, en su terminal amino, directamente a L^4 .

El grupo espaciador L³

El grupo espaciador L³ se caracteriza porque comprende un grupo funcional carboxilo y el carboxilo de L³ forma un enlace de tipo amida con un grupo funcional amina colgante de D. El espaciador -L³-NH- tiene la siguiente fórmula:



- 5 Tras la escisión del engarce de la invención que contiene L³, el resto L³ permanece unido al fármaco D. Por consiguiente, el resto L³ se selecciona de manera que su presencia unida a D no altere significativamente la actividad de D.

La secuencia peptídica AA¹

El grupo de AA¹ representa dos aminoácidos que están unidos entre sí por un enlace de tipo amida.

- 10 La secuencia peptídica (AA¹) es funcionalmente el residuo de amidación de dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace de tipo amida. El péptido de la presente invención se selecciona para dirigir la escisión catalizada enzimáticamente del péptido por una enzima en un lugar de interés de un sistema biológico. Por ejemplo, para los conjugados que se dirigen a una célula mediante un agente de direccionamiento y luego son tomados por la célula, se selecciona un péptido que sea escindido por una o más proteasas lisosomales, de modo que el péptido se
- 15 escinda intracelularmente dentro del lisosoma. El número de aminoácidos del péptido es 2. Las secuencias peptídicas que son susceptibles a la escisión por enzimas o clases de enzimas específicas son bien conocidas en la técnica.

- En la técnica, se conocen muchas secuencias peptídicas que son escindidas por las enzimas en el suero, hígado, intestino, etc. Una secuencia peptídica ejemplar de la invención incluye una secuencia peptídica que es escindida
- 20 por una proteasa. La descripción que sigue al uso de una secuencia sensible a proteasas tiene el objetivo de ilustrar y no sirve para limitar el alcance de la presente invención.

- Cuando la enzima que escinde el péptido es una proteasa, el engarce generalmente incluye un péptido que contiene una secuencia de reconocimiento de escisión para la proteasa. Una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa es una secuencia de aminoácidos específica reconocida por la proteasa durante la escisión
- 25 proteolítica. En la técnica, se conocen muchos sitios de escisión de proteasa, y estos y otros sitios de escisión se pueden incluir en el resto de engarce. Véase, por ejemplo, Matayoshi *et al.*, *Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al. Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al. Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al. Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith *et al. Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); Bouvier *et al. Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995), Hardy *et al.*, en "AMYLOID PRECURSOR IN DEVELOPMENT, AGING, AND ALZHEIMER'S DISEASE", ed. Masters *et al.*, pág.190-198 (1994).
- 30

Los aminoácidos de la secuencia peptídica (AA¹)_C se seleccionan en función de su idoneidad para la escisión enzimática selectiva por parte de moléculas particulares tales como la proteasa asociada al tumor. Los aminoácidos usados pueden ser aminoácidos naturales o no naturales. Pueden estar en la configuración L.

- En una realización preferida, la secuencia peptídica (AA¹)_C se selecciona en base a su capacidad para ser escindida por una proteasa lisosomal, cuyos ejemplos no restrictivos incluyen catépsinas B, C, D, H, L y S. Preferentemente, la secuencia peptídica (AA¹)_C es capaz de ser escindida por la catépsina B *in vitro*, lo que se puede probar mediante ensayos de escisión de proteasa *in vitro* conocidos en la técnica.
- 35

- En otra realización, la secuencia peptídica (AA¹)_C se selecciona en base a su capacidad para ser escindida por una proteasa asociada al tumor, tal como una proteasa que se encuentre extracelularmente en las proximidades de las células tumorales, cuyos ejemplos no restrictivos incluyen oligopeptidasa thimet (TOP) y CD10. La capacidad de un péptido para ser escindido por TOP o CD10 se puede probar mediante ensayos de escisión de proteasa *in vitro*.
- 40

Los ejemplos adecuados de secuencias peptídicas adecuadas para su uso en los conjugados de la invención incluyen Val-Cit y Cit-Cit.

- Las proteasas se han implicado en la metástasis del cáncer. El aumento de la síntesis de la proteasa uroquinasa se ha correlacionado con un aumento de la capacidad de metástasis en muchos cánceres. La uroquinasa activa la plasmina a partir de plasminógeno, que se encuentra de forma ubicua en el espacio extracelular y su activación puede provocar la degradación de las proteínas de la matriz extracelular, mediante lo que las células tumorales de
- 45

metástasis realizan la invasión. La plasmina también puede activar las colagenasas promoviendo así la degradación del colágeno de la membrana basal que rodea los capilares y el sistema linfático, permitiendo de ese modo que las células tumorales invadan los tejidos diana (Dano, *et al. Adv. Cancer. Res.*, 44: 139 (1985)). Por lo tanto, está dentro del alcance de la presente invención utilizar como engarce una secuencia peptídica que sea escindida por la uroquinasa.

La invención también proporciona el uso de secuencias peptídicas que son sensibles a la escisión por triptasas. Los mastocitos humanos expresan al menos cuatro triptasas distintas, denominadas α β I, β II y β III. Estas enzimas no están controladas por los inhibidores de proteinasas del plasma sanguíneo y sólo escinden unos cuantos sustratos fisiológicos *in vitro*. La familia de triptasas de las proteasas serina se ha implicado en una variedad de enfermedades alérgicas e inflamatorias en las que participan los mastocitos debido a los niveles elevados de triptasa encontrados en los fluidos biológicos de los pacientes con estos trastornos. Sin embargo, aún no se ha delimitado el papel exacto de la triptasa en la fisiopatología de la enfermedad. El alcance de las funciones biológicas y las correspondientes consecuencias fisiológicas de la triptasa se definen sustancialmente por su especificidad por el sustrato.

La triptasa es un potente activador del activador del plasminógeno de tipo pro-uroquinasa (uPA), la forma zimogénica de una proteasa asociada con la metástasis y la invasión tumoral. La activación de la cascada del plasminógeno, que produce la destrucción de la matriz extracelular para la extravasación y la migración celular, puede ser una función de la activación de la triptasa del activador del plasminógeno de tipo pro-uroquinasa en la secuencia P4-P1 de Pro-Arg-Phe-Lys (SEC ID N° : 4) (Stack, *et al., Journal of Biological Chemistry* 269 (13): 9416-9419 (1994)). El péptido intestinal vasoactivo, un neuropéptido que está implicado en la regulación de la permeabilidad vascular, también es escindido por la triptasa, principalmente en la secuencia Thr-Arg-Leu-Arg (SEC ID N°: 5) (Tam, *et al., Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 3: 27-32 (1990)). El receptor acoplado a la proteína G PAR-2 puede ser escindido y activado por la triptasa en la secuencia Ser-Lys-Gly-Arg (SEC ID N°: 6) para generar la proliferación de fibroblastos, mientras que el receptor activado por trombina PAR-1 es desactivado por la triptasa en la secuencia Pro-Asn-Asp-Lys (SEC ID N°: 7) (Molino *et al., Journal of Biological Chemistry* 272(7): 4043-4049 (1997)). Tomadas conjuntamente, estas pruebas sugieren un papel central de la triptasa en la remodelación tisular debida a la enfermedad. Esto coincide con los profundos cambios observados en varios trastornos mediados por los mastocitos. Un sello distintivo del asma crónico y de otras enfermedades respiratorias a largo plazo es la fibrosis y el engrosamiento de los tejidos subyacentes que podrían ser el resultado de la activación de la triptasa de sus dianas fisiológicas. Del mismo modo, una serie de informes ha demostrado la asociación de la angiogénesis con la densidad de los mastocitos, la actividad de la triptasa y el mal pronóstico en una variedad de cánceres (Coussens *et al., Genes and Development* 13(11): 1382-1397 (1999)); Takanami *et al., Cancer* 88(12): 2686-92 (2000); Toth-Jakatics *et al., Human Pathology* 31(8): 955-960 (2000); Ribatti *et al., International Journal of Cancer* 85(2): 171-5 (2000)).

Se conocen procedimientos en la técnica para evaluar si una determinada proteasa escinde una secuencia peptídica seleccionada. Por ejemplo, el uso de sustratos peptídicos fluorogénicos de 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) es un procedimiento bien establecido para la determinación de la especificidad de la proteasa (Zimmerman, M., *et al., (1977) Analytical Biochemistry* 78:47-51). La escisión específica del enlace de tipo anilida libera el grupo saliente de AMC fluorogénico, permitiendo determinar de manera sencilla las velocidades de escisión de cada uno de los sustratos. Más recientemente, las matrices (Lee, D., *et al., (1999) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:1667-72) y las bibliotecas de rastreo de posiciones (Rano, T. A., *et al., (1997) Chemistry and Biology* 4:149-55) de las bibliotecas de sustratos peptídicos de AMC se han empleado para perfilar rápidamente la especificidad N-terminal de proteasas mediante el muestreo de una amplia selección de sustratos en un solo experimento. Por lo tanto, un experto en la materia puede evaluar fácilmente una gran variedad de secuencias peptídicas para determinar su utilidad en la presente invención sin la necesidad de realizar una experimentación.

Fármacos

Los fármacos, representados como "D" en la presente memoria, se proporcionan en la presente invención como parte de un conjugado de fármaco-ligando en el que el fármaco está unido a un ligando a través de un enlace de tipo peptídico. El fármaco debe poseer una actividad biológica deseada y contener un grupo funcional reactivo para unirse al ligando. La actividad biológica deseada incluye el diagnóstico, la curación, la mitigación, el tratamiento o la prevención de la enfermedad en un animal tal como un ser humano. Por lo tanto, siempre y cuando tenga el grupo funcional reactivo necesario, el término "fármaco" se refiere a los productos químicos reconocidos como fármacos en el Farmacopea oficial de Estados Unidos, la Farmacopea Homeopática oficial de Estados Unidos o el Formulario Nacional oficial, o cualquier suplemento de los mismos. Los fármacos ejemplares se exponen en el "Physician's Desk Reference" (PDR) y en el Libro Naranja mantenido por la agencia de alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA). De manera continua, se descubren y desarrollan nuevos medicamentos, y la presente invención hace posible que estos nuevos medicamentos también se puedan incorporar en el complejo de fármaco-ligando de la presente invención.

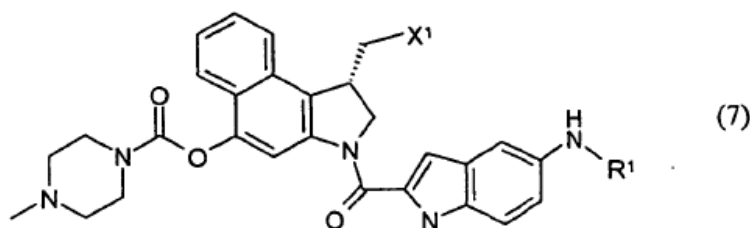
El conjugado de fármaco-ligando es eficaz para los fines habituales para los que los correspondientes fármacos son eficaces, pero tiene una eficacia superior debido a la capacidad, inherente al ligando, de transportar el fármaco a la célula deseada en la que es particularmente beneficioso.

Los fármacos de la presente invención son fármacos citotóxicos útiles en la terapia del cáncer. El fármaco se puede activar en células tumorales por conjugación a un ligando específico del tumor. Estos conjugados de fármaco-ligando específicos del tumor tienen especificidad tumoral derivada de la especificidad del ligando. Los ejemplos de esto son conjugados de fármaco-ligando que son sustratos muy selectivos para enzimas específicas del tumor, donde estas enzimas están presentes en las proximidades del tumor en cantidades suficientes para generar los niveles citotóxicos de fármaco libre alrededor del tumor. Una de las ventajas de estos complejos de fármaco-ligando específicos del tumor es que son estables a las proteasas adventicias en el suero humano. Otra ventaja del complejo de fármaco-ligando es que son menos tóxicos que el correspondiente fármaco libre; además, la especificidad del complejo puede permitir el uso de concentraciones totales más bajas en relación con el fármaco libre, ya que el aumento de especificidad se traducirá en un mayor porcentaje del complejo presente en el sitio tumoral.

Citotoxinas

Las citotoxinas de la presente invención son derivados de duocarmicina potentes y activos. Los agentes precursores son antibióticos antitumorales excepcionalmente potentes que obtienen sus efectos biológicos a través de la alquilación selectiva de la secuencia controlada estereoelectrónicamente de ADN (Boger *et al.* *J. Org. Chem.* 55: 4499 (1990); Boger *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8961 (1990); Boger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6645 (1991); Boger *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 115: 9872 (1993); Boger *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2:759 (1992)). Tras la divulgación inicial de las duocarmicinas, se han hecho grandes esfuerzos por dilucidar la selectividad de la alquilación del ADN de las duocarmicinas y su origen estructural

La presente invención se refiere a un compuesto citotóxico que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula 7:



en la que X^1 es un grupo saliente seleccionado de entre el grupo que consiste en Br y Cl; y dicho fármaco está ligado a F a través de R^1 .

Conjugados de duocarmicina

Los engarces peptídicos de la invención se pueden usar en conjugados que contienen análogos de duocarmicina como agentes citotóxicos. Los conjugados de la invención se describen más detalladamente a continuación. A menos que se indique lo contrario, los sustituyentes se definen como se han indicado anteriormente en los apartados relativos a las citotoxinas y los engarces peptídicos.

Los compuestos de la invención se pueden hacer reaccionar, por ejemplo, con una cadena lateral de un aminoácido de un agente de direccionamiento, tal como un anticuerpo, para unir de ese modo el agente de direccionamiento con el resto de engarce-fármaco.

Agentes de direccionamiento

Los brazos del engarce y las citotoxinas de la invención pueden estar ligados a agentes de direccionamiento que proporcionen selectivamente una carga útil a una célula, órgano o parte del cuerpo. Los agentes de direccionamiento ejemplares tales como anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos), ligandos para receptores, lectinas, sacáridos y anticuerpos son reconocidos en la técnica y son útiles sin limitación en la práctica de la presente invención. Otros agentes de direccionamiento incluyen una clase de compuestos que no incluyen motivos específicos de reconocimiento molecular, sino macromoléculas tales como poli(etilenglicol), polisacáridos y poliaminoácidos, que añaden masa molecular a la citotoxina. La masa molecular adicional afecta a la farmacocinética de la citotoxina, por ejemplo, a la semivida en suero.

En una realización ejemplar, la invención proporciona un conjugado de citotoxina-engarce con un agente de direccionamiento que es una biomolécula, por ejemplo, un anticuerpo. Las rutas para obtener los conjugados ejemplares de la invención se exponen en los esquemas anteriores.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención se pueden obtener de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir mediante procedimientos sintéticos. Las proteínas pueden ser proteínas naturales o proteínas mutadas. Las mutaciones se pueden efectuar mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio u otros medios de inducción de mutaciones conocidos por los

expertos en la materia. Las proteínas útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser bien policlonales o monoclonales, pero lo más preferentemente es que sean monoclonales. Los péptidos y ácidos nucleicos se pueden aislar de fuentes naturales o pueden tener un origen total o parcialmente sintético.

- 5 En una realización preferida, el agente de direccionamiento es un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se selecciona en base a su especificidad por un antígeno expresado en una célula diana, o en un sitio diana, de interés. Se ha identificado una amplia variedad de antígenos específicos de un tumor o específicos de otra enfermedad, siendo los anticuerpos contra estos antígenos usados o propuestos para su uso en el tratamiento de dichos tumores u otras enfermedades. Los anticuerpos que se conocen en la técnica se pueden usar en los conjugados de la
- 10 invención, en particular para el tratamiento de la enfermedad con la que el antígeno diana se asocia. Los ejemplos de antígenos diana (y sus enfermedades asociadas) a los que se puede dirigir un conjugado de anticuerpo-engarce-fármaco de la invención incluyen: Her2 (cáncer de mama), CD20 (linfomas), EGFR (tumores sólidos), CD22 (linfomas, incluyendo el linfoma de no Hodgkin), CD52 (leucemia linfocítica crónica), CD33 (leucemia mielógena aguda), CD4 (linfomas, enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide), CD30 (linfomas, incluyendo
- 15 linfoma de no Hodgkin), Muc18 (melanoma), integrinas (tumores sólidos), PSMA (cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna), CEA (cáncer colorrectal), CD11a (psoriasis), CD80 (psoriasis), CD23 (asma), CD40L (púrpura trombocitopénica inmune), CTLA4 (linfomas de linfocitos T) y BLys (enfermedades autoinmunes, incluyendo lupus eritematoso sistémico).

- 20 En aquellas realizaciones en las que el resto de reconocimiento es una proteína o un anticuerpo, la proteína se puede atar a una superficie o a un componente monocapa autoensamblado (SAM) o conectar a través de un brazo espaciador por cualquier residuo de péptido reactivo disponible en la superficie de los la proteína. En realizaciones preferidas, los grupos reactivos son aminas o carboxilatos. En realizaciones particularmente preferidas, los grupos reactivos son grupos ϵ -amina de residuos de lisina. Además, estas moléculas pueden ser adsorbidas sobre la superficie del sustrato o SAM por interacciones no específicas (por ejemplo, quimiosorción, fisisorción).

- 25 Los restos de reconocimiento que son anticuerpos se pueden usar para reconocer analitos que sean proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, sacáridos o pequeñas moléculas tales como fármacos, herbicidas, pesticidas, productos químicos industriales y agentes de guerra. Los procedimientos para producir anticuerpos para moléculas específicas son bien conocidos por los expertos en la materia. Véanse, las patentes de EE.UU. N° 5/147.786, concedida a Feng *et al.*, el 15 de septiembre de 1992; N° 5/334.528, concedida a Stanker *et al.* el 2 de agosto de 1994; N° 5/686.237, concedida a Al-Bayati, M.A.S, el 11 de noviembre de 1997 y N° 5/573.922, concedida a Hoess *et al.* el 12 de
- 30 noviembre de 1996. Los procedimientos para unir anticuerpos a superficies también son conocidos en la técnica. Véase, Delamarche *et al.* Langmuir 12:1944-1946 (1996).

- Los agentes de direccionamiento pueden estar unidos a los engarces de la invención por cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir a través de un grupo amino, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo.
- 35 Dicho grupo puede residir en un terminal peptídico o en un sitio interno a la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos pueden estar unidos a través de un grupo reactivo en una base (por ejemplo, amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible en un resto de azúcar (por ejemplo, 3'- o 5'-hidroxilo). Las cadenas de ácido nucleico y péptido se pueden derivatizar además en uno o más sitios para permitir la unión de los grupos reactivos apropiados sobre la cadena. Véase, Chrisey *et al.* Nucleic Acids Res. 24:3031-3039 (1996).

- 40 Cuando el péptido o el ácido nucleico es una molécula total o parcialmente sintética, se puede incorporar un grupo reactivo o un grupo reactivo enmascarado durante el procedimiento de síntesis. Los expertos en la materia conocen muchos monómeros derivatizados adecuados para la incorporación de grupos reactivos tanto en péptidos como en ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, "THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY", vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis", Gross, E. y Melenhofer, J., Eds, Academic Press, Nueva York (1980). Hay muchos
- 45 monómeros útiles disponibles en el mercado (Bachem, Sigma, etc.). Después, este grupo enmascarado se puede desenmascarar tras la síntesis, momento en el que pasa a estar disponible para la reacción con un componente de un compuesto de la invención.

- Los agentes de direccionamiento de ácido nucleico ejemplares incluyen aptámeros, compuestos antisentido y ácidos nucleicos que forman triples hélices. Típicamente, se utiliza un grupo hidroxilo de un residuo de azúcar, un grupo
- 50 amino de un residuo de base o un oxígeno fosfato del nucleótido como la funcionalidad química necesaria para acoplar el agente de direccionamiento basado en nucleótidos a la citotoxina. Sin embargo, cualquier experto en la técnica apreciará fácilmente que se pueden añadir otras funcionalidades reactivas "no naturales" a un ácido nucleico mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el grupo hidroxilo del resto de azúcar se puede convertir en un grupo mercapto o amino, usando técnicas bien conocidas en la materia.

- 55 Los aptámeros (o anticuerpo de ácido nucleico) son moléculas de ADN mono- o bicatenarias, o de ARN monocatenarias que se unen a dianas moleculares específicas. En general, los aptámeros funcionan mediante la inhibición de las acciones de la diana molecular, por ejemplo, proteínas, uniéndose a la mezcla de la diana que circula en sangre. Los aptámeros poseen funcionalidad química y, por tanto, pueden unirse covalentemente a citotoxinas, como se describe en la presente memoria.

Aunque hay una amplia variedad de dianas moleculares que son capaces de formar asociaciones no covalentes, pero específicas, con aptámeros, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas, metabolitos, cofactores, toxinas, fármacos basados en sacáridos, fármacos basados en nucleótidos y glucoproteínas, generalmente la diana molecular comprenderá una proteína o un péptido, incluyendo proteínas séricas, quininas, eicosanoides y moléculas de la superficie celular. Los ejemplos de aptámeros incluyen inhibidor de la antitrombina de Gilead GS 522 y sus derivados (Gilead Science, Foster City, California). Véase también, Macaya *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:3745-9 (1993); Bock *et al. Nature* (Londres) 355:564-566 (1992) y Wang *et al. Biochem.* 32:1899-904 (1993).

Los aptámeros específicos para una biomolécula dada se pueden identificar mediante técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Toole *et al* (1992) publicación PCT N° WO 92/14843; Tuerk y Gold (1991) Publicación PCT N° WO 91/19813; Weintraub y Hutchinson (1992) publicación PCT N° 92/05285, y Ellington y Szostak, *Nature* 346:818 (1990). En resumen, estas técnicas implican típicamente la formación de complejos de la diana molecular con una mezcla aleatoria de oligonucleótidos. El complejo de aptámero-diana molecular se separa de los oligonucleótidos no complejados. El aptámero se recupera del complejo separado y se amplifica. Se repite este ciclo para identificar aquellas secuencias de aptámero con la mayor afinidad por la diana molecular.

Para las enfermedades originadas por la expresión inapropiada de genes, la prevención específica o la reducción de la expresión de dichos genes representa una terapia ideal. En principio, se puede inhibir, reducir o desactivar la producción de un producto génico en particular mediante la hibridación de un desoxinucleótido monocatenario o ribodesoxinucleótido complementario a una secuencia accesible en el ARNm, o una secuencia dentro del transcripto que sea esencial para el procesamiento del ARNm previo, o a una secuencia dentro del propio gen. Este paradigma para el control genético a menudo se denomina inhibición antisentido o antigénica. Se confiere una eficacia adicional mediante la conjugación con el ácido nucleico de un agente de alquilación, tales como los de la presente invención.

Los compuestos antisentido son ácidos nucleicos diseñados para unirse y desactivar o evitar la producción del ARNm responsable de la generación de una proteína en particular. Los compuestos antisentido incluyen aligonucleótidos de ARN o ADN antisentido, mono o bicatenarios, o sus análogos, que puede hibridarse específicamente con especies de ARNm individuales y evitar la transcripción y/o el procesamiento del ARN de las especies de ARNm y/o la traducción del polipéptido codificado, reduciendo así la cantidad del respectivo polipéptido codificado. Ching *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:10006-10010 (1989); Broder *et al. Ann. Int. Med.* 113:604-618 (1990); Loreau *et al. FEBS Letters* 274:53-56 (1990); Holcenberg *et al.* WO91/11535; WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641, WO 91/13080, WO 91/06629, y EP 386563). Debido a su intensa sensibilidad y selectividad por la diana, los oligonucleótidos antisentido son útiles para la administración de agentes terapéuticos tales como citotoxinas de la invención a una diana molecular deseada.

Otros han informado que los ácidos nucleicos se pueden unir a dúplex de ADN mediante la formación de triple hélice e inhibir la transcripción y/o la síntesis de ADN. Los compuestos de triple hélice (también denominados fármacos de triple cadena) son oligonucleótidos que se unen a secuencias de ADN bicatenario y están destinados a inhibir selectivamente la transcripción de los genes causantes de enfermedades tales como los genes virales, por ejemplo, el VIH y el virus del herpes simple, y oncogenes, es decir, detienen la producción de proteínas en el núcleo de la célula. Estos fármacos se unen directamente al ADN bicatenario en el genoma de la célula para formar una triple hélice y evitar que la célula forme una proteína diana. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 92/10590, WO 92/09705, WO91/0662, y la patente de EE.UU. N° 5.176.996. Por lo tanto, las citotoxinas de la presente invención también se conjugan con secuencias de ácido nucleico que forman triples hélices.

La especificidad de sitio de los ácidos nucleicos (por ejemplo, compuestos antisentido y fármacos de triple hélice) no se ve afectada significativamente por la modificación del enlace de tipo fosfodiéster o por la modificación química del terminal de oligonucleótido. Por consiguiente, estos ácidos nucleicos se pueden modificar químicamente; mejorando la estabilidad global de la unión, aumentando la estabilidad con respecto a la degradación química, aumentando la velocidad a la que los oligonucleótidos son transportados en las células y confiriendo reactividad química a las moléculas. El enfoque general para la construcción de diversos ácidos nucleicos útiles en la terapia antisentido ha sido revisado por van der Krol *et al., Biotechniques* 6:958-976 (1988) y Stein *et al. Cancer Res.* 48:2659-2668 (1988). Por lo tanto, en una realización ejemplar, las citotoxinas de la invención se conjugan a un ácido nucleico mediante la modificación del enlace de tipo fosfodiéster.

Por otra parte, los aptámeros, los compuestos antisentido y los fármacos de triple hélice que portan las citotoxinas de la invención también puede incluir sustituciones, adiciones, deleciones o transposiciones de nucleótidos, siempre y cuando la hibridación específica a o la asociación con la secuencia diana relevante se mantenga como una propiedad funcional del oligonucleótido. Por ejemplo, algunas realizaciones emplearán análogos de fosforotioato que son más resistentes a la degradación por nucleasas que sus homólogos de fosfatodiéster de origen natural y, por lo tanto, se espera que tengan una mayor persistencia *in vivo* y una mayor potencia (véase, por ejemplo, Campbell *et al., J. Biochem. Biophys. Methods* 20:259-267 (1990)). También se sabe que los derivados de fosforamido de oligonucleótidos se unen a polinucleótidos complementarios y tienen la capacidad adicional de acomodar las especies de ligandos unidos covalentemente y serán susceptibles de ser sometidos a los procedimientos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Froehler *et al., Nucleic Acids Res.* 16 (11): 4831 (1988).

En algunas realizaciones, los aptámeros, los compuestos antisentido y los fármacos de triple hélice comprenderán O-metilribonucleótidos (publicación EP N° 360.609). También se pueden usar oligonucleótidos quiméricos (Dagle *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18: 4751 (1990)). Para algunas aplicaciones, los oligonucleótidos antisentido y de triple hélice pueden comprender ácidos nucleicos de poliamida (Nielsen *et al.*, *Science* 254: 1497 (1991) y publicación PCT N° WO 90/15065) u otros derivados catiónicos (Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470-4471 (1988)). Otras aplicaciones pueden utilizar oligonucleótidos en los que uno o más de los enlaces de tipo fosfodiéster se han sustituido con un grupo isostérico, tal como un enlace internucleosídico de 2-4 átomos de longitud según lo descrito en la publicación PCT N° WO 92/05186 y 91/06556, o un grupo formacetal (Matteucci *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7767-7768 (1991)) o un grupo amida (Nielsen *et al.*, *Science* 254: 1497-1500 (1991)).

Además, en la presente invención, se pueden emplear análogos de nucleótidos, por ejemplo, en los que el azúcar o la base están modificados químicamente. Las formas "análogas" de purinas y pirimidinas son aquellas conocidas en general en la técnica, muchas de las cuales se usan como agentes quimioterapéuticos. Una lista ejemplar pero no exhaustiva incluye 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), butoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina. Además, las bases convencionales por bases halogenadas. Por otra parte, la posición 2'-furanosa de la base puede tener una sustitución del grupo voluminoso no cargado. Los ejemplos de grupos voluminosos no cargados incluyen alquilo ramificados, azúcares y azúcares ramificados.

La modificación terminal también proporciona un procedimiento útil para conjugar las citotoxinas al ácido nucleico, modificar la especificidad de tipo celular, la farmacocinética, la permeabilidad nuclear y la velocidad de absorción absoluta de la célula para los agentes farmacéuticos de oligonucleótidos. Por ejemplo, se conoce una gran variedad de sustituciones en los extremos 5' y 3' para incluir grupos reactivos, lo que permite la unión covalente de las citotoxinas. Véase, por ejemplo, "OLIGODEOXYNUCLEOTIDES: ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION", (1989), Cohen, Ed., CRC Press; "PROSPECTS FOR ANTISENSE NUCLEIC ACID THERAPEUTICS FOR CANCER AND AIDS", (1991), Wickstrom, Ed, Wiley-Liss; "GENE REGULATION: BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA", (1992) Erickson y Izant, Eds, Raven Press; y "ANTISENSE RNA AND DNA" (1992), Murray, Ed., Wiley-Liss. Para los procedimientos generales relativos a compuestos antisentido, véase, "ANTISENSE RNA AND DNA", (1988), Melton D. A., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Marcadores detectables

El marcador o grupo detectable particular usado en combinación con los compuestos y procedimientos de la invención generalmente no es un aspecto crítico de la invención, siempre y cuando no interfiera significativamente en la actividad o la utilidad del compuesto de la invención. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables han tenido un gran desarrollo en el campo de los inmunoensayos y, en general, en la presente invención, se puede aplicar casi cualquier marcador útil en dichos procedimientos. Así pues, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros comúnmente usados en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente a un compuesto de la invención de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el compuesto, de los requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible y de las disposiciones relativas a la eliminación.

Cuando el compuesto de la invención se conjuga a un marcador detectable, el marcador es preferentemente un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en isótopos radiactivos, agentes fluorescentes, precursores de agentes fluorescentes, cromóforos, enzimas y combinaciones de los mismos. Los procedimientos para conjugar diversos grupos a los anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un marcador detectable que se conjuga frecuentemente a un anticuerpo es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa y glucosa oxidasa.

Los marcadores no radioactivos a menudo se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a un componente del conjugado. El ligando se une luego a otra

molécula (por ejemplo, estreptavidina), que bien es inherentemente detectable o está unida covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

Los componentes de los conjugados de la invención también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasa, esterasas y glucosidasas, u oxidotasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos sistemas de marcaje o productores de señales que se pueden usar, véase, la patente de EE.UU. N° 4.391.904.

Los medios de marcadores de detección son bien conocidos por los expertos en la materia. Así pues, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar mediante la excitación del fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y la detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente por medio de una película fotográfica, con el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Por lo tanto, en diversos ensayos de tira reactiva, el oro conjugado suele aparecer rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Actualmente, se prefieren los marcadores fluorescentes, pues tienen la ventaja de requerir pocas precauciones en cuanto a su manipulación, y de poderse someter a técnicas de visualización de alto rendimiento (análisis óptico incluyendo la digitalización de la imagen para el análisis en un sistema integrado que comprende un ordenador). Los marcadores preferidos se caracterizan típicamente por una o más de las siguientes características: alta sensibilidad, alta estabilidad, bajo fondo, baja sensibilidad ambiental y alta especificidad en el marcaje. Muchos marcadores fluorescentes son comercializados por las compañías química SIGMA (Saint Louis, MO), Molecular Probes (Eugene, O), R & D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem. Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por el experto. Además, los expertos en la materia reconocerán cómo seleccionar un fluoróforo apropiado para una aplicación en particular y, si no se encuentra fácilmente en el mercado, podrán sintetizar el fluoróforo necesario *de novo* o modificar sintéticamente compuestos fluorescentes disponibles en el mercado para obtener el marcador fluorescente deseado.

Además de los fluoróforos de molécula pequeña, en la presente invención, son útiles las proteínas fluorescentes naturales y los análogos diseñados mediante ingeniería genética de dichas proteínas. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas verdes fluorescentes de cnidarios (Ward *et al.*, *Photochem. Photobiol* 35:803-808 (1982); Levine *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B:77-85 (1982)), proteína amarilla fluorescente de la cepa *Vibrio fischeri* (Baldwin *et al.*, *Biochemistry* 29:5509-15 (1990)), peridinin-clorofila de la especie *Symbiodinium* de dinoflagelados (Morris *et al.*, *Plant Molecular Biology* 24:673:77 (1994)), ficobiliproteínas de cianobacterias marinas tales como *Synechococcus*, por ejemplo, ficoeritrina y ficocianina (Wilbank *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:1226-35 (1993)).

Generalmente, antes de formar el enlace entre la citotoxina y el agente de direccionamiento (u otro agente) y, opcionalmente, el grupo espaciador, se activará al menos una de las funcionalidades químicas. El experto en la materia apreciará que se puede activar una variedad de funcionalidades químicas, incluyendo grupos hidroxilo, amino y carboxi, usando una variedad de procedimientos y condiciones estándar. Por ejemplo, un grupo hidroxilo de la citotoxina o del agente de direccionamiento se puede activar mediante el tratamiento con fosgeno para formar el correspondiente cloroformiato o cloroformiato de *p*-nitrofenilo para formar el correspondiente carbonato.

En una realización ejemplar, la invención hace uso de un agente de direccionamiento que incluye una funcionalidad carboxilo. Los grupos carboxilo se pueden activar mediante, por ejemplo, la conversión en el correspondiente haluro de acilo o éster activo. Esta reacción se puede llevar a cabo en una variedad de condiciones como se ilustra en March, *supra* pág. 388-89. En una realización ejemplar, el haluro de acilo se prepara mediante la reacción del grupo que contiene carboxilo con cloruro de oxalilo. El agente activado se hace reaccionar con una citotoxina o una combinación de brazo de engarce-citotoxina para formar un conjugado de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que el uso de agentes de direccionamiento que contienen grupos carboxilo es meramente ilustrativo, y que se pueden conjugar agentes que tengan otros muchos grupos funcionales con los engarces de la invención.

Grupos funcionales reactivos

A título ilustrativo, la siguiente descripción se centra en la conjugación de una citotoxina de la invención con un agente de direccionamiento. El enfoque ejemplifica una realización de la invención a partir de la cual el experto en la materia podrá deducir fácilmente otras. El hecho de centrar la descripción en una sola realización no pretende limitar

la invención.

Los compuestos ejemplares de la invención llevan un grupo funcional reactivo que generalmente se encuentra en una cadena de alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido, permitiendo su fácil unión a otras especies. Una ubicación conveniente para el grupo reactivo es la posición terminal de la cadena.

- 5 Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. El grupo funcional reactivo puede estar protegido o no protegido, y la naturaleza protegida del grupo se puede cambiar mediante procedimientos conocidos en la técnica de la síntesis orgánica. Actualmente, las clases de reacciones favorecidas disponibles con análogos de citotoxina reactivos son aquellas que tienen lugar en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero sin limitación, las sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), las sustituciones de electrófilos (por ejemplo, reacciones de enamina) y las adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se describen, por ejemplo, en March, "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY", III Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, "MODIFICATION OF PROTEINS"; Advances in Chemistry Series, vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

- 10 Los tipos de reacciones ejemplares incluyen la reacción de los grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos, incluyendo ésteres de *N*-hidroxisuccinimida, ésteres de *N*-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de *p*-nitrofenilo, alquilo, alqueno, alquino y ésteres aromáticos. Los grupos hidroxilo se pueden convertir en ésteres, éteres, aldehídos, etc. Los grupos haloalquilo se convierten en nuevas especies por reacción con, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ión alcóxido. Los grupos dienófilo (por ejemplo, maleimida) participan en reacciones de Diels-Alder. Los grupos aldehído o cetona se pueden convertir en iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o la adición de alquil-litio. Los haluros de sulfonilo reaccionan fácilmente con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas. Los grupos amina o sulfhidrilo son, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados. Los alquenos se pueden convertir en una gran variedad de nuevas especies mediante cicloadición, acilación, adición de Michael, etc. Los epóxidos reaccionan fácilmente con aminas y compuestos de hidroxilo.

- 20 Un experto en la materia apreciará fácilmente que muchos de estos enlaces se pueden producir en una variedad de formas y con el uso de una variedad de condiciones. Para la preparación de ésteres, véase, por ejemplo, March *supra* en 1157; para tioésteres, véase March *supra* en 362-363, 491, 720-722, 829, 941 y 1172; para carbonatos, véase March *supra* en 346-347; para carbamatos, véase March *supra* en 1156-57; para amidas, véase March *supra* en 1152; para ureas y tioureas, véase March *supra* en 1174; para acetales y cetales, véase Greene *et al. supra* 178-210 y March *supra* en 1146; para los derivados de aciloxialquilo, véase "PRODRUGS: TOPICAL AND OCULAR DRUG DELIVERY", K. B. Sloan, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1992; para ésteres de enol, véase March *supra* en 1160; para *N*-sulfonilimidatos, véase Bundgaard *et al.*, *J. Med. Chem.*, 31:2066 (1988); para anhídridos, véase March *supra* en 355-56, 636-37, 990-91 y 1154; para *N*-acilamidas, véase March *supra* en 379; para las bases de *N*-Mannich, véase March *supra* en 800-02 y 828; para ésteres de hidroximetilcetona, véase Petrcek *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 507:353-54 (1987); para disulfuros, véase March *supra* en 1160; y para los ésteres de fosfonato y fosfonamidatos.

- 30 Los grupos funcionales reactivos pueden estar desprotegidos y seleccionarse de modo que no participen en, ni interfieran con, las reacciones. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger contra su participación en la reacción con la presencia de un grupo protector. Los expertos en la materia entenderán cómo proteger un grupo funcional en particular contra su interferencia con un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para obtener ejemplos de grupos protectores útiles, véase Greene *et al.*, "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS", John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Típicamente, el agente de direccionamiento se liga covalentemente a una citotoxina mediante técnicas químicas estándar a través de sus respectivas funcionalidades químicas. Opcionalmente, el engarce o el agente se acoplan al agente a través de uno o más grupos espaciadores. Los grupos espaciadores pueden ser equivalentes o diferentes cuando se usan en combinación.

- 40 Generalmente, antes de formar el enlace entre la citotoxina y el grupo funcional reactivo y, opcionalmente, el grupo espaciador, se activará al menos una de las funcionalidades químicas. El experto en la materia apreciará que se puede activar una variedad de funcionalidades químicas, incluyendo grupos hidroxilo, amino y carboxilo, mediante una variedad de procedimientos y condiciones estándar.

Formulaciones farmacéuticas y administración

- 55 La presente invención se refiere además a una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos descritos en la presente memoria que incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición o hidratos de las mismas, se pueden administrar a un paciente por una amplia diversidad de vías o

modos de administración. Las vías de administración adecuadas incluyen la administración por inhalación, transdérmica, oral, rectal, transmucosa, intestinal y parenteral, incluyendo las inyecciones intramusculares, subcutáneas e intravenosas. Preferentemente, los conjugados de la invención que comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo como resto de direccionamiento se administran parenteralmente, más preferentemente intravenosamente.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones “administrar” o “administración” pretenden incluir todos los medios para el suministro directo o indirecto de un compuesto a su sitio de acción deseado.

Los compuestos descritos en la presente memoria, o las sales farmacéuticamente aceptables y/o hidratos de los mismos, se pueden administrar individualmente, en combinación con otros compuestos de la invención y/o en cócteles combinados con otros agentes terapéuticos. Por supuesto, la elección de los agentes terapéuticos que se pueden administrar junto con los compuestos de la invención dependerá, en parte, de la afección que se vaya a tratar.

Por ejemplo, cuando se administran a pacientes que padecen un estado patológico causado por un organismo que depende de un autoinductor, los compuestos de la invención se pueden administrar en cócteles que contengan agentes usados para tratar el dolor, la infección, y otros síntomas y efectos secundarios comúnmente asociados con la enfermedad. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, analgésicos, antibióticos, etc.

Cuando se administran a un paciente sometido a un tratamiento contra el cáncer, los compuestos se pueden administrar en cócteles que contengan agentes contra el cáncer y/o agentes de potenciación suplementarios. Los compuestos también se pueden administrar en cócteles que contengan agentes para tratar los efectos secundarios de la radioterapia, tales como anti-eméticos, protectores de la radiación, etc.

Los agentes de potenciación suplementarios que se pueden administrar junto con los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, fármacos antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, imipramina, desimipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); fármacos antidepresivos no tricíclicos (por ejemplo, sertralina, trazodona y citalopram); antagonistas de Ca^{2+} (por ejemplo, verapamil, nifedipina, nitrendipina y caroverina); amfotericina; análogos de triparanol (por ejemplo, tamoxifeno); fármacos antiarrítmicos (por ejemplo, quinidina); fármacos antihipertensivos (por ejemplo, reserpina); reductores tiol (por ejemplo, butionina y sulfoximina) y leucovorin cálcico.

El/los compuesto/s activo/s de la invención se administra/n *per se* o en forma de una composición farmacéutica en la que el/los compuesto/s activo/s está/n mezclado/s con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención están típicamente formuladas de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y productos auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración seleccionada.

Para una administración transmucosa, en la formulación, se usan penetradores apropiados para la barrera que se vaya a permear. Dichos penetradores son generalmente conocidos en la técnica.

Para una administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el/los compuesto/s activo/s con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos hacen posible que los compuestos de la invención sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas pastosas y suspensiones, para ingestión oral por un paciente que se vaya a tratar. Si se desean obtener comprimidos o núcleos de grageas, se pueden obtener preparaciones farmacéuticas para un uso oral con excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y tratando la mezcla de gránulos, después de la adición de los productos auxiliares adecuados. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes de desintegración tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

Los núcleos de grageas se suministran con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas y disolventes orgánicos o mezclas disolventes adecuadas. Pueden agregarse colorantes y pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas adaptables hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas adaptables pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tal como talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados tales como

aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para una administración oral deberían estar en dosis adecuadas para dicha administración.

Para una administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

- 5 Para una administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran de manera conveniente en forma de una presentación de pulverizado en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar disponiendo una válvula para suministrar una cantidad medida.
- 10 Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- Los compuestos se pueden formular para una administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. La inyección es un procedimiento preferido de administración para las composiciones de la presente invención. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante agregado. Las composiciones
- 15 pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización, y/o se pueden añadir agentes de dispersión tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

- 20 Las formulaciones farmacéuticas para una administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también
- 25 puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos con el fin de permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico.

- 30 Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, las que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 35 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de larga actuación se pueden administrar mediante implantación o administración transcutánea (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente), inyección intramuscular o parche transdérmico. Así pues, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como
- 40 derivados poco solubles, por ejemplo, sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes en fase gel o sólida adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

- 45 Una composición farmacéutica preferida es una composición formulada para inyección tal como inyección intravenosa, e incluye aproximadamente del 0,01% a aproximadamente el 100% en peso del conjugado de fármaco-ligando en base al 100% en peso de la composición farmacéutica total. El conjugado de fármaco-ligando puede ser un conjugado de anticuerpo-citotoxina, en el que el anticuerpo se haya seleccionado para dirigirse a un determinado cáncer.

Bibliotecas

- 50 También se encuentran dentro del alcance de la presente invención las bibliotecas de los conjugados de citotoxina, citotoxina-engarce y agente-engarce de las citotoxinas y los engarces de la invención. Las bibliotecas ejemplares incluyen al menos 10 compuestos, más preferentemente al menos 100 compuestos, incluso más preferentemente al menos 1.000 compuestos y aún más preferentemente al menos 100.000 compuestos. Las bibliotecas están en una forma que se consulta fácilmente en cuanto a una propiedad en particular, por ejemplo, citotoxicidad, escisión de un
- 55 engarce por una enzima u otro reactivo de escisión. Las formas ejemplares incluyen formatos de chip, micromatrices.

La síntesis en paralelo o combinatoria tiene como objetivo principal la generación de una biblioteca de diversas moléculas que comparten una característica en común, denominada en la presente descripción armazón. Mediante la sustitución de diferentes restos en cada una de las partes variables de la molécula armazón, crece la cantidad de espacio explorable en una biblioteca. Varias teorías y la química médica moderna defienden el concepto de espacio ocupado como un factor clave para determinar la eficacia de un compuesto dado contra una diana biológica dada. Mediante la creación de una biblioteca diversa de moléculas, que explora un gran porcentaje del espacio diana, las probabilidades de desarrollar un compuesto principal altamente eficaz aumentan enormemente.

La síntesis en paralelo se lleva a cabo generalmente en un soporte de fase sólida, tal como una resina polimérica. El armazón u otro producto intermedio adecuado están atado de manera escindible a la resina por un engarce químico. Se llevan a cabo reacciones para modificar el armazón cuando está atado a la partícula. Las variaciones en los reactivos y/o en las condiciones de reacción producen la diversidad estructural, que es el sello distintivo de cada biblioteca.

La síntesis en paralelo de moléculas "pequeñas" (no oligómeros con un peso molecular de 200-1.000) apenas se intentó antes de 1990. Véase, por ejemplo, Camps, *et al.*, *Annals de Química*, 70: 848 (1990). Recientemente, Ellmann ha divulgado la síntesis en paralelo (también denominada "combinatoria") soportada en fase sólida de once análogos de benzodiazepina junto con algunas prostaglandinas y beta-miméticos de giro. Estas divulgaciones se ejemplifican en la patente de EE.UU. Nº 5.288.514. Otra divulgación relevante de la síntesis en paralelo de moléculas pequeñas se puede encontrar en la patente de EE.UU. Nº 5.324.483. Esta patente divulga la síntesis en paralelo de entre 4 y 40 compuestos en cada uno de dieciséis armazones diferentes. Chen *et al* también han aplicado estrategias sintéticas orgánicas para desarrollar bibliotecas no peptídicas sintetizadas mediante procedimientos de múltiples etapas sobre un soporte polimérico. (Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 2661-2662 (1994)).

Una vez preparada una biblioteca de compuestos únicos, la preparación de una biblioteca de inmunoconjugados o anticuerpos se puede realizar usando la biblioteca de autoinductores como punto de partida y los procedimientos descritos en la presente memoria.

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que contienen uno o más de los compuestos o las composiciones de la invención y las instrucciones para el uso del compuesto o la composición. En una realización ejemplar, la invención proporciona un kit para conjugar un brazo de engarce de la invención con otra molécula. El kit incluye el engarce y las instrucciones para unir el engarce a un determinado grupo funcional. El kit también puede incluir uno o más de un fármaco citotóxico, un agente de direccionamiento, un marcador detectable, sales farmacéuticas o tampones. El kit también puede incluir un recipiente y, opcionalmente, uno o más viales, tubos de ensayo, matraces, botellas o jeringas. Otros formatos para los kits serán evidentes para los expertos en la materia y pertenecen al alcance de la presente invención.

Purificación

En otra realización ejemplar, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar una diana molecular para un ligando-citotoxina de la invención, que se une al ligando X⁴. El procedimiento comprende preferentemente poner en contacto una preparación celular que incluya la diana con un compuesto inmovilizado, formando de este modo un complejo entre el receptor y el compuesto inmovilizado.

La citotoxina de la invención se puede inmovilizar en un soporte de afinidad mediante cualquier medio reconocido en la técnica. Como alternativa, la citotoxina se puede inmovilizar mediante uno o más de los engarces de la invención.

En otra realización ejemplar más, la invención proporciona una matriz de purificación por afinidad que incluye un engarce de la invención.

El procedimiento de la invención para el aislamiento de una diana utilizará típicamente una o más técnicas de cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad permite el aislamiento eficaz de especies tales como moléculas biológicas o biopolímeros mediante la utilización de sus sitios de reconocimiento para ciertas estructuras químicas soportadas con un alto grado de selectividad. La bibliografía está repleta de artículos, monografías y libros sobre el tema de la cromatografía de afinidad, incluyendo temas tales como los soportes para la cromatografía de afinidad, miembros de reticulación, ligandos, y su preparación y uso. Una muestra de esas referencias incluye: Ostrove, *Methods Enzymol* 182: 357-71 (1990); Ferment, Bioeng. 70: 199-209 (1990). Huang *et al.*, *J. Chromatogr.* 184: 492: 431-69 (1989); "purification of enzymes by heparin-Sepharose affinity chromatography", *J Chromatogr.* 184: 335-45 (1980); Farooqi, *Enzyme Eng*, 4: 441-2 (1978); Nishikawa, *Chem. Technol.*, 5(9): 564-71 (1975); Guilford *et al.*, en, PRACT. HIGH PERFORM. LIQ. CHROMATOGR., Simpson (ed.), 193-206 (1976); Nishikawa, *Proc. Int. Workshop Technol. Protein Sep. Improv.* "Blood Plasma Fractionation", Sandberg (ed.), 422-35; (1977) "Affinity chromatography of enzymes", *Affinity Chromatogr.*, Proc. Int. Symp. 25-38, (1977) (Pub. 1978); y "AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A PRACTICAL APPROACH, Dean *et al.* (ed.), IRL Press Limited, Oxford, Inglaterra (1985). Los expertos en la materia tienen una amplia orientación en el desarrollo de determinados procedimientos de cromatografía de afinidad utilizando los materiales de la invención.

En el presente procedimiento, los medios cromatográficos de afinidad de las diferentes estructuras químicas se pueden usar como soportes. Por ejemplo, los geles de agarosa y los geles de agarosa reticulada son útiles como materiales de apoyo, porque su hidrofiliadad les hace relativamente libres de unión inespecífica. Otros soportes útiles incluyen, por ejemplo, perlas de vidrio de poro controlado (CPG), partículas de celulosa, perlas de gel de poliacrilamida y perlas de gel SephadexTM hechas de dextrano y epíclorhidrina.

Uso del conjugado de fármaco-ligando

Además de las composiciones y las construcciones descritas anteriormente, la presente invención también proporciona una serie de usos de los compuestos y los conjugados de la invención. Los usos del conjugado de fármaco-ligando de la presente invención incluyen: la destrucción o inhibición del crecimiento o la replicación de una célula tumoral o célula cancerosa, el tratamiento del cáncer, el tratamiento de una afección precancerosa, la destrucción o inhibición del crecimiento o la replicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, el tratamiento de una enfermedad autoinmune, el tratamiento de una enfermedad infecciosa, la prevención de la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, la prevención del cáncer, la prevención de la multiplicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, la prevención de una enfermedad autoinmune y la prevención de una enfermedad infecciosa. Estos usos comprenden administrar a un animal tal como un mamífero o un ser humano en necesidad de ello una cantidad eficaz de un conjugado de fármaco-ligando. Los ligandos preferidos para muchos de los usos descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se dirigen a una determinada célula tumoral, célula cancerosa u otra zona diana.

El complejo de fármaco-ligando de la presente invención es útil para tratar el cáncer, la enfermedad autoinmune y la enfermedad infecciosa en un animal. Se proporcionan composiciones y usos para el tratamiento de tumores mediante la administración a un sujeto de la composición, de una manera farmacéuticamente aceptable, con una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición de la presente invención.

La presente invención es particularmente útil para el tratamiento del cáncer y para la inhibición de la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa en un animal. El cáncer o una afección precancerosa, incluyendo un tumor, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular descontrolado, se pueden tratar o prevenir mediante la administración del complejo de fármaco-ligando de la presente invención. El complejo administra el fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. En una realización, el ligando se une específicamente a o se asocia con un antígeno asociado a una célula cancerosa o célula tumoral. Debido a su estrecha proximidad con el ligando, el fármaco se puede tomar en el interior de una célula tumoral o célula cancerosa a través de, por ejemplo, endocitosis mediada por el receptor. El antígeno puede estar unido a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o la célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, el engarce se hidrolíticamente escindido por una proteasa asociada a la célula tumoral o célula cancerosa, liberando de este modo el fármaco. El fármaco liberado es entonces libre para difundirse e inducir actividades citotóxicas. En una realización alternativa, el fármaco se escinde del complejo de fármaco-ligando fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y posteriormente penetra en la célula.

El ligando se puede unir, por ejemplo, a una célula tumoral o célula cancerosa, un antígeno de célula tumoral o de célula cancerosa que se encuentre en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa, o un antígeno de célula tumoral o de célula cancerosa que sea una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o la célula cancerosa. El ligando puede ser diseñado específicamente para un tipo de célula tumoral o célula cancerosa en particular. Por lo tanto, el tipo de tumores o cánceres que se pueden tratar eficazmente puede verse alterado por la elección del ligando.

Los ejemplos representativos de las afecciones precancerosas que se pueden tratar mediante el conjugado de fármaco-ligando incluyen: metaplasia, hiperplasia, displasia, pólipos colorrectales, queratosis actínica, queratitis actínica, virus del papiloma humano, leucoplaquia, líquen plano y la enfermedad de Bowen.

Los ejemplos representativos de cánceres o tumores que se pueden tratar mediante el conjugado de fármaco-ligando incluyen: cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, linfoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer del SNC, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de cuello uterino y leucemias. Será muy evidente para el experto en la materia que el ligando de direccionamiento usado en particular en el conjugado se puede seleccionar de modo que dirija el fármaco hacia el tejido del tumor que se vaya a tratar con el fármaco (es decir, se selecciona un agente de direccionamiento específico de un antígeno específico del tumor). Los ejemplos de dichos ligandos de direccionamiento son bien conocidos en la técnica, incluyendo anti-Her2 para el tratamiento del cáncer de mama, anti-CD20 para el tratamiento del linfoma, anti-PSMA para el tratamiento del cáncer de próstata y anti-CD30 para el tratamiento de los linfomas, incluyendo el linfoma de no Hodgkin.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para matar una célula. El compuesto se administra a la célula en una cantidad suficiente para matar a dicha célula. En una realización ejemplar, el compuesto se administra a un sujeto que porta la célula. En otra realización ejemplar más, la administración sirve para retardar o detener el crecimiento de un tumor que incluye la célula (por ejemplo, la célula puede ser una célula tumoral). Para la administración para retardar el crecimiento, la tasa de crecimiento de la célula debe ser al menos

un 10% inferior a la tasa de crecimiento antes de la administración. Preferentemente, la tasa de crecimiento se retrasará al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o se detendrá por completo.

Dosis eficaces

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen composiciones en las que el principio activo está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para lograr su fin deseado. La cantidad eficaz real para una aplicación en particular dependerá, entre otros factores, de la afección que se esté tratando. La determinación de una cantidad eficaz es competencia de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada en la presente memoria.

10 Para cualquier compuesto descrito en la presente memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de ensayos de cultivo de células. Las concentraciones en plasma diana serán aquellas concentraciones del/de los compuesto/s activo/s que sean capaces de inhibir el crecimiento o la división celular. En realizaciones preferidas, la actividad celular se inhibe en al menos un 25%. Las concentraciones en plasma diana del/de los compuesto/s activo/s que son capaces de inducir al menos aproximadamente un 50%, 75% o incluso 90% o más de inhibición de la actividad celular son las que se prefieren actualmente. Se puede controlar el porcentaje de inhibición de la actividad celular en el paciente con el fin de comprobar la idoneidad de la concentración de fármaco en plasma alcanzada, y la dosis se puede ajustar creciente o decrecientemente para lograr el porcentaje de inhibición deseado.

20 Como es bien conocido en la técnica, las cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en seres humanos también se pueden determinar a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos que permita alcanzar una concentración en circulación que se haya encontrado eficaz en animales. La dosis en seres humanos se puede ajustar mediante la monitorización de la inhibición celular y ajustando la dosis creciente o decrecientemente como se ha descrito anteriormente.

25 Una dosis terapéuticamente eficaz también se puede determinar a partir de datos de seres humanos para compuestos que se sabe que muestran actividades farmacológicas similares. La dosis aplicada se puede ajustar en base a la biodisponibilidad y la potencia relativa del compuesto administrado, en comparación con el compuesto conocido.

El ajuste de la dosis para alcanzar la máxima eficacia en seres humanos en base a los procedimientos descritos anteriormente y a otros procedimientos bien conocidos en la técnica es competencia del experto habitual en la técnica.

30 En el caso de la administración local, la concentración circulante sistémica del compuesto administrado no será de especial importancia. En dichos casos, el compuesto se administra con el fin de alcanzar una concentración en el área local eficaz para alcanzar el resultado deseado.

35 Para un uso profiláctico y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con una proliferación celular anormal, se prefiere una concentración circulante del compuesto administrado de aproximadamente 0,001 μM a 20 μM , prefiriéndose de aproximadamente 0,01 μM a 5 μM .

40 Las dosis para los pacientes para una administración oral de los compuestos descritos en la presente memoria, varían típicamente de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 10.000 mg/día, más típicamente de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 1.000 mg/día, y lo más típicamente de aproximadamente 50 mg/día a aproximadamente 500 mg/día. Expresado en términos de peso corporal del paciente, las dosis típicas varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150 mg/kg/día, más típicamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg/día, y lo más típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día o 3 mg/kg/día.

45 En al menos algunas realizaciones, las dosis para pacientes que retardan o inhiben el crecimiento de tumores pueden ser de 1 $\mu\text{l/kg/día}$ o inferiores. Por ejemplo, las dosis para pacientes pueden ser de 0,9, 0,6, 0,5, 0,45, 0,3, 0,2, 0,15 o 0,1 $\mu\text{mol/kg/día}$ o inferiores (referidas a moles del fármaco). Preferentemente, el conjugado de anticuerpo-fármaco retarda el crecimiento del tumor cuando se administra en la cantidad de dosis diaria durante un período de al menos cinco días. El tumor es un tumor de tipo humano de un ratón SCID. Como ejemplo, el ratón SCID puede ser un ratón CB17.SCID (disponible en Taconic, Germantown, NY).

50 Para otros modos de administración, la cantidad y el intervalo de dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica particular que se esté tratando. Por ejemplo, en una realización, se puede administrar un compuesto de acuerdo con la invención a concentraciones relativamente altas múltiples veces al día. Como alternativa, puede ser más deseable administrar un compuesto de la invención a concentraciones eficaces mínimas y usar un régimen de administración menos frecuente. Esto proporcionará un régimen terapéutico proporcional a la gravedad de la enfermedad de cada individuo.

55

Usando los preceptos proporcionados en la presente memoria, se puede planificar una pauta de tratamiento terapéutico eficaz que no cause toxicidad sustancial y que, sin embargo, sea totalmente eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por el paciente en particular. Esta planificación debería implicar la cuidadosa elección del compuesto activo considerando factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y la gravedad de efectos secundarios adversos, el modo preferido de administración y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

Los compuestos, las composiciones y los procedimientos de la presente invención se ilustran además mediante los ejemplos que se presentan a continuación. Estos ejemplos se ofrecen con el fin de ilustrar la invención reivindicada.

Ejemplos

Material y procedimientos

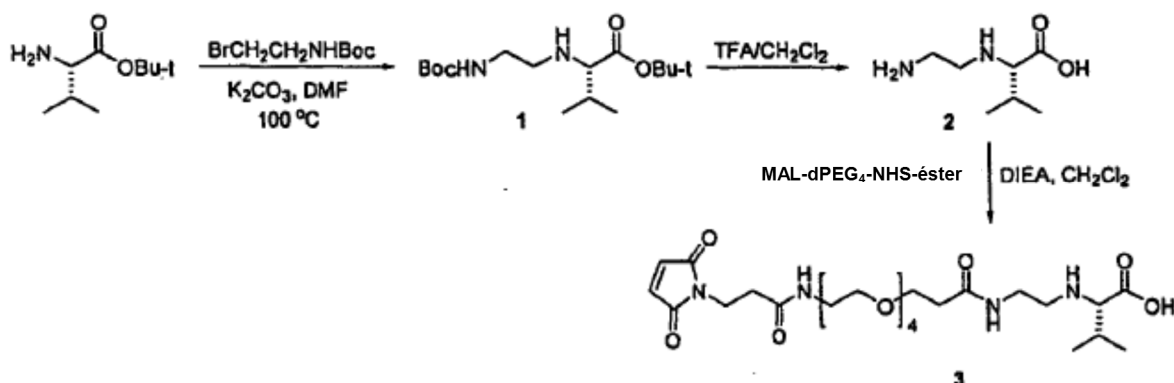
En los ejemplos que figuran a continuación, a menos que se indique lo contrario, las temperaturas están expresadas en grados Celsius (°C); las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (típicamente a un intervalo de aproximadamente 18-25°C); la evaporación del disolvente se llevó a cabo usando un evaporador rotatorio bajo presión reducida (típicamente, 0,60-3,4 kPa) con una temperatura del baño de hasta 60 °C; el transcurso de las reacciones se siguió típicamente mediante TLC y los tiempos de reacción se proporcionan únicamente con fines ilustrativos; los puntos de fusión están sin corregir; los productos mostraron datos de RMN de ^1H y/o microanalíticos satisfactorios; los rendimientos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos; y además se usaron las siguientes abreviaturas convencionales: p.f. (punto de fusión), l (litro/s), ml (mililitro/s), mmol ((milimol/es), g (gramo/s), mg (miligramo/s), min (minuto/s), CL-EM (cromatografía líquida-espectrometría de masa) y h (hora/s).

Los espectros de RMN de ^1H se midieron en un espectrómetro Varian Mercury de 300 MHz y coincidieron con las estructuras asignadas. Los desplazamientos químicos se presentaron en partes por millón (ppm) con excitación atenuada a partir de tetrametilsilano. Los espectros de masa por electronebulización se registraron en un espectrómetro de masas Perkin Elmer Sciex API 365. Los análisis elementales fueron realizados por Robertson Microlit Laboratories, Madison, NJ. El gel de sílice para la cromatografía ultrarrápida fue de Merck grado E (malla 230-400). La HPLC analítica de fase inversa se llevó a cabo bien en un instrumento HP 1100 o Varian ProStar 210 con una columna Phenomenex Lunar de 5 μm C-18(2) de 150 mm x 4,6 mm o una columna Varian Microsorb-MV de 0,1 μm C-18 de 150 mm x 4,6 mm. El caudal de 1 ml/min fue bien con un gradiente del 0% al 50% de tampón B durante 15 minutos o del 10% al 100% de tampón B durante 10 minutos, con detección mediante UV a 254 nm. Tampón A: formiato de amonio 20 mM + acetonitrilo al 20% o ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo; tampón B: formiato de amonio 20 mM + acetonitrilo al 80% o ácido trifluoroacético acuoso al 0,1%. La HPLC preparativa de fase inversa se realizó en un instrumento Varian ProStar 215 con una columna Delta Park de 1 μm C-18 de 300 mm x 7,8 mm.

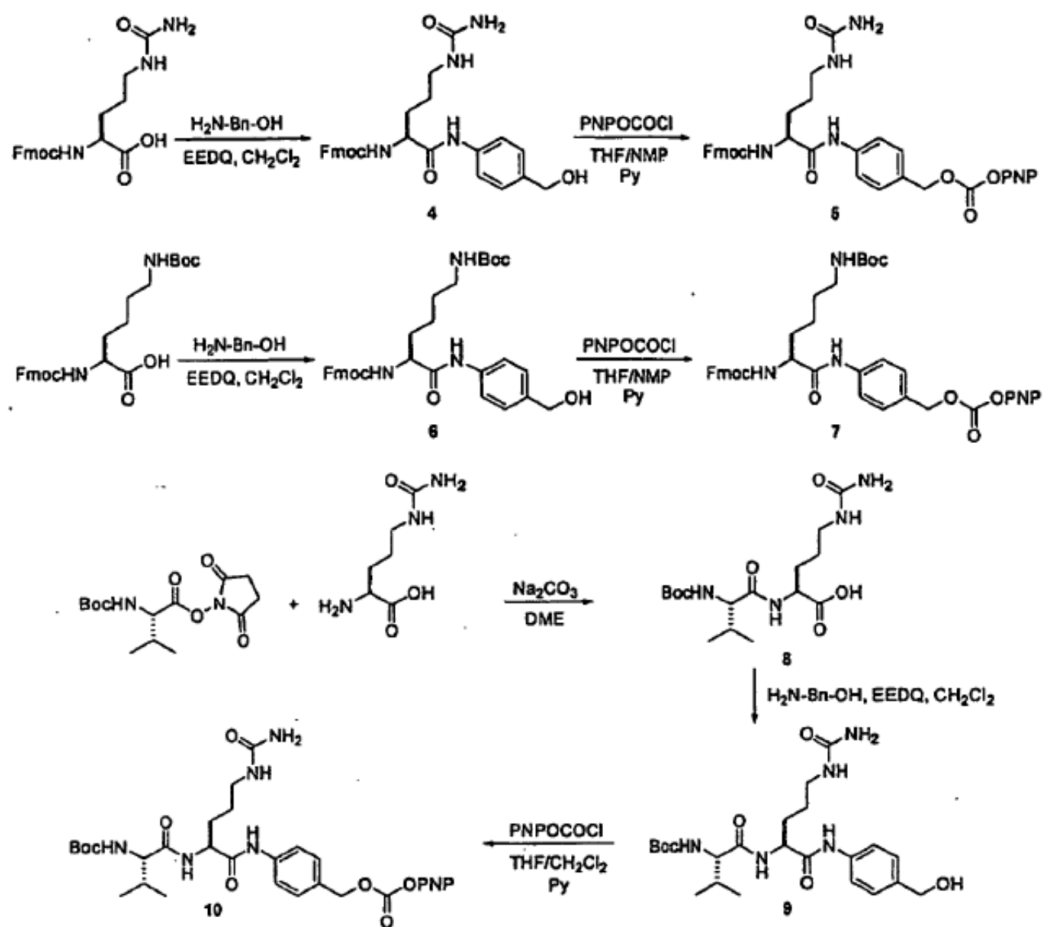
Ejemplo 1: Síntesis de los conjugados de engarces peptídicos

1.1a Metodología de la síntesis

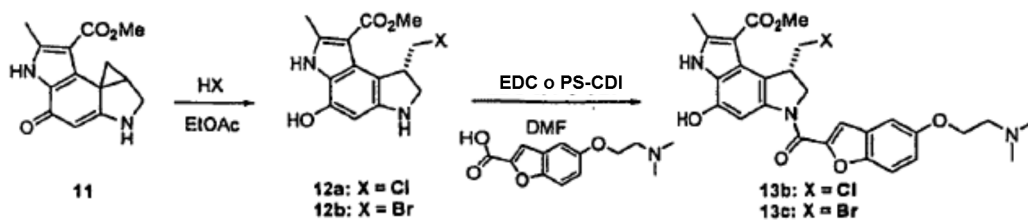
Esquema 1



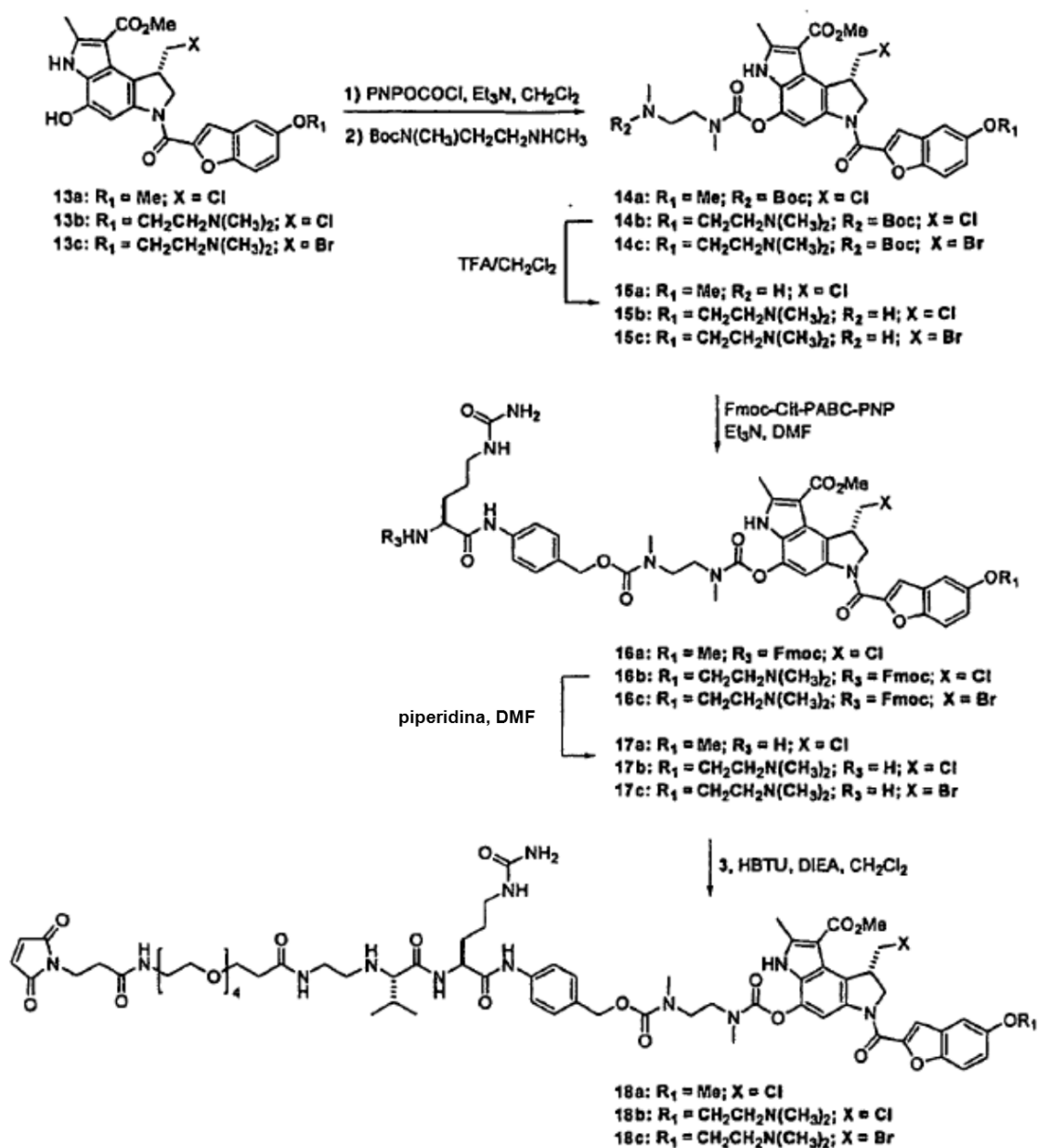
Esquema 2



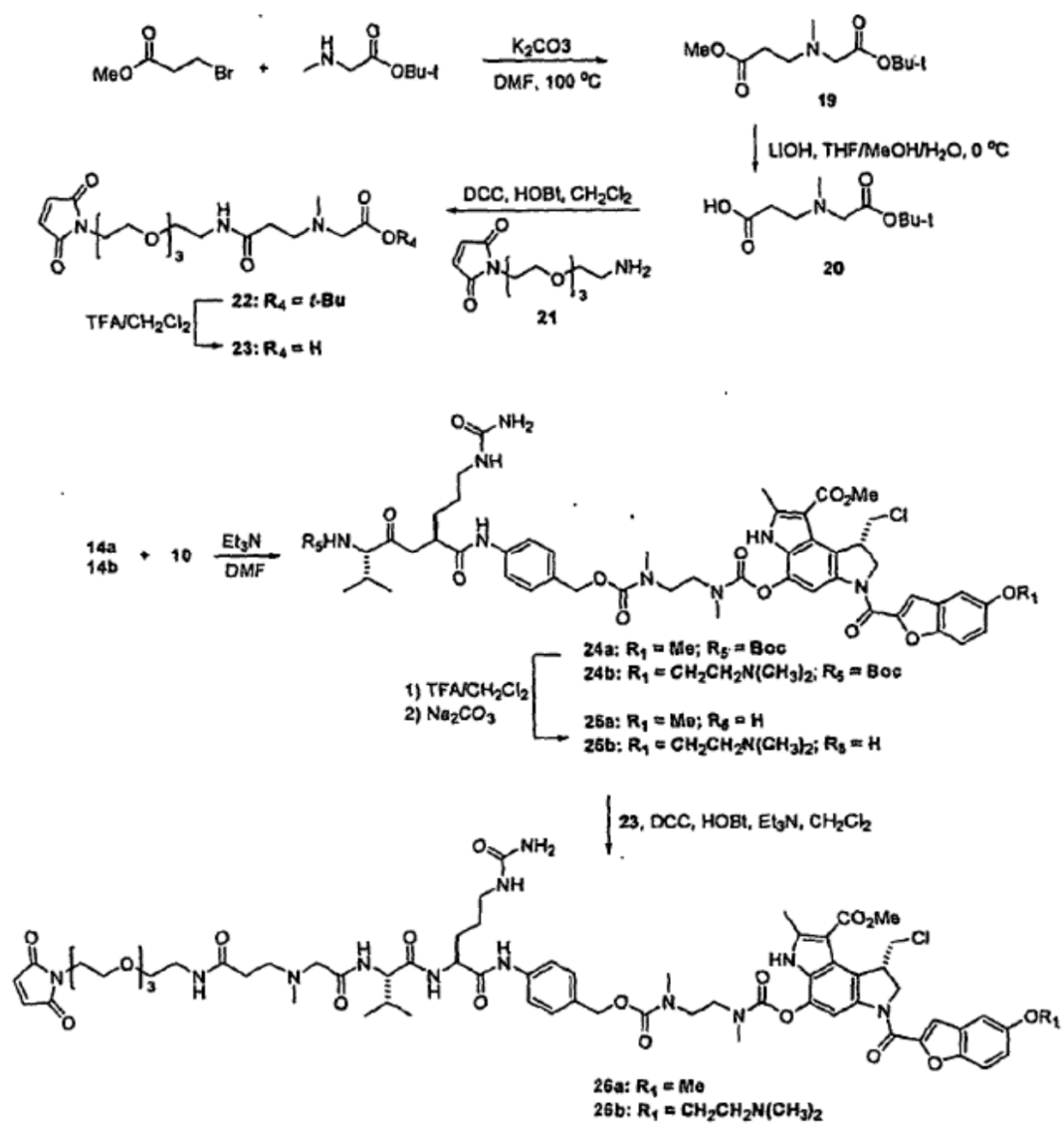
Esquema 3



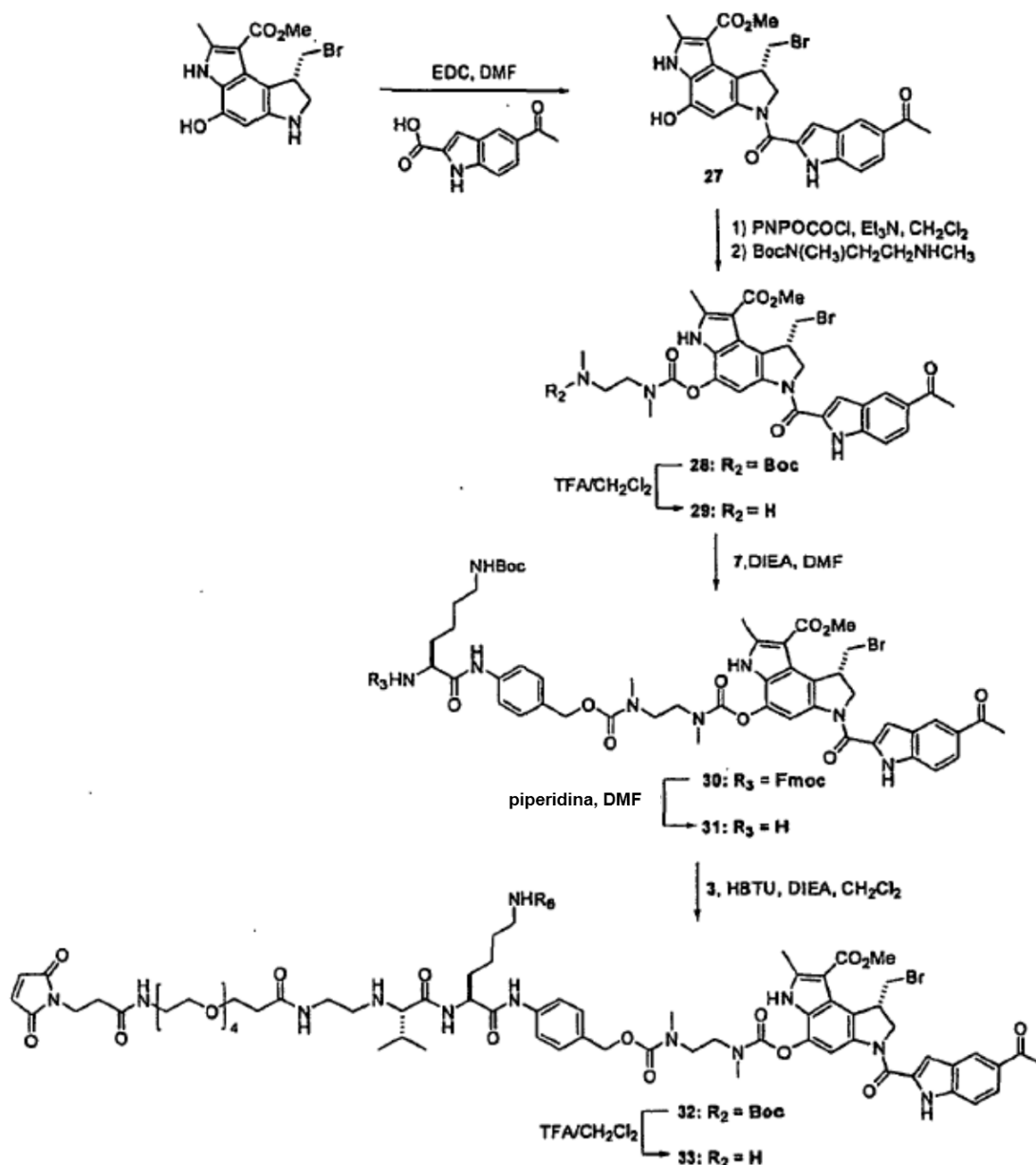
Esquema 4



Esquema 5



Esquema 6



1.1b Síntesis del Compuesto 1: *terc*-Butiléster de *N*-[2'-(*N*'-terc-butoxicarbonil-amino)etil]-valina. A una solución de bromuro de 2-(*N*-terc-butoxicarbonil-amino)-etilo (1 g, 4,5 mmol) y *terc*-butiléster de valina (0,936 g, 4,5 mmol) en DMF (10 ml), se añadió carbonato de potasio (1,85 g, 13,5 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a 100 °C durante una noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (3/7) como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite (0,16 g, 12%). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 0,94 (ft, 6H), 1,44 (s, 9H), 1,473 y 1,475 (2s, 9H), 1,88 (m, 1H), 2,51 (m, 1H), 2,78 (m, 2H), 3,11 (m, 1H), 3,22 (m, 1H), 3,39 y 4,13 (2 t.a., 1H), 5,00 (s.a., 1H) ppm; CL-EM (IEN) 205 (M+H⁺-112), 261 (M+H⁺-Bu), 317 (M+H⁺).

1.1c Síntesis del Compuesto 2: *N*-(2-Aminoetil)-valina. Se disolvió el Compuesto 1 (137 mg, 0,43 mmol) en una solución de TFA/diclorometano (2 ml, 1/1) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 30 min. Se concentró la mezcla de reacción hasta la sequedad, dando el compuesto del título en forma de un aceite (0,18 g, 95%) RMN de ¹H (CD₃OD) δ 1,07 y 1,16 (2d, 6H), 2,35 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 3,38 (m, 4H) ppm; CL-EM (IEN) 217 (M+H⁺).

1.1d Síntesis del Compuesto 3: A una solución de maleamida-dPEG₄-NHS-éster (61 mg, 0,16 mmol) en diclorometano (2 ml), se añadieron gota a gota Compuesto 2 (80,7 mg, 0,16 mmol) y diisopropiletilamina (55,5 µl,

0,32 mmol) en diclorometano (1 ml). Se agitó la mezcla así obtenida durante una noche. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano, seguido de metanol al 5% en diclorometano y, finalmente, metanol al 100% como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (87 mg, 97%). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 1,08 (dd, 6H), 2,25 (m, 1H), 2,49 (t, 2H), 2,52 (t, 2H), 3,10-3,79 (m, 25H), 6,82 (s, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 559 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1e Síntesis del Compuesto 4: Fmoc-Cit-PABOH. A una solución de Fmoc-Cit-OH (1,0 g, 2,52 mmol) y alcohol 4-aminobencílico (341 mg, 2,77 mmol) en diclorometano (10 ml) y metanol (5 ml), se añadió 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina[EEDQ] (1,24 g, 5,04 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla en la oscuridad durante 16 horas. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio, y se trituró el sólido blanco con éter (100 ml). Se sometió la suspensión resultante a sonicación durante 5 min y luego se dejó reposar durante 30 min. Se recogió el sólido blanco por filtración, se lavó con éter y se secó al vacío (1,23 g, 97%). RMN de ^1H (DMSO) δ 1,32 a 1,52 (m, 2H), 1,52 a 1,74 (dm, 2H), 2,86 a 3,06 (dm, 2H), 4,1 (m, 1H), 4,42 (d, 2H), 5,07 (t, 1H), 5,40 s.a., 2H), 5,97 (t, 1H), 7,19 a 7,95 (m, 12H), 8,10 (d, 1H), 9,97 (s, 1H) ppm; CL-EM (IEN) 503,1 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1f Síntesis del Compuesto 5: Fmoc-Cit-PABC-PNP. A una solución del Compuesto 4 (309 mg, 0,62 mmol) y *p*-nitrofenilclorofornato (372 mg, 1,85 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) y 1-metil-2-pirrolidina (1 ml), se añadió piridina (100 μl , 1,23 mmol) en una porción. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano, seguido de metanol al 3% en diclorometano y, finalmente, metanol al 10% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (97,9 mg, 70%). CL-EM (IEN) 668 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1g Síntesis del Compuesto 6: Fmoc-Lys(Boc)-PABOH. El Compuesto 6 se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 4 en un rendimiento del 98%. RMN de ^1H (DMSO) δ 1,40 (s, 9H), 1,38 (m, 2H), 1,50 a 1,74 (dm, 2H), 3,04 (t, 2H), 3,30 (c, 3H), 4,19 a 4,31 (m, 2H), 4,41 (d, 2H), 4,55 (s, 2H), 7,28 a 7,68 (m, 12H), 8,00 (d, 1H) ppm; CL-EM (IEN) 574 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1h Síntesis del Compuesto 7: Fmoc-Lys(Boc)-PABC-PNP. El Compuesto 7 se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 5 en un rendimiento del 70%. RMN de ^1H (CD_3Cl) δ 1,44 (s, 9H), 1,49-1,60 (m, 6H), 1,73 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 3,11 (m, 1H), 3,20 (s.a., 1H), 4,23 (m, 2H), 4,46 (s.a., 2H), 4,67 (s.a., 1H), 5,56 (s.a., 1H), 7,28 (m, 2H), 7,36-7,41 (m, 6H), 7,59 (m, 4H), 7,76 (d, 2H), 8,26 (dd, 2H), 8,45 (s.a., 1H) ppm; CL-EM (IEN) 639 ($\text{M}+\text{H}^+$ -Boc), 684 ($\text{M}+\text{H}^+$ -Bu), 739 ($\text{M}+\text{H}^+$), 778 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1i Síntesis del Compuesto 8: Boc-Val-Cit-OH. A una solución de Citrulina (2,54 g, 14,50 mmol) y bicarbonato de sodio (1,28 g) en agua (40 ml), se añadió Boc-Val-OSu (4,34 g, 13,81 mmol) disuelto en dimetoxietano (DME). Para mejorar la solubilidad de la mezcla, se añadió tetrahidrofurano (10 ml). Se dejó agitando la mezcla así obtenida durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió ácido cítrico acuoso (15%, 75 ml) y se extrajo la mezcla con 2-propanol al 10%/acetato de etilo (2 x 100 ml). Se lavó la capa orgánica con salmuera (2 x 150 ml) y se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio. Se secó el sólido blanco resultante al vacío durante 5 horas y luego se trató con éter (100 ml). Tras una breve sonicación y valoración, se recogió el producto sólido blanco por filtración (1,39 g, 27%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 0,91 (dd, 3H), 0,98 (dd, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,70 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 2,02 (m, 2H), 3,11 (t, 2H), 3,89 (t, 1H), 4,39 (c, 1H), 8,22 (d, 1H) ppm; CL-EM (IEN) 375 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1j Síntesis del Compuesto 9: Boc-Val-Cit-PABOH. El Compuesto 9 se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 4 en un rendimiento del 71%. RMN de ^1H (CD_3OD) δ 0,93 y 0,97 (2d, 6H), 1,44 (s, 9H), 1,58 (m, 2H), 1,75 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 3,19 (m, 1H), 3,91 (d, 1H), 4,52 (m, 1H), 5,25 (s, 2H), 7,40 (d, 2H), 7,45 (dd, 2H), 7,64 (d, 4H), 8,29 (dd, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 480 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1k Síntesis del Compuesto 10: Boc-Val-Cit-PABC-PNP. Se agitó una solución de Boc-Val-Cit-PABOH (178 mg, 0,370 mmol) en THF (8 ml) en CH_2Cl_2 (4 ml) a temperatura ambiente con clorofornato de PNP (160 mg, 0,80 mmol) y piridina (65 μl , 0,80 mmol) durante 3 h. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y ácido cítrico acuoso al 10% (50 ml) a la mezcla de reacción y se lavó la capa orgánica con salmuera, se secó y se concentró, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5% como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (165 mg, 70%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 0,93 (dd, 3H), 0,97 (dd, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,58 (m, 2H), 1,75 (m, 1H), 1,89 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 3,20 (m, 1H), 3,90 (d, 1H), 4,51 (m, 1H), 4,55 (s, 2H), 7,29 (d, 2H), 7,55 (d, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 545 ($\text{M}+\text{H}^+$ -Boc), 645 ($\text{M}+\text{H}^+$), 667 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 683 ($\text{M}+\text{K}^+$).

1.1l Síntesis del Compuesto 12a. A una suspensión del Compuesto 11 (20 mg, 0,078 mmol) en acetato de etilo (5 ml), se borboteó HCl gaseoso durante 20 min (en ese momento, la suspensión se convirtió en una solución limpia). Se agitó la mezcla de reacción durante otros 5 min más y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (26 mg, 100%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM (IEN) 260 ($\text{M}+\text{H}^+$ -Cl), 295 ($\text{M}+\text{H}^+$).

1.1m Síntesis del Compuesto 12b. A una suspensión del Compuesto 11 (20 mg, 0,078 mmol) en acetato de etilo (5 ml), se borboteó gas de HBr durante 20 min (en ese momento, la suspensión se convirtió en una solución limpia). Se agitó la mezcla de reacción durante otros 5 min más y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando el

compuesto del título en forma de un sólido amarillo (33 mg, 100%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM (IEN) 260 (M+H⁺-Br), 339 (M+H⁺), 341 (M+H⁺+2).

1.1n Síntesis del Compuesto 13b. A una solución del Compuesto **12a** (26 mg, 0,078 mmol) en DMF (2 ml), se añadieron ácido 5-(2-dimetilamino-etoxi)-benzofuran-2-carboxílico (44 mg, 0,155 mmol) y EDC (30 mg, 0,155 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 h. Se concentró la mezcla y se disolvió el residuo en H₂O/CH₃CN/TFA (4/1,5/0,5; 6 ml) y se colocó en un congelador durante 3 h. Se recogió un sólido amarillo por filtración (35 mg, 85%). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 2,67 (s, 3H), 3,01 (s, 6M, 3,34 (m, 2H), 3,63 (ft, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,91 (m, 1H), 4,41 (m, 3H), 4,54 (m, 1H), 4,65 (m, 1H), 7,20 (dd, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,59 (d, 1H), 7,73 (s.a., 1H), 11,75 (s, 1H) ppm; CL-EM (IEN) 490 (M+H⁺-Cl), 526 (M+H⁺).

1.1o Síntesis del Compuesto 13c. A una solución del Compuesto **12b** (19 mg, 0,0387 mmol) en DMF (2 ml), se añadieron sal de HBr de ácido 5-(2-dimetilamino-etoxi)-benzofuran-2-carboxílico (25 mg, 0,0775 mmol) y PS-carbodiimida (82 mg, mmol/g: 0,94; 0,0775 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h. Tras la filtración, se concentró el filtrado y se disolvió el residuo en H₂O/CH₃CN/TFA (2/0,75/0,25, 3 ml) y se colocó en un congelador durante 3 h. El sólido amarillo se recogió por filtración y se secó, dando el compuesto del título (18 mg, 82%). CL-EM (IEN) 490 10 (M+H⁺-Br), 570 (M+H⁺), 572 (M+H⁺+2).

1.1p Síntesis del Compuesto 14a. A una suspensión del Compuesto **13a** (48 mg, 0,10 mmol) en diclorometano (4 ml), se añadieron clorofornio de *p*-nitrofenilo (80 mg, 0,40 mmol) y trietilamina (56 µl, 0,40 mmol) a -78 °C. Se calentó lentamente la mezcla hasta la temperatura ambiente y se prosiguió con la agitación durante otros 30 min más. A la mezcla de reacción, se añadió compuesto de *N*-Boc-*N,N'*-dimetiletilendiamina (166 mg, 0,80 mmol) y se agitó durante una noche. Se concentró la mezcla y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1,25% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (71 mg, 100%) RMN de ¹H δ 1,45-1,47 (m, 9H), 2,69 (s, 3H), 2,97 (s, 3H), 3,14-3,34 (m, 4H), 3,81-3,92 (m, 8H), 4,38-4,47 (m, 3H), 4,70 (d, 1H), 7,05 (dd, 1H), 7,11 (d, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 10,43 (s, 1H) ppm. CL-EM (IEN) 710 (M+H⁺).

1.1q Síntesis del Compuesto 14b. A una suspensión del Compuesto **13b** (48 mg, 0,075 mmol) en diclorometano (2 ml), se añadieron clorofornio de 4-nitrofenilo (80 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (40 mg, 0,4 mmol, 56 ml) a 0 °C. Se calentó la mezcla hasta la temperatura ambiente y se prosiguió con la agitación durante 6 h más. Se evaporó el disolvente y se lavó el residuo con éter, dando el producto intermedio. Se disolvió el producto intermedio en diclorometano (2 ml) y, a la solución de reacción, se añadieron *N*-Boc-*N,N'*-dimetiletilendiamina (44 mg, 0,2 mmol) y trietilamina (20 mg, 0,2 mmol, 28 µl). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se concentró la mezcla y se purificó el residuo mediante HPLC en una columna C-18 con formiato de amonio (20 mM, pH 7,0) y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (31 mg, 54%). CL-EM (IEN) 755 (M+H⁺).

1.1r Síntesis del Compuesto 14c. A una suspensión del Compuesto **13c** (24 mg, 0,04 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml), se añadieron clorofornio de *p*-nitrofenilo (64 mg, 0,32 mmol) y trietilamina (22 µl, 0,16 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción así obtenida a temperatura ambiente durante 18 h. A la mezcla de reacción, se añadió *N*-Boc-*N,N'*-dimetiletilenediamina (94 mg, 0,50 mmol) y se prosiguió con la agitación durante otros 50 min más. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (28 mg, 83%). CL-EM (IEN) 490, 570, 684 (M+H⁺-Boc), 784 (M+H⁺), 805 (M+Na⁺), 722 (M+K⁺).

1.1s Síntesis del Compuesto 15a. Se disolvió el Compuesto **14a** (70 mg, 0,10 mmol) en ácido trifluoroacético (5 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min y se concentró hasta la sequedad, y el producto (72 mg, 100%) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. La HPLC demostró una pureza de >95%. RMN de ¹H δ 2,64 (s, 3H), 2,93 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,30 (t, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,81-3,85 (m, 1H), 4,27-4,49 (m, 3H), 4,59 (d, 1H), 4,68 (d, 1H), 6,97 (dd, 1H), 7,03 (d, 1H), 7,3 (s, 1H), 7,41 (d, 1H), 8,00 (s.a., 1H), 10,61 (s.a., 1H) ppm. CL-EM (IEN) 612 (M+H⁺), 634 (M+Na⁺).

1.1t Síntesis del Compuesto 15b. El Compuesto **15b** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 15a en un rendimiento del 100%. RMN de ¹H (CD₃OD) δ 2,69 (s, 3H), 2,76 (s, 3H), 2,83 (s.a., 1H), 3,01 (s, 6H), 3,08 (s.a., 1H), 3,24 (s.a., 2H), 3,42 (m, 2H), 3,63 (s.a., 3H), 3,74 (s.a., 1H), 3,91 (s, 3H), 3,92 (m, 1H), 4,40 (s.a., 2H), 4,57 (s.a., 2H), 4,71 (s.a., 1H), 7,22 (d.a., 1H), 7,36 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,59 (d, 1H), 8,04 (s.a., 1H) ppm; CL-EM (IEN) 490, 526, 640 (M+H⁺), 678 (M+K⁺).

1.1u Síntesis del Compuesto 15c. El Compuesto **15c** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **15a** en un rendimiento del 100%. CL-EM (IEN) 490, 570, 684 (M+H⁺), 722 (M+K⁺).

1.1v Síntesis del Compuesto 16a. A una solución del Compuesto **5** (12,5 mg, 0,019 mmol) y del Compuesto **15a** (10 mg, 0,014 mmol) en dimetilformamida (200 µl), se añadió trietilamina (6 µl, 0,044 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió éter (5 ml) a la mezcla y precipitó un sólido blanco en la solución. Se filtró el sólido y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano, seguido de metanol al 1% en diclorometano, metanol al 2% en diclorometano, metanol al 3% en

diclorometano y, finalmente, metanol al 4% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (8,7 mg, 56%). CL-EM (IEN) 470, 1112 ($M+H^+$), 1134 ($M+Na^+$), 1150 ($M+K^+$).

- 5 1.1w Síntesis del Compuesto 16b. A una solución del Compuesto **15b** (5 mg, 0,0056 mmol) en DMF (0,35 ml), se añadieron el Compuesto **5** (3,8 mg, 0,0056 mmol) y DIEA (2 μ l, 0,011 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 5 h. Se concentró la mezcla y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 10% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un sólido (3 mg, 45%). CL-EM (IEN) 490, 526, 1169 ($M+H^+$), 1208 ($M+K^+$).

1.1x Síntesis del Compuesto 16c. El Compuesto **16c** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 16b en un rendimiento del 50%. CL-EM (IEN) 490, 570, 1212 ($M+H^+$), 1250 ($M+K^+$).

- 10 1.1y Síntesis del Compuesto 17a. A una solución del Compuesto **16a** (8,7 mg, 0,008 mmol) en dimetilformamida (500 μ l), se añadió piperidina (100 μ l) en una porción. Se agitó la mezcla así obtenida durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio y se colocaron en un alto vacío durante 1,5 h. Se extrajo el residuo en la mínima cantidad de diclorometano (100 μ l), y se añadió hexano (3 ml) a la solución, precipitó un sólido blanco en la solución que se separó por filtración y se secó (6,7 mg, 96,7%). EM (EN) 470, 890,1 ($M+H^+$), 912 ($M+Na^+$), 928 ($M+K^+$).

1.1z Síntesis del Compuesto 17b. El Compuesto **17b** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **17a** en un rendimiento del 95%. CL-EM (IEN) 947 ($M+H^+$).

1.1aa Síntesis del Compuesto 17c. El Compuesto **17c** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **17a** en un rendimiento del 95%. CL-EM (IEN) 1015 ($M+H^+$).

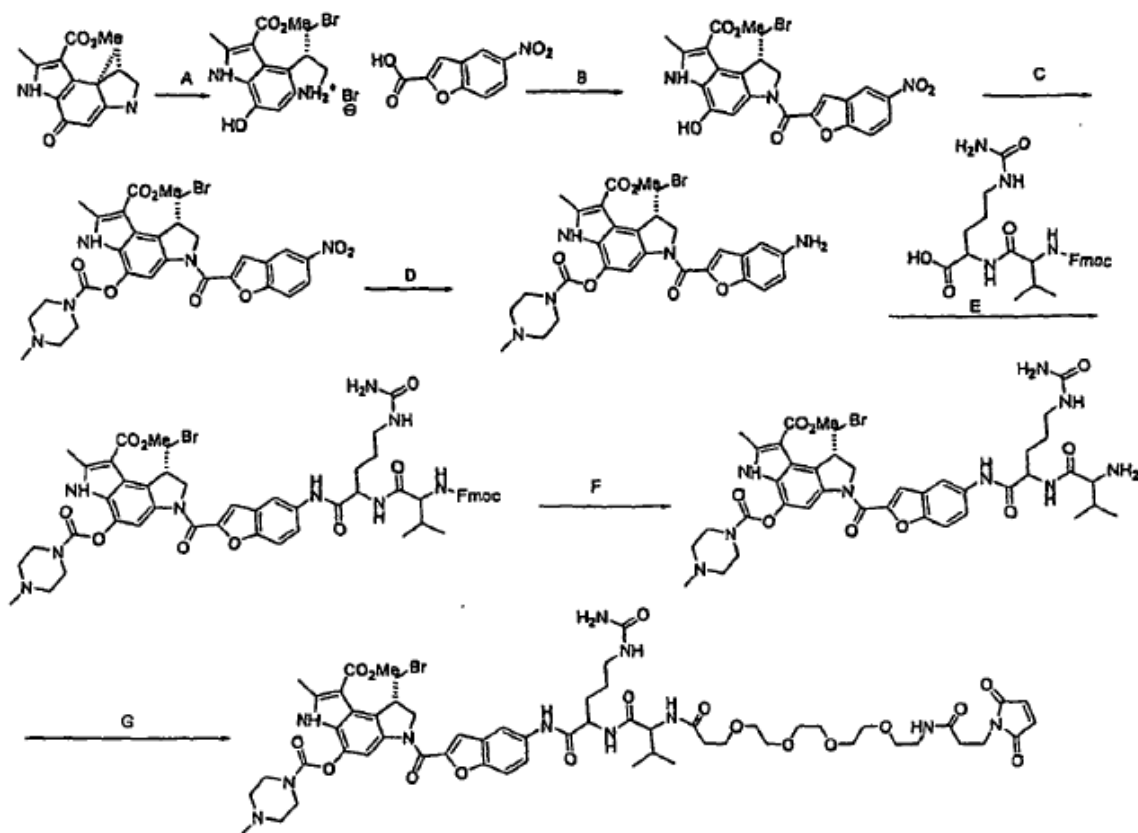
- 20 1.1bb Síntesis del Compuesto 18a. A una solución del Compuesto **17a** (4,2 mg, 0,005 mmol) y Compuesto **3** (2,64 mg, 0,005 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadió en una porción PyBOP (3,7 mg, 0,007 mmol) seguido de diisopropiletilamina (1 μ l). Se agitó la mezcla así obtenida durante una noche a temperatura ambiente. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio. Se purificó el residuo mediante HPLC Prep., proporcionando un sólido de color beis (2,6 mg, 38,7%). EM (EN) 470, 1431 ($M+H^+$), 1453 ($M+Na^+$), 1469 ($M+K^+$).

- 25 1.1cc Síntesis del Compuesto 18b. A una solución del Compuesto **17b** (2,2 mg, 0,0025 mmol) y Compuesto **3** en metanol al 5% en diclorometano (400 μ l), se añadieron HBTU (9 mg, 0,0046 mmol) y DIEA (1,4 μ l, 0,0046 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo en HPLC semi-preparativa con formiato de amonio 10 mM y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite (1,1 mg, 30%). CL-EM (IEN) 490, 526, 1488 ($M+H^+$), 1527 ($M+K^+$).

- 30 1.1dd Síntesis del Compuesto 18c. A una solución del Compuesto **17c** (6,5 mg, 0,0065 mmol) y el Compuesto **3** (5,5 mg, 0,0097 mmol) en metanol al 5% en diclorometano (0,5 ml), se añadieron HBTU (3,7 mg, 0,0097 mmol) y DIEA (3,4 μ l, 0,0194 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 30% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite (4 mg, 30%). CL-EM (IEN) 1532 ($M+H^+$), 1554 ($M+Na^+$), 1570 ($M+K^+$).

35

1.2 Metodología de la síntesis del engarce peptídico que contiene duocarmicina sin espaciador autoinmolador



1.2a Reacción A: a una suspensión de 7 mg del núcleo de alquilación en 2 ml de acetato de etilo, se pasó una corriente lenta de gas de HBr seco hasta que se formó una solución transparente en aproximadamente 15 minutos. Se concentró la mezcla de reacción y se secó durante una noche bajo un alto vacío.

1.2b Reacción B: a una suspensión del compuesto de bromo-metil-seco preparado en la etapa A en DMF, se añadió EDC (10 mg, 0,054 mmol) y ácido 5-nitro-benzofuran-carboxílico (12 mg, 0,054 mmol) y se dejó agitando durante 6 horas. A esta mezcla de reacción se añadieron luego acetato de etilo y salmuera. Se concentraron las capas orgánicas combinadas tras tres extracciones con acetato de etilo, y se filtraron sobre gel de sílice usando MeOH/DCM con cantidades crecientes de MeOH. El producto se confirmó mediante EM, M+1 = 530.

1.2c Reacción C: se protegió el OH de 4' con cloruro de metilpiperazincarbonilo (11 mg, 0,054 mmol) en 2 ml de DCM, 200 µl de alcohol alílico y piridina (21 µl) durante 2 horas. Se purificó el producto mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice y se identificó mediante EM, EM+1 = 654.

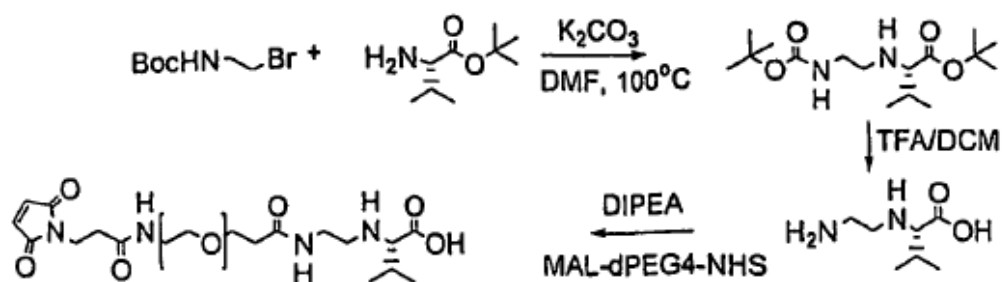
1.2d Reacción D: se efectuó la reducción del grupo nitro mediante hidrogenólisis sobre Pd/C en DCM/MeOH (2:1) bajo 275,8 kPa durante 45 minutos. Se filtró el producto, y se concentró el filtrado y se secó bajo un alto vacío. El producto se confirmó mediante análisis de EM, EM +1 = y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

1.2e Reacción E: a una solución del compuesto anterior (18 mg, 0,024 mmol) en MeOH/DCM (2:1, 3 ml), se añadió Fmoc-Val-Citulina (29 mg, 0,06 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante 10 minutos hasta que se disolvió todo el ácido. Se añadieron 15 mg, 0,06 moles de EEDQ y se agitó la mezcla de reacción a oscuras durante una noche. Luego se concentró la mezcla de reacción, se aclaró con dietiléter y se purificó el residuo mediante HPLC prep. de fase inversa, dando el producto que se identificó mediante EM, M+1 = 1103.

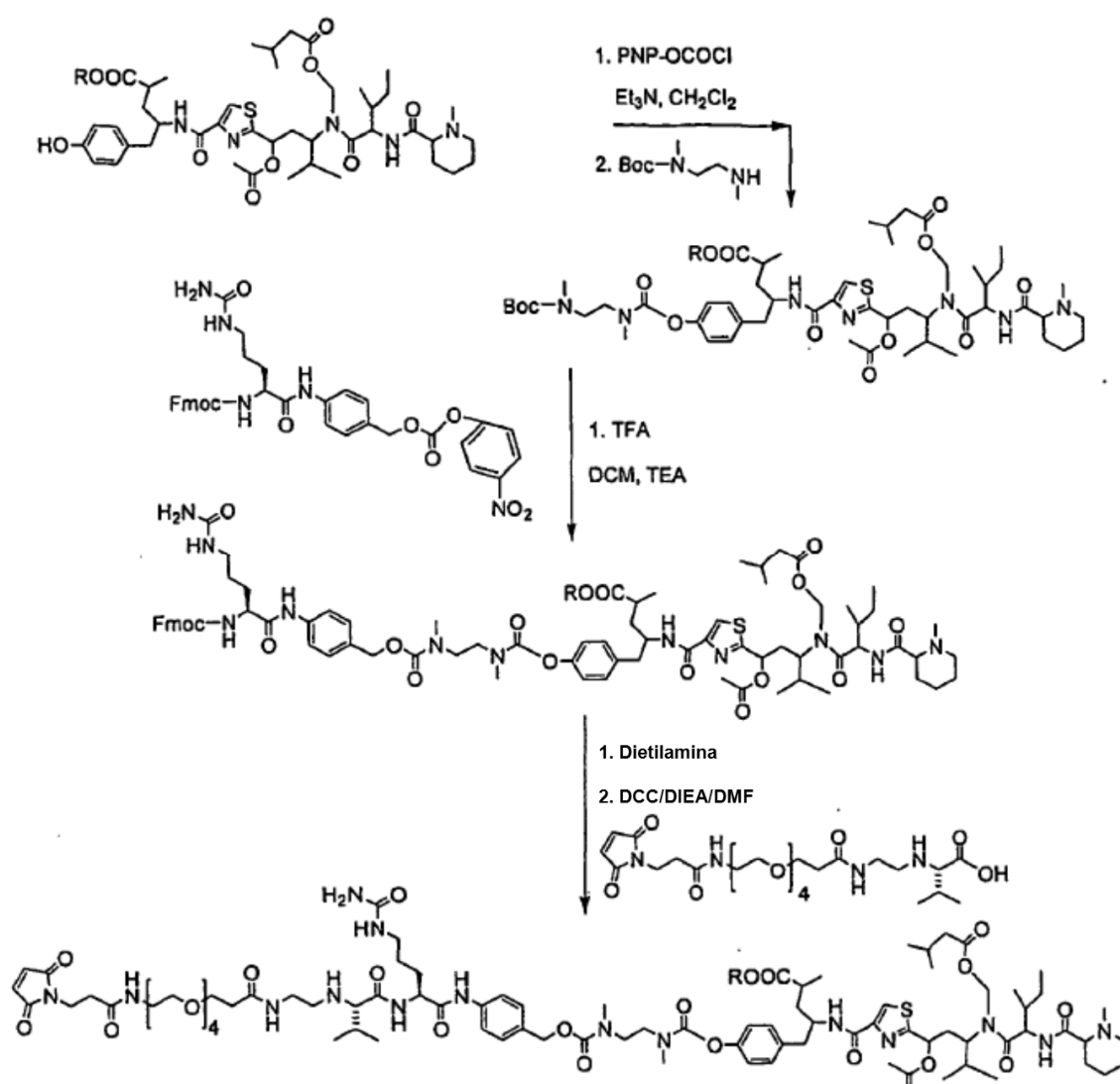
1.2f Reacción F: se efectuó la desprotección del grupo protector de Fmoc con piperidina al 5% en 1 ml de DMF durante 10 minutos. A la concentración de la mezcla de reacción, le siguió el aclarado del residuo sólido con dietiléter. El producto se confirmó mediante EM, EM+1 = 880 y M+K = 919.

1.2g Reacción G: a una solución de la amina libre en DMF (1,5 ml) preparada en la etapa F, se añadió Mal-(PEG)₄-NHS-éster (20 mg) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h. La concentración seguida de la purificación mediante HPLC prep. de fase inversa dieron 2,8 mg de (rendimiento global del 11%, partiendo del núcleo de alquilación) que se confirmó mediante EM, EM+1 = 2178, M+Na = 1300 y M+K = 1316.

1.3 Síntesis del enganche peptídico conjugado con tubulisin A

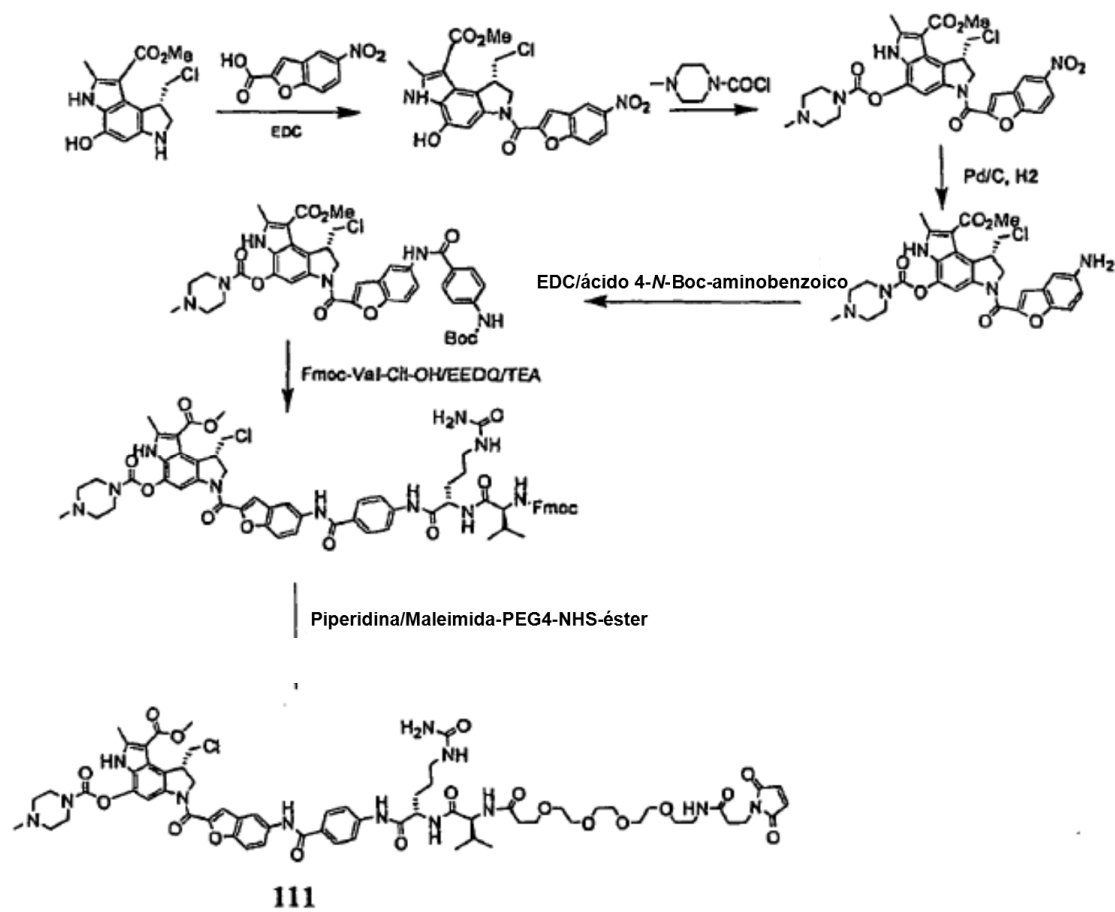


El ligando se puede ligar a PEG y al enganche peptídico mediante la síntesis mostrada.

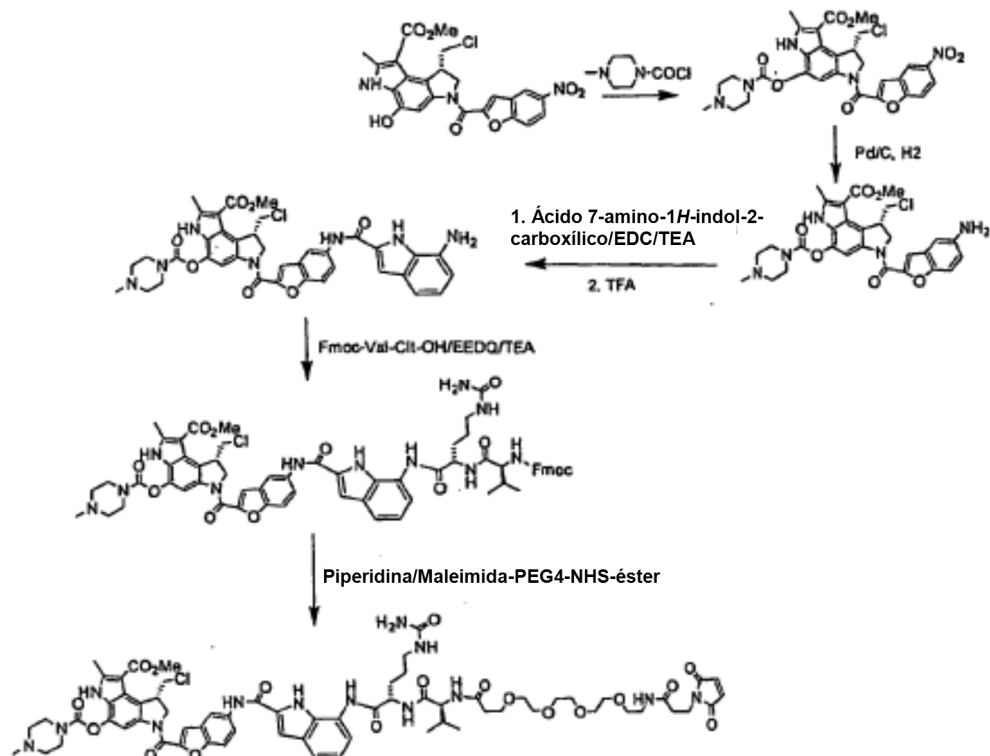


Arriba, se muestra la síntesis de los productos intermedios y el conjugado de ligando-fármaco que tiene un enganche peptídico en el que el fármaco es tubulisin A. Este procedimiento básico se puede usar con otros fármacos.

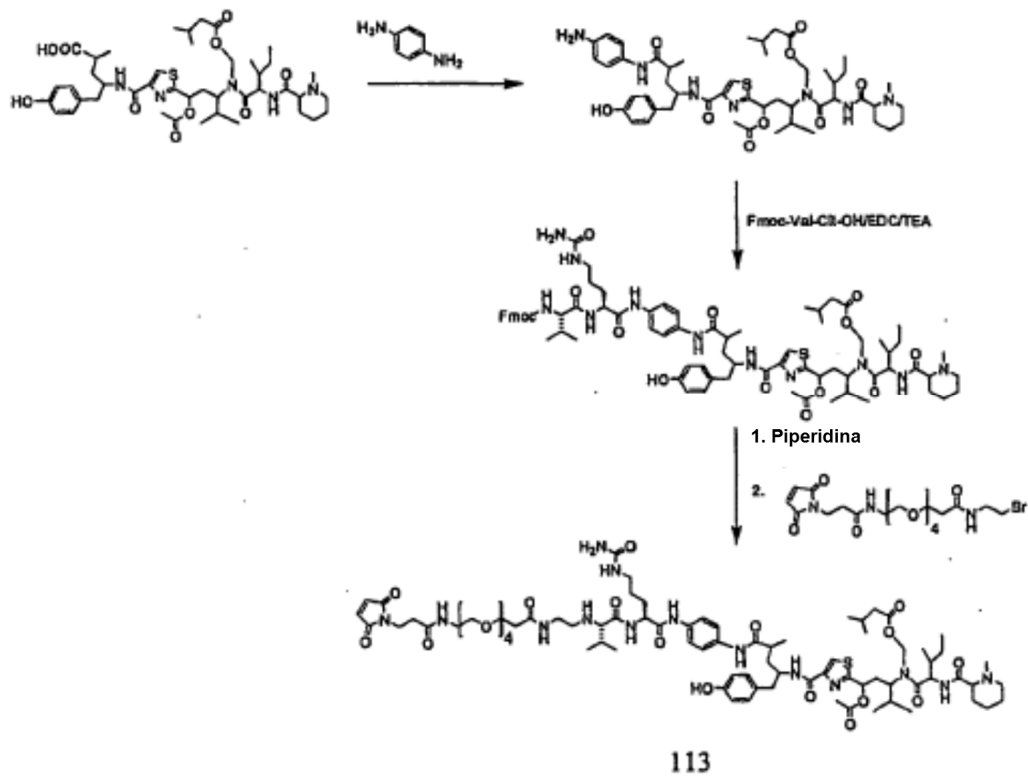
1.4a Síntesis del conjugado de péptido-engarce 111

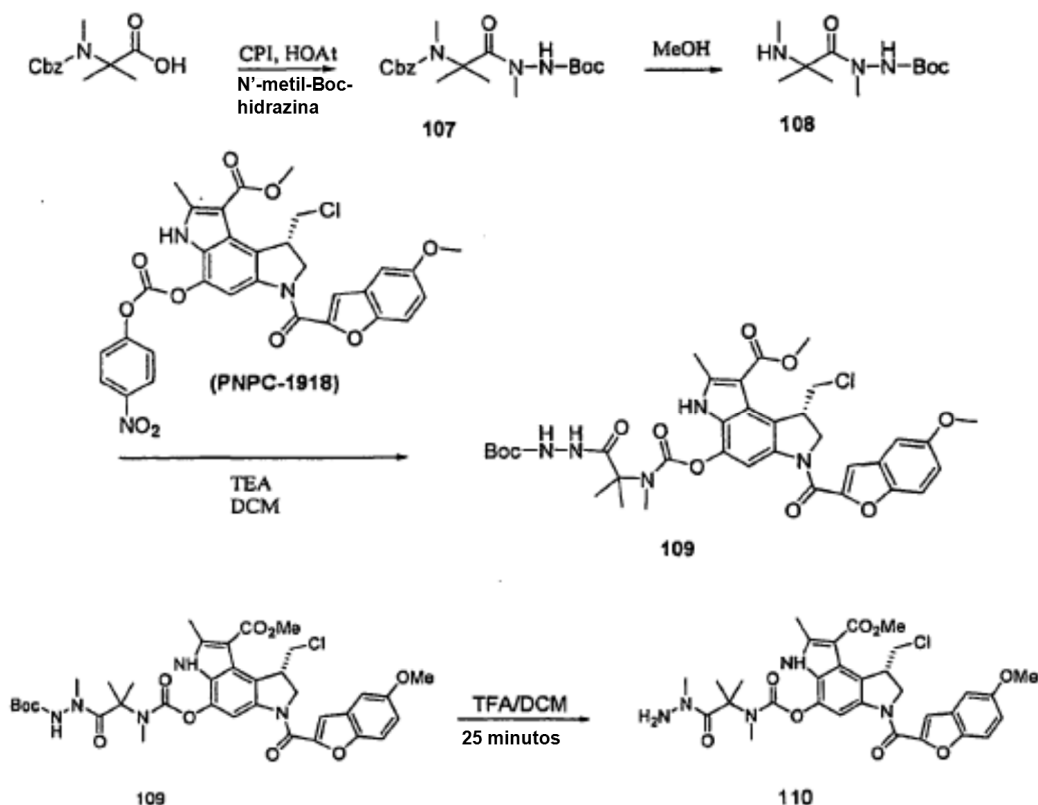


1.4b Síntesis del conjugado de péptido-engarce 112



1.4c Síntesis del conjugado de péptido-engarce 113



Ejemplo 2: Síntesis de conjugados de engarce de hidrazina de 6 miembros (Ejemplo de referencia)2.1 Síntesis de un engarce de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros conjugado con una citotoxina de derivado de duocarmicina2.1 a Esquema de síntesis del Compuesto 109

5

2.1 b Síntesis del Compuesto 110

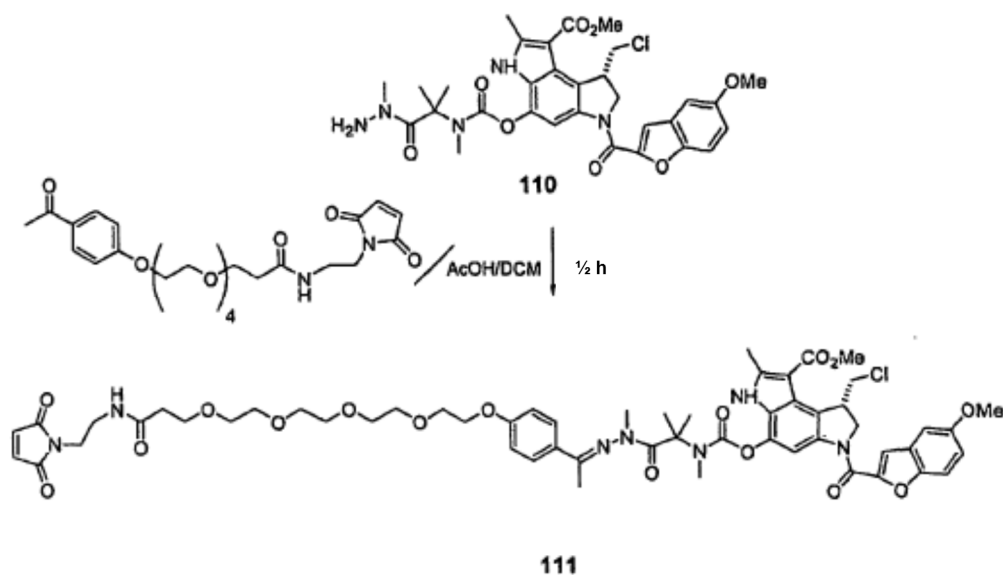
A una suspensión de Cbz-dimetil-alanina (1 g, 3,98 mmol) en 30 ml de DCM a la temperatura de un baño de aceite, se añadió HOAT (catalítico, 0,25 equivalentes), DIPEA (2,8 ml, 16 mmol) seguidos de hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolidinio(CIP) (1,2 g, 4,4 mmol). Luego se añadió a esta mezcla de reacción Boc-NN(Me) (643 mg, 4,4 mmol). Se dejó agitando la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla de reacción solución de ácido cítrico al 10% (100 ml) y se extrajo con DCM. Se lavó la fase orgánica con agua y luego con una solución saturada de bicarbonato sódico seguida otra vez de agua. A continuación, se concentró la fase orgánica y se purificó mediante una columna de gel de sílice con una polaridad creciente de acetato de etilo en hexanos, dando 860 mg, rendimiento del 57% de 107 que se identificó mediante EM, $M+1 = 380$ y $M+NH_4^+ = 397$.

15

Se eliminó el grupo protector de Cbz mediante hidrogenación catalítica usando Pd/Cd en MeOH, dando el compuesto 108 que se confirmó mediante EM.

20

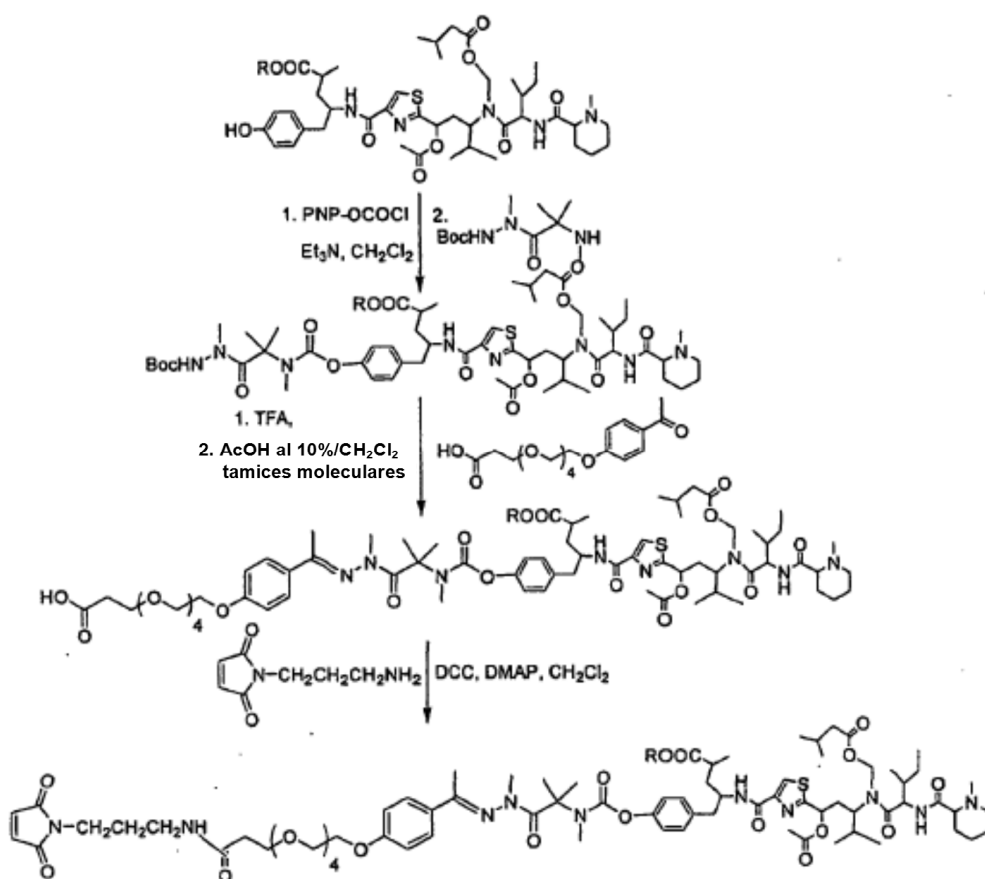
A una solución de PNPC-1918 (10 mg, 0,1 mmol) en 2 ml de DCM, se añadió gota a gota una solución del Compuesto 108 (60 mg, 0,25 mmol) en 8 ml de DCM y se dejó agitando la mezcla de reacción durante 2 días hasta que todo el material de partida hubo desaparecido. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho corto de gel de sílice, y luego se concentró y se purificó mediante HPLC prep. de fase inversa, dando 4,2 mg del Compuesto 109. Se identificó este por EM, $M+1 = 740$. Se realizó la desprotección de Boc del Compuesto 109 con TFA puro durante 20 minutos, dando el Compuesto 110. El producto se identificó mediante EM, $M+1 = 640$.



2.1c Síntesis del Compuesto 111

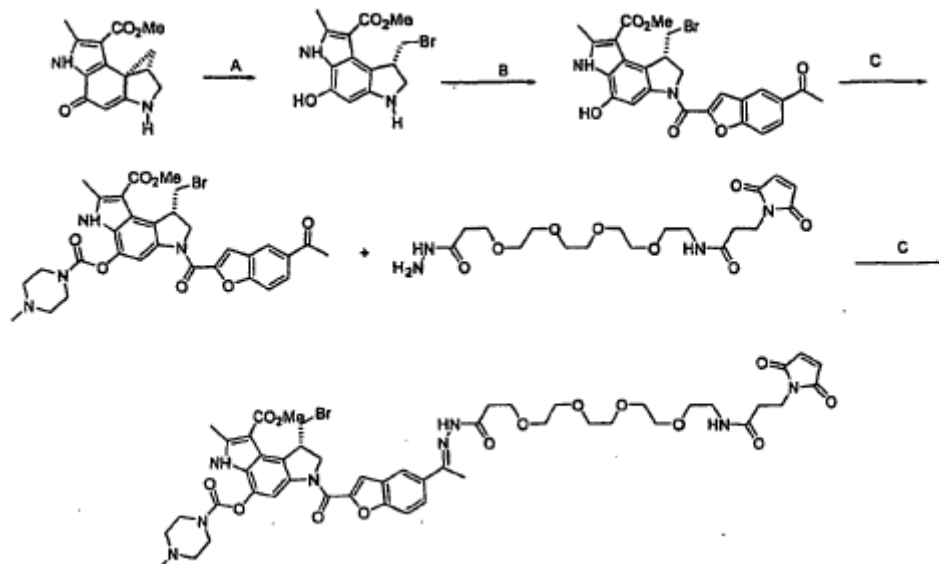
5 durante una noche bajo un fuerte vacío. La mezcla, se añadió 1 ml de solución de ácido acético al 5% preparada un día antes y se secó sobre tamices moleculares. La formación de hidrazona se completó en menos de una hora, tras lo que se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante HPLC prep. de fase inversa (formiato de amonio, pH = 7), dando 2,8 mg del Compuesto 111 (rendimiento del 60%). El producto se identificó mediante EM, EM+1 = 1129, M+NH₄ = 1.146 y M+K = 1.168.

2.2 Síntesis de un engraxe de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros conjugado con una citotoxina de tubulisina



Para la síntesis de un engarce de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros que forma un complejo con un fármaco tal como tubulicina A, se puede aplicar una metodología similar a la mostrada en el Ejemplo 2.1.

2.3 Síntesis de un engarce de hidrazina conjugado con un análogo de duocarmicina



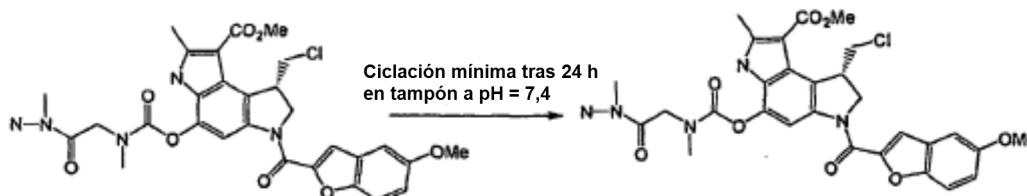
- 5 A una solución del compuesto de bromo-metil-seco (0,074 mmol) en 3 ml de DMF, se añadió el 5-actil-indol-2-carboxilato (30 mg, 0,15 mmol) y EDC (28 mg, 0,15 mmol) y se agitó la mezcla resultante durante una noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice usando MeOH al 5% en DCM que proporcionó 29 mg (rendimiento del 74%) del producto que se confirmó mediante EM, $M+1 = 523$.

- 10 A una solución del compuesto sintetizado en la etapa C en 5 ml de DCM y 300 μ l de alcohol alílico, se añadió cloruro de metil-piperazin-carbonilo (22 mg, 0,11 mmol) y piridina (44 μ l). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. La concentración seguida de la purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice usando MeOH al 5%/DCM como eluyente dieron 48 mg del producto deseado (rendimiento del 73%). El producto se confirmó mediante EM, $M+1 = 650$.

- 15 Se agitó una solución del compuesto anterior (8,2 mg, 0,012 mmol) y Mal-PEG₄-hidrazina en ácido acético al 5% en DCM anhidro a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo que se evaporaron los disolventes y se realizó una HPLC prep. de fase inversa usando una fase acuosa tamponada con acetonitrilo y formiato de amonio, dando 2,5 mg del producto final deseado que se confirmó mediante EM, $M+1 = 1.063$.

2.4a Velocidad de ciclación de un engarce de dimetil-hidrazina de 6 miembros

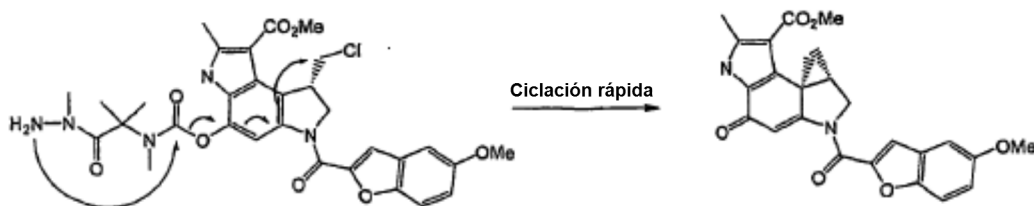
- 20 Se incubó un análogo de duocarmicina conjugado con un engarce de dimetil-hidrazina de 6 miembros en tampón a pH 7,4 durante 24 horas, y se evaluó a lo largo del tiempo la generación del producto ciclado resultante de la ciclación del engarce de hidrazina, liberando así análogo de duocarmicina libre.



Se detectaron cantidades mínimas de producto ciclado durante 24 horas a un pH = 7,4, lo que indica que esta forma de engarce de hidrazina de 6 miembros presenta una velocidad relativamente baja de ciclación.

- 25 **2.4b Velocidad de ciclación de un engarce de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros**

Se incubó un análogo de duocarmicina conjugado con un engarce de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros en tampón a pH 7,4, y se evaluó a lo largo del tiempo la generación del producto ciclado resultante de la ciclación del engarce de hidrazina, liberando así análogo de duocarmicina libre.

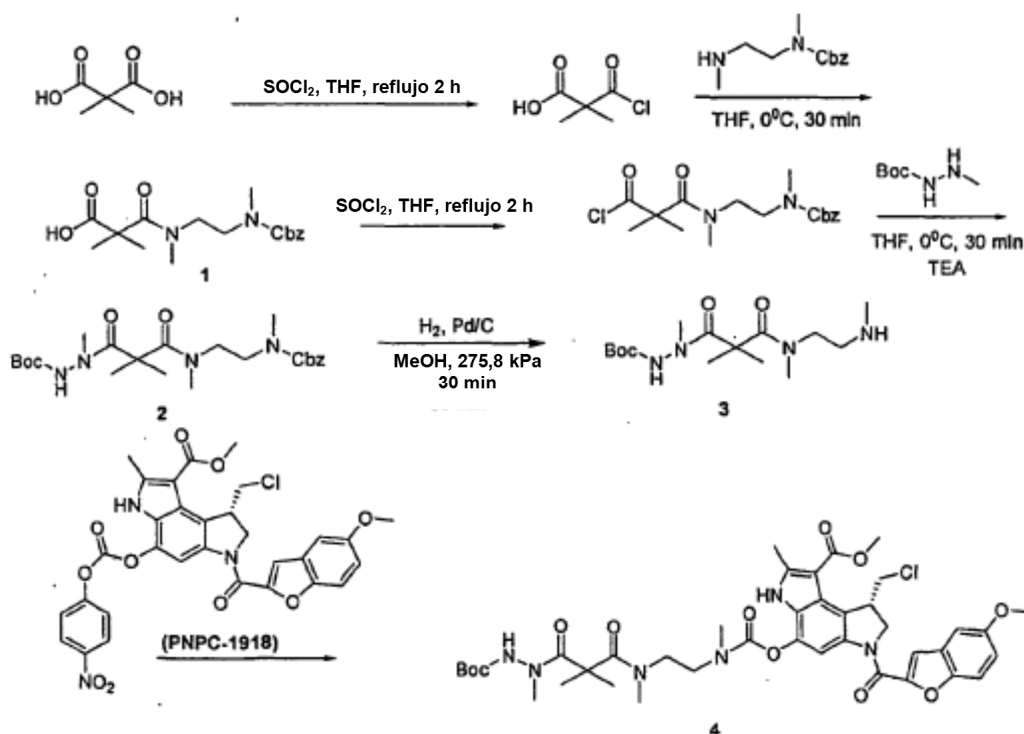


Con el engarce de *gem*-dimetilo de 6 miembros, la reacción de ciclación fue bastante rápida, llegando a su finalización en unos cuantos minutos. Así pues, la velocidad de ciclación para el engarce de *gem*-dimetil-hidrazina de 6 miembros se realizó a una velocidad mucho mayor que el engarce de 6 miembros que no contenía el resto *gem*-dimetilo.

5

Ejemplo 3: Síntesis de conjugados de engarce de hidrazina de 5 miembros (Ejemplo de referencia)

3.1 Metodología de la síntesis del Compuesto 4



Ácido Cbz-DMDA-2,2-dimetilmalónico (1)

- 10 A una solución de ácido 2,2-dimetil-malónico (2,0 gm, 0,0151 mol), cloruro de tionilo (1,35 ml, 0,0182 mol) en THF (15 ml) en un matraz de 25 ml dotado de una varilla de agitación, una sonda de temperatura y un condensador de reflujo, se añadió una gota de DMF, y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 2 h, y luego se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se transfirió esta mezcla de reacción gota a gota a una solución de Cbz-DMDA (4 gm, 0,0182 mol) y trietilamina (4 ml, 0,0287 mol) en THF (5 ml) a 0 °C, y se agitó durante 30 min a esta temperatura.
- 15 Se eliminó el disolvente al vacío y se disolvió el residuo en HCl 1 N (50 ml) y se extrajo con DCM (2 x 25 ml). Se extrajeron las capas orgánicas combinadas con NaOH 1 N (2 x 25 ml) y se acidificó la capa acuosa combinada (pH < 1) con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose un sólido pegajoso blanquecino, 3,44 gm, rendimiento del 68%. El Compuesto 1 se confirmó mediante EM: *m/z* 337,0 [M+1]⁺;

- 20 tiempo de retención de la HPLC: 3,77 min (EM).

Cbz-DMDA-2,2-Dimetilmalónico-Boc-N'-metilhidrazina (2)

A una solución del Compuesto 1 (3,0 gm, 0,0089 mol), cloruro de tionilo (0,78 ml, 0,0107 mol) en THF (25 ml) en un RBF 3N de 50ml ml dotado de una varilla de agitación, una sonda de temperatura y un condensador de reflujo, se añadió una gota de DMF, y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 2 h, y luego se enfrió hasta la

temperatura ambiente. Luego se transfirió esta mezcla de reacción gota a gota a una solución de Boc-*N*-metilhidrazina (1,33 gm, 0,091 mol) y trietilamina (3 ml, 0,0215 mol) en THF (25 ml) a 0 °C, y se agitó durante 30 min. Se eliminó el disolvente al vacío y se disolvió el residuo en EtOAc (50 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose un aceite marrón. Se disolvió el aceite en EtOAc y se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 100%) dando 3,45 gm, rendimiento del 83% de un aceite transparente. El Compuesto **2** se confirmó mediante EM: *m/z* 465,2 [M+1]⁺;

tiempo de retención de la HPLC: 3,97 min (EM).

DMDA-2,2-Dimetilmalónico- Boc-*N*'-metilhidrazina (**3**)

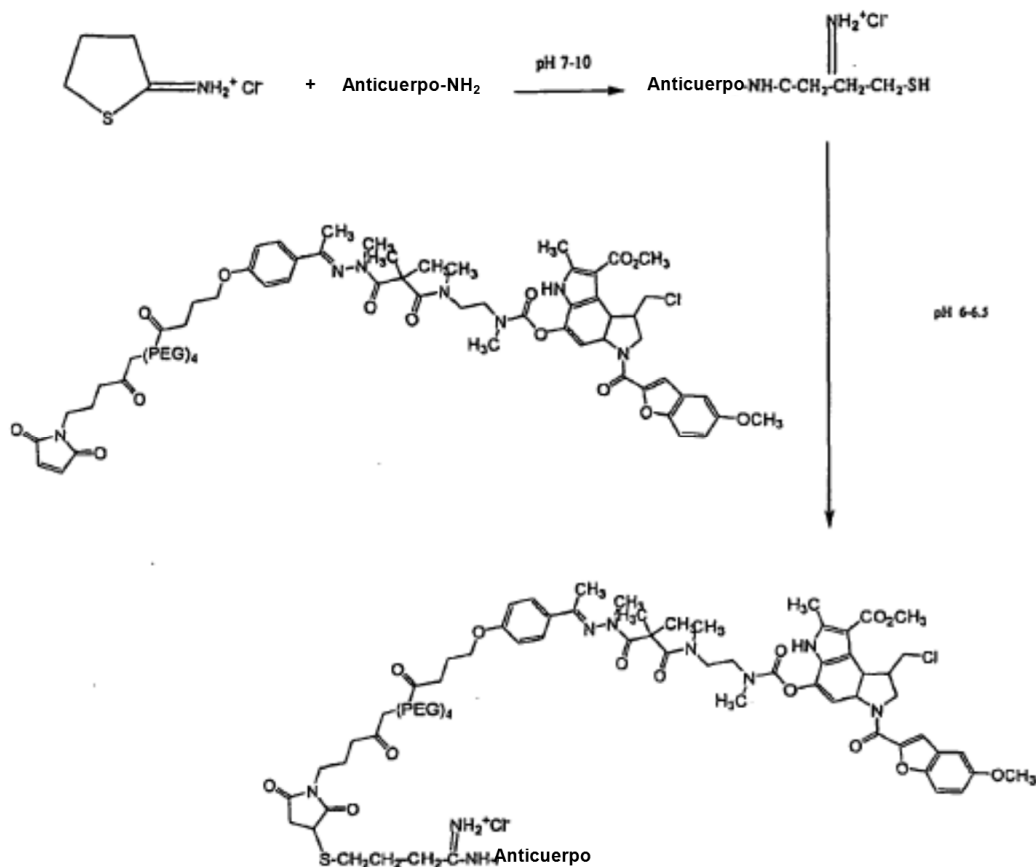
A una solución del Compuesto **2** (0,5 gm, 0,0011 mol) en MeOH (30 ml), se añadió Pd/C al 10% (15 mg) y se colocó la reacción sobre un hidrogenador de Parr durante 30 minutos. Se separó el catalizador por filtración y se concentró el filtrado al vacío, obteniéndose un aceite transparente para producir el Compuesto **3** (0,38 gm). El producto se confirmó mediante RMN (¹H, CDCl₃): δ 1,45 (s, 15H) 2,45 (s, 3H) 2,85 (s, 6H), 3,16 (s, 3H) 4,64 (m, 1H) 10,6 (s.a., 1H); RMN (¹³C, CDCl₃) δ 24,1; 28,57; 35,15; 35,58; 36,66; 47,01; 48,51; 81,11; 155,17; 173,56; 176,24.

Síntesis del Compuesto **4**

En un RBF de 15 ml dotado de una varilla de agitación, se combinaron el Compuesto **3** (50 mg, 0,1513 mmol), PNPC-1918 (20 mg, 0,0315 mmol) y DCM (5 ml). Se agitó la solución durante 30 minutos, luego se añadió trietilamina (25 µl, 0,1794 mmol) y se agitó la solución de color amarillo brillante durante 1 h. Se concentró la solución al vacío, proporcionando un aceite amarillo y se purificó mediante cromatografía en columna (DCM al 100% a EtOAc/DCM 1:1), produciendo el Compuesto **4** en forma de un sólido blanquecino, 22 mg (84%). El producto se confirmó mediante EM: *m/z* 825,7 [M+1]⁺;

tiempo de retención de la HPLC: 7,65 min (EM).

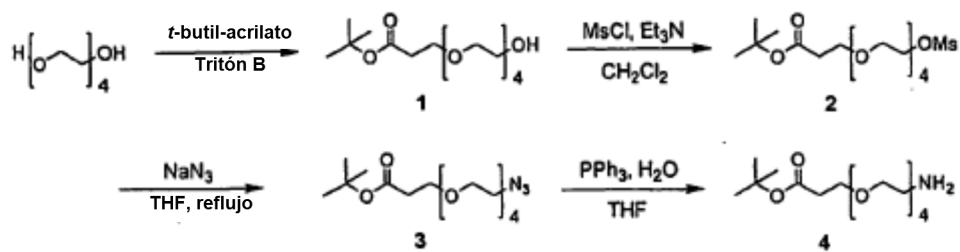
3.2 Síntesis de conjugados de anticuerpo-fármaco que tienen un engarce de hidrazina de 5 miembros



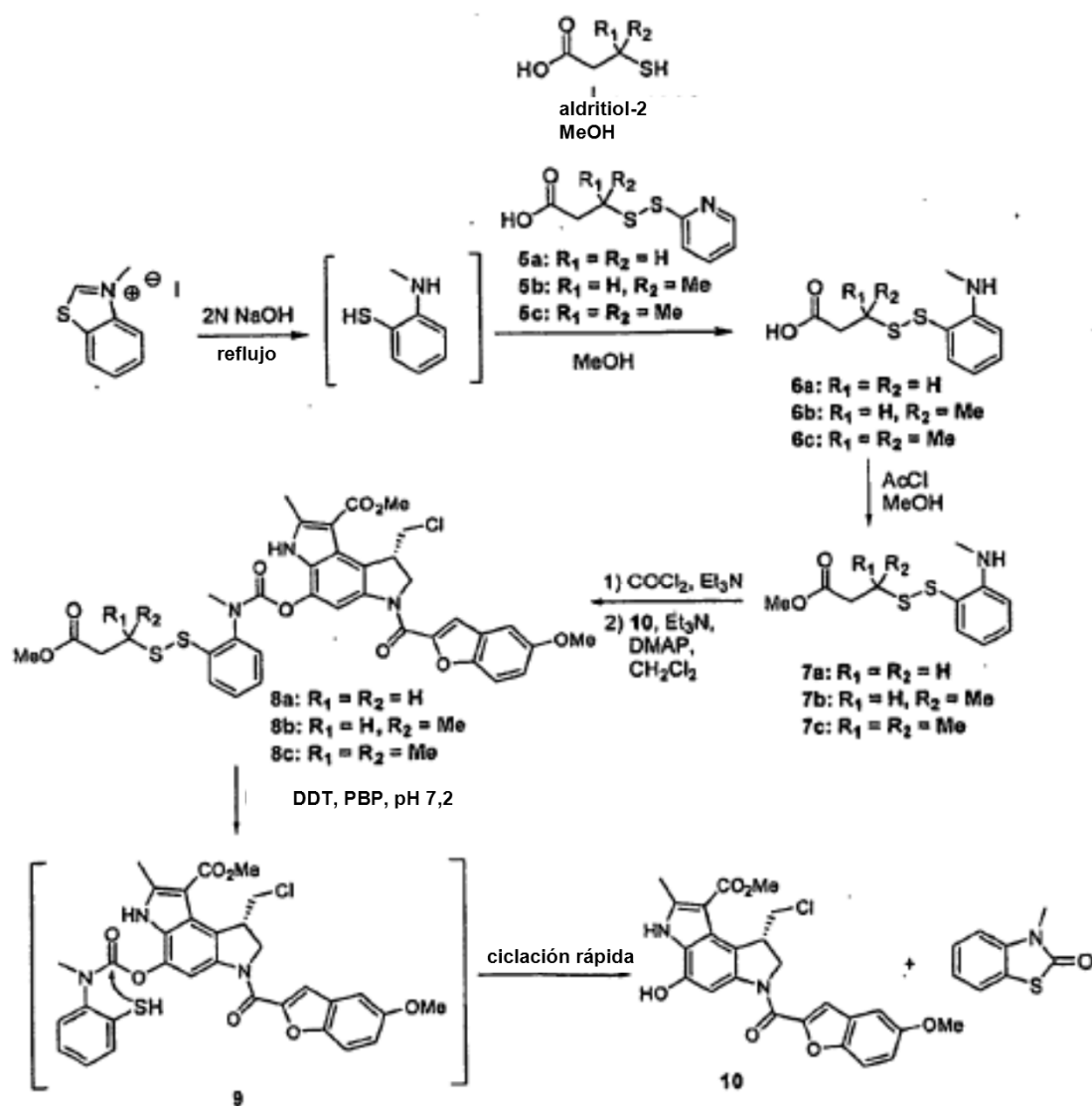
El presente esquema demuestra la conjugación de un anticuerpo con un complejo de engarce-fármaco. Estas metodologías son muy conocidas en la técnica farmacéutica. Los ejemplos de otros sitios reactivos incluyen maleimidas, haloacetamidas con tioles en un ligando, tioles que reaccionan con disulfuros en un ligando, hidrazidas que reaccionan con aldehídos y cetonas en un ligando e hidroxisuccinimidias, isocianatos, isotiocianatos y anhídrido

que reacciona con grupo amino en un ligando.

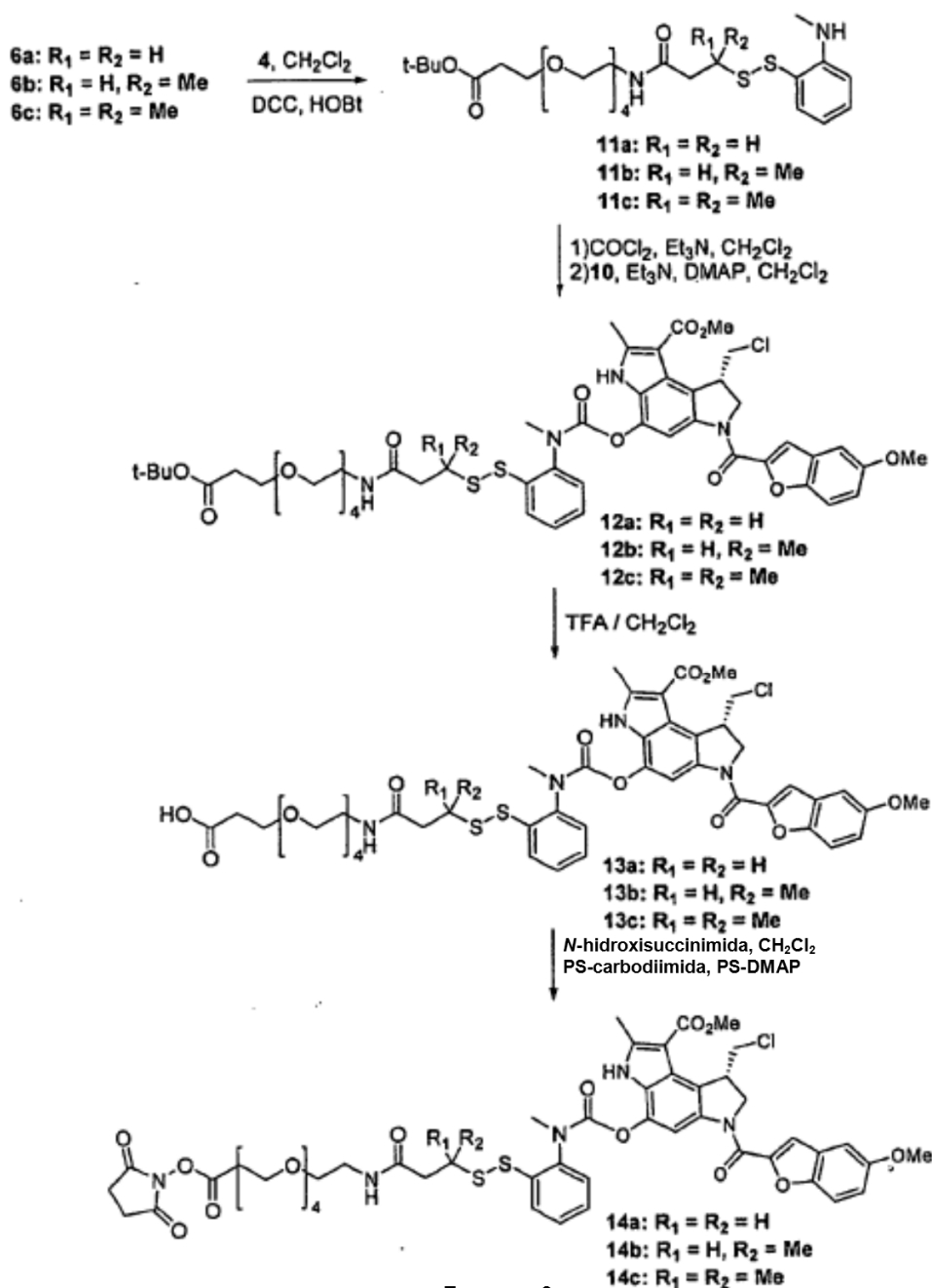
Ejemplo 4: Síntesis de conjugados de engarce con miembros disulfuro (Ejemplo de referencia)



Esquema 1



Esquema 2



4.1a Síntesis del Compuesto 1. A un matraz que contiene PEG₄ (3,88 g, 20 mmol), se añadió tritón B (solución en metanol al 40%, 1,08 ml, 0,25 mmol) y *tert*-butil-acrilato (3,62 ml, 24 mmol) seguidos tras 15 min. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante una noche. Se concentró la mezcla al vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (2,35 g, 36%). RMN de ¹H δ 1,45 (s, 9H), 2,5 (t, 2H), 3,65 (m, 18H).

4.1b Síntesis del Compuesto 2. A una solución del Compuesto 1 (1,17 g, 3,6 mmol) en diclorometano (10 ml), se añadieron trietilamina (532 μl, 4 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (309 μl, 4 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (1,3 g, 89%). RMN de ¹H δ 1,43 (s, 9H), 2,48 (t, 2H), 3,07 (s, 3H), 3,62-3,70 (m, 14H), 3,76 (m, 2H), 4,37 (m, 2H).

4.1c Síntesis del Compuesto 3. A una solución del Compuesto 2 (1,3 g, 3,25 mmol) en etanol (10 ml), se añadió azida de sodio (423 mg, 6,5 mmol). Se sometió la mezcla así obtenida a reflujo durante una noche. Se evaporó el

disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (1,01 g, 90%). RMN de ^1H δ 1,45 (s, 9H), 2,50 (t, 2H), 3,40 (t, 2H), 3,62-3,73 (m, 16H).

- 5 4.1d Síntesis del Compuesto 4. A una solución del Compuesto 3 (470 mg, 1,35 mmol) en éter (5 ml) que contenía H_2O (25 μl), se añadió trifenilfosfina (391 mg, 1,48 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (325 g, 75%). RMN de ^1H δ 1,45 (s, 9H), 2,24 (s.a., 2H), 2,51 (t, 2H), 2,91 (t, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,63-3,66 (m, 12H), 3,72 (m, 2H).
- 10 4.1 Síntesis del Compuesto 5. A una solución de ácido 3-mercaptopropiónico (1,22 g, 11,5 mmol) en metanol (10 ml), se añadió alditol-2 (3,78 g, 17,25 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 3 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 30% en hexanos como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite (2,44 g, 98%). RMN de ^1H δ 2,8 (t, 2H), 3,05 (t, 2H), 7,14 (m, 1H), 7,67 (m, 2H), 8,48 (m, 1H).
- 15 **Compuesto 5b:** RMN de ^1H δ 1,43 (d, 3H), 2,61 (m, 1H), 2,76 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 7,17 (m, 1H), 7,66 (m, 2H), 8,45 (m, 1H).
- 20 4.1f Síntesis del Compuesto 6. Se disolvió yoduro de 3-metil-benzotiazolio (1 g, 3,6 mmol) en solución acuosa de hidróxido de sodio 2 N (10 ml) y se agitó la mezcla durante 6 horas a 100 °C, luego se acidificó con solución acuosa de ácido clorhídrico 6 N a pH 4 y se extrajo con dietiléter. Se secó la capa orgánica sobre Na_2SO_4 , se evaporó con un evaporador rotatorio al vacío y se disolvió el residuo en metanol (10 ml), y se añadió compuesto 5a (776 mg, 3,6 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (482 mg, 55%). RMN de ^1H δ 2,85 (m, 2H), 2,95 (m, 5H), 6,64 (m, 2H), 7,3 (m, 1H), 7,4 (dd, 1H); EM (EN) 244 ($\text{M}+\text{H}^+$), 487 ($2\text{M}+\text{H}^+$).
- 25 **Compuesto 6b:** RMN de ^1H δ 1,35 (d, 3H), 2,48 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 3,02 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 6,62 (m, 2H), 7,28 (m, 1H), 7,44 (m, 1H); EM (EN) 258 ($\text{M}+\text{H}^+$).
- Compuesto 6c:** RMN de ^1H δ 1,45 (s, 6H), 2,70 (s, 2H), 2,93 (s, 3H), 6,62 (m, 2H), 7,24 (m, 1H), 7,51 (m, 1H); EM (EN) 272 ($\text{M}+\text{H}^+$), 294 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 310 ($\text{M}+\text{K}^+$).
- 30 4.1 g Síntesis del Compuesto 7. A una solución del Compuesto 6a (28 mg, 0,115 mmol) en metanol anhidro (1 ml), se añadió cloruro de acetilo (13 μl , 0,173 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10% en hexanos como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite (24 g, 83%). RMN de ^1H δ 2,08 (m, 2H), 2,93 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 6,63 (m, 2H), 7,28 (m, 2H), 7,40 (m, 2H); EM (EN) 258 ($\text{M}+\text{H}^+$), 280 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 296 ($\text{M}+\text{K}^+$).
- 35 **Compuesto 7b:** RMN de ^1H δ 1,32 (d, 3H), 2,45 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 2,93 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 6,62 (m, 2H), 7,26 (m, 1H), 7,44 (m, 1H); EM (EN) 272 ($\text{M}+\text{H}^+$).
- Compuesto 7c:** RMN de ^1H δ 1,42 (s, 6H), 2,66 (s, 2H), 2,93 (s, 3H), 3,62 (s, 3H), 6,62 (m, 2H), 7,24 (m, 1H), 7,51 (m, 1H); EM (EN) 286 ($\text{M}+\text{H}^+$), 308 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 324 ($\text{M}+\text{K}^+$).
- 40 4.1h Síntesis del Compuesto 8. A una solución del Compuesto 7a (24 mg, 0,093 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadieron trifosgeno (28 mg, 0,093 mmol) y trietilamina (37 μl , 0,28 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla durante 1 hora. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y el residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- Se disolvió el material en bruto en diclorometano (1 ml), y se añadieron el Compuesto 8a (35 mg, 0,074 mmol) y DMAP (23 mg, 0,190 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (53 mg, 76%).
- 45 RMN de ^1H δ 2,70 (s, 3H), 2,74 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 3,34 (m, 1H), 3,35 y 3,36 (2s, 3H), 3,63 y 3,64 (2s, 3H), 3,86 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,93 y 3,94 (2s, 3H), 4,48 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,11 (m, 1H), 7,26-7,52 (m, 5H), 7,85 (d, 1H), 8,1 (s.a., 1H), 8,98 y 9,08 (2s, 1H); EM (EN) 753 ($\text{M}+\text{H}^+$).
- 50 **Compuesto 8b:** RMN de ^1H δ 1,38 (m, 3H), 2,52 (m, 1H), 2,69 (m, 3H), 2,79 (m, 1H), 3,33 (m, 1H), 3,37 (2s, 3H), 3,64 (m, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,84-3,90 (m, 1H), 3,93 (2s, 3H), 4,48 (m, 1H), 4,57 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 7,06 (m, 1H), 7,12 (m, 1H), 7,26-7,43 (m, 3H), 7,50 (m, 2H), 7,86 (m, 1H), 8,1 (s.a., 1H), 8,99, 9,08, 9,13 y 9,22 (4s, 1H); EM (EN) 767 ($\text{M}+\text{H}^+$).
- Compuesto 8c:** RMN de ^1H δ 1,44 (m, 6H), 2,63 (d, 2H), 2,70 (s, 3H), 3,35 (m, 1H), 3,38 y 3,39 (2s, 3H), 3,63 y 3,64 (2s, 3H), 3,87 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,93 y 3,94 (2s, 3H), 4,48 (m, 1H), 4,55 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,12

(m, 1H), 7,31-7,39 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,89 (d, 1H), 8,1 (s.a., 1H), 9,12 y 9,23 (2s, 1H); EM (EN) 781 (M+H⁺).

4.1i Síntesis de los Compuestos 9 y 10. A una solución del Compuesto **8a** (0,1 mg) en solución de tampón de PBS (pH 7,2)/metanol (300 µl, 2/1), se añadió una solución 20 mM de DTT (100 µl, 15 equiv.) y controló el progreso de la reacción mediante HPLC. La reacción se desarrolló demasiado rápido para detectarla, tras unos cuantos segundos, ya se había completado, dando el producto de Compuesto **10** cuantitativamente. No se detectó el Compuesto intermedio **9** de reacción.

4.1i Síntesis del Compuesto 11. A una solución del Compuesto **6a** (66 mg, 0,2 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadieron DCC (47 mg, 0,22 mmol), HOBt (31 mg, 0,22 mmol) y el compuesto **4** (50 mg, 0,2 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (70 mg, 62%). RMN de ¹H δ 1,44 (s, 9H), 2,51 (t, 1H), 2,63 (t, 2H), 2,93 (d, 3H), 3,01 (t, 2H), 3,45 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,64 (m, 12H), 3,71 (t, 2H), 5,01 (s.a., 1H), 6,3 (t.a., 1H), 6,62 (m, 2H), 7,27 (m, 1H), 7,43 (dd, 1H). EM (EN) 491 (M-56+H⁺), 513 (M-56+Na⁺), 547 (M+H⁺), 569 (M+Na⁺).

Compuesto **11b**: RMN de ¹H δ 1,34 (d, 3H), 1,45 (s, 9H), 2,30 (m, 1H), 2,5 (t, 2H), 2,69 (m, 1H), 2,93 (d, 3H), 3,37-3,55 (m, 10 5H), 3,63 (m, 12H), 3,71 (t, 2H), 4,99 (s.a., 1H), 6,13 (t.a., 1H), 6,62 (m, 2H), 7,25 (m, 1H), 7,48 (dd, 1H). EM (EN) 505 (M-56+H⁺), 527 (M-56+Na⁺), 543 (M-56+K⁺), 561 (M+H⁺), 583 (M+Na⁺).

Compuesto **11c**: 1,43 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 2,46 (s, 2H), 2,5 (t, 2H), 2,92 y 2,94 (2s, 3H), 3,33 (m, 2H), 3,47 (t, 2H), 3,63 (m, 12H), 3,70 (t, 2H), 6,06 (t.a., 1H), 6,63 (m, 2H), 7,25 (m, 1H), 7,54 (d, 1H); EM (EN) 519 (M-56+H⁺), 541 (M-56+Na⁺), 575 (M+H⁺), 597 (M+Na⁺).

4.1k Síntesis del Compuesto 12: A una suspensión del Compuesto **11a** (20 mg, 0,037 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadieron trietilamina (15 µl, 0,11 mmol) y una solución de fosgeno 2 N en tolueno (55 µl, 0,11 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se concentró la mezcla y se disolvió el residuo en diclorometano (1 ml), y se añadieron el compuesto **10** (14 mg, 0,030 mmol) y DMAP (9 mg, 0,076 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (23 mg, 74%). RMN de ¹H δ 1,44 (s, 9H), 2,49 (t, 2H), 2,67 (m, 2H), 2,65 y 2,67 (2s, 3H), 3,07 (m, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,40 (m, 3H), 3,51 (m, 2H), 3,60 (m, 12H), 3,69 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,93 (m, 1H), 4,52 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 6,65, 6,74 y 6,97 (3t.a., 1H), 7,06 (d, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,29-7,42 (m, 3H), 7,50 (m, 2H), 7,87 (d, 1H), 8,10 y 8,15 (2s.a., 1H), 9,79 y 9,58 (2s, 1H); EM (EN) 986 (M+H⁺-56), 1042 (M+H⁺).

Compuesto **12b**: RMN de ¹H δ 1,32 (m, 3H), 1,44 (s, 9H), 2,39 (m, 1H), 2,48 (m, 2H), 2,60 (m, 1H), 2,67 y 2,69 (2s, 3H), 3,32 y 3,35 (2s, 3H), 3,38-3,72 (m, 20H), 3,88 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 3,94 (m, 1H), 4,52 (m, 2H), 4,77 (m, 1H), 6,53, 6,67 y 6,72 (3t.a., 1H), 7,06 (d, 1H), 7,12 (s, 1H), 7,29-7,39 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,88 (d, 1H), 8,12 y 8,25 (2s.a., 1H), 9,13, 9,36, 10,08 y 10,21 (4s, 1H); EM (EN) 1000 (M+H⁺-56), 1056 (M+H⁺), 1078 (M+Na⁺), 1084 (M+K⁺).

Compuesto **12c**: RMN de ¹H δ 1,30-1,42 (m, 3H), 1,44 (s, 9H), 2,45-2,52 (m, 4H), 2,69 y 2,72 (2s, 3H), 3,34 y 3,35 (2s, 3H), 3,39-3,72 (m, 19H), 3,88 (s, 3H), 3,925 y 3,93 (2s, 3H), 3,94 (m, 1H), 4,53 (m, 2H), 4,80 (m, 1H), 6,63 (m, 1H), 7,06 (dd, 1H), 7,13 (d, 1H), 7,25-7,39 (m, 3H), 7,50 (m, 2H), 7,89 (d, 1H), 8,10 y 8,27 (2s.a., 1H), 9,99 y 10,191 (2s, 1H); EM (EN) 1014 (M+H⁺-56), 1070 (M+H⁺), 1108 (M+K⁺).

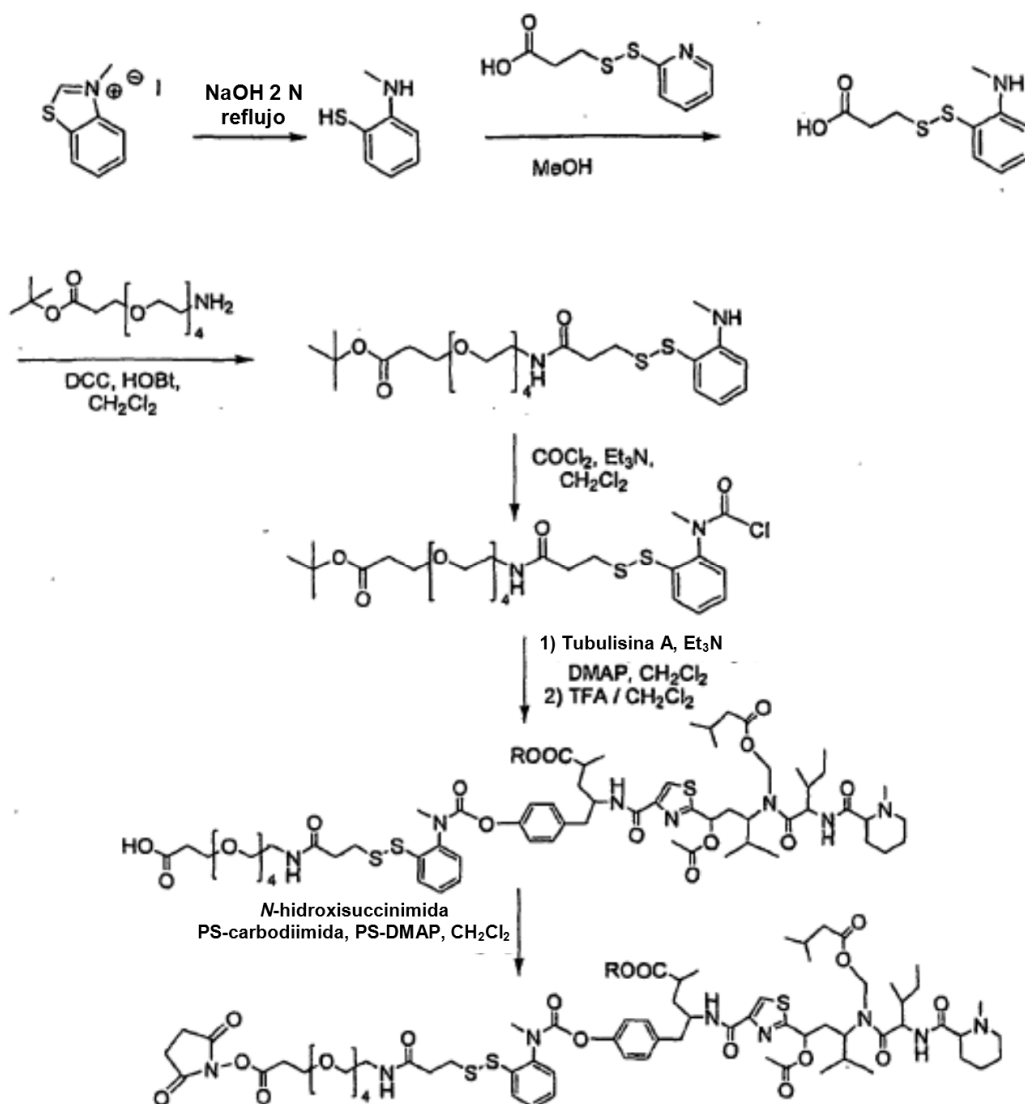
4.11 Síntesis del Compuesto 13. Se disolvió el Compuesto **12a** (23 mg, 0,022 mmol) en la solución de ácido trifluoroacético y diclorometano (1 ml, 1/1), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min y se concentró, dando el producto (21 mg, 100%). RMN de ¹H δ 2,60 (t, 2H), 2,67 y 2,68 (2s, 3H), 2,75 (m, 2H), 3,07 (m, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,38-3,64 (m, 21H), 3,76 (t, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,93 (m, 1H), 4,53 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 7,06 (d, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,31-7,43 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,87 (d, 1H), 8,10 y 8,15 (2s.a., 1H), 9,44 y 9,65 (2s, 1H); EM (EN) 986 (M+H⁺), 1008 (M+Na⁺), 1024 (M+K⁺).

Compuesto **13b**: RMN de ¹H δ 1,34 (m, 3H), 2,56 (m, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,68 (m, 3H), 2,8 (m, 1H), 3,35-3,36 (2s, 3H), 3,40-3,70 (m, 18H), 3,77 (t, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,93 y 3,95 (2s, 3H), 3,94 (m, 1H), 4,54 (m, 2H), 4,79 (m, 1H), 7,07 (d, 2H), 7,13 (s, 1H), 7,30-7,42 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,88 (d, 1H), 8,11 y 8,25 (2s.a., 1H), 9,22, 9,37, 9,80 y 9,92 (4s, 1H); EM (EN) 1000 (M+H⁺), 1022 (M+Na⁺), 1038 (M+K⁺).

Compuesto **13c**: RMN de ¹H δ 1,30-1,45 (m, 6H), 2,54 (m, 2H), 2,61 (m, 2H), 2,68 y 2,69 (2s, 3H), 3,35-3,36 (2s, 3H), 3,40-3,70 (m, 17H), 3,77 (t, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,92 y 3,93 (2s, 3H), 3,94 (m, 1H), 4,50 (m, 2H), 4,80 (m, 1H), 7,08 (m, 45 2H), 7,12 (d, 1H), 7,29-7,39 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,89 (m, 1H), 8,10 y 8,25 (2s.a., 1H), 9,88 y 10,04 (2s, 1H); EM (EN) 1014 (M+H⁺), 1036 (M+Na⁺), 1054 (M+K⁺).

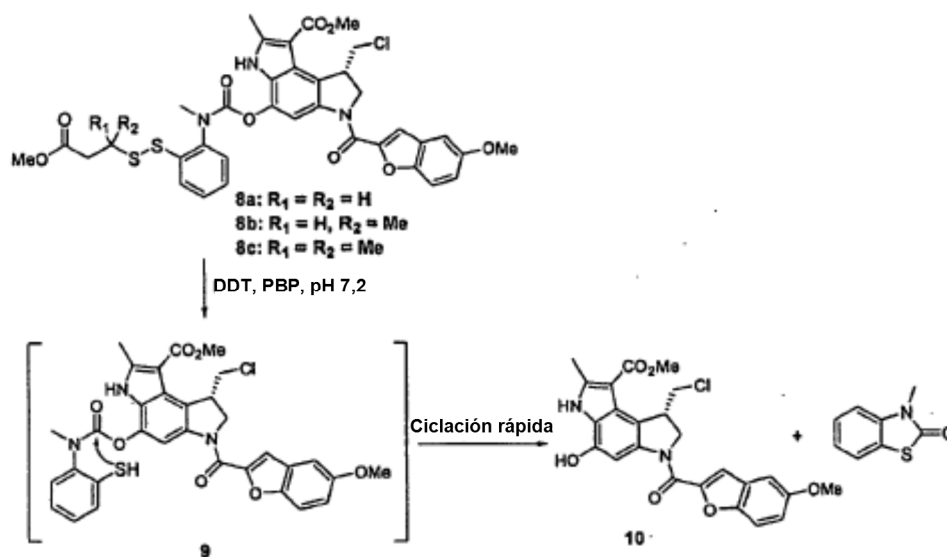
4.1m Síntesis del Compuesto 14a. A una solución del Compuesto **13a** (5,4 mg, 0,0054 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadieron PS-carbodiimida (11,5 mg, 0,94 mmol/g, 0,0108 mmol), y PS-DMAP (7,2 mg, 1,49 mmol/g, 0,0108 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche, se filtró y se concentró, dando el producto. EM (EN) 1082 (M+H⁺).

4.2 Síntesis del engarce de disulfuro conjugado con tubulicina A



El fármaco tubulicina A se puede conjugar con el engarce de disulfuro de la presente invención mediante el mecanismo mostrado anteriormente en la presente memoria. Con esquemas de reacción similares, se pueden sintetizar otros fármacos y otros engarces de la presente invención.

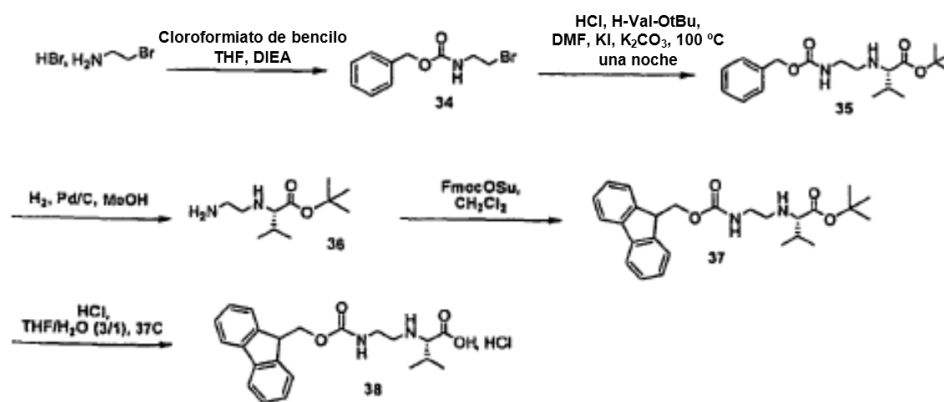
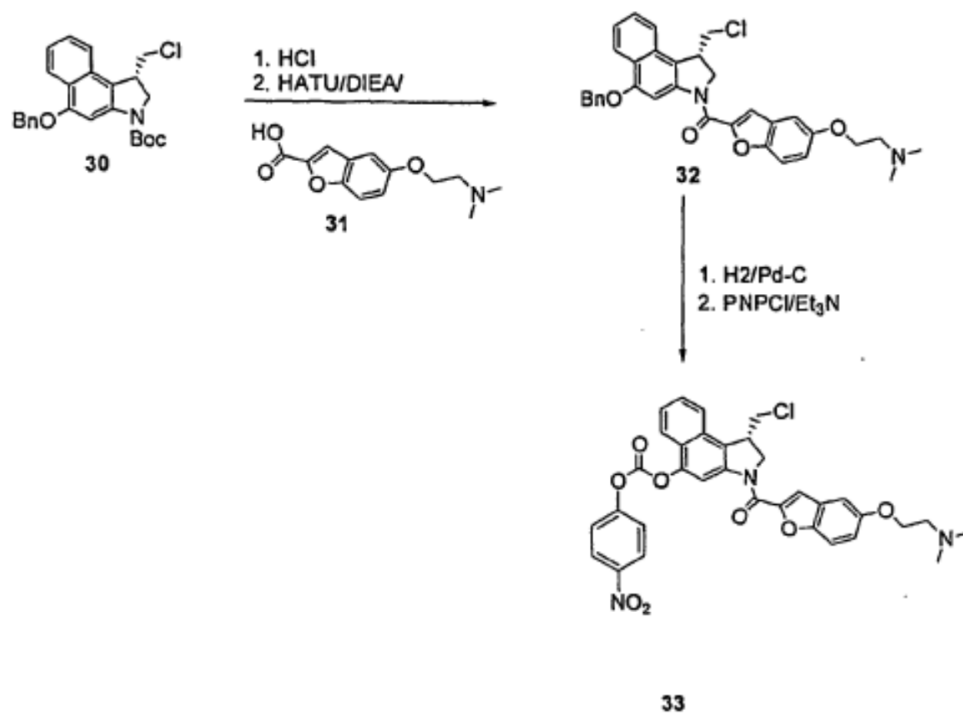
4.3 Velocidad de ciclación del engarce de disulfuro

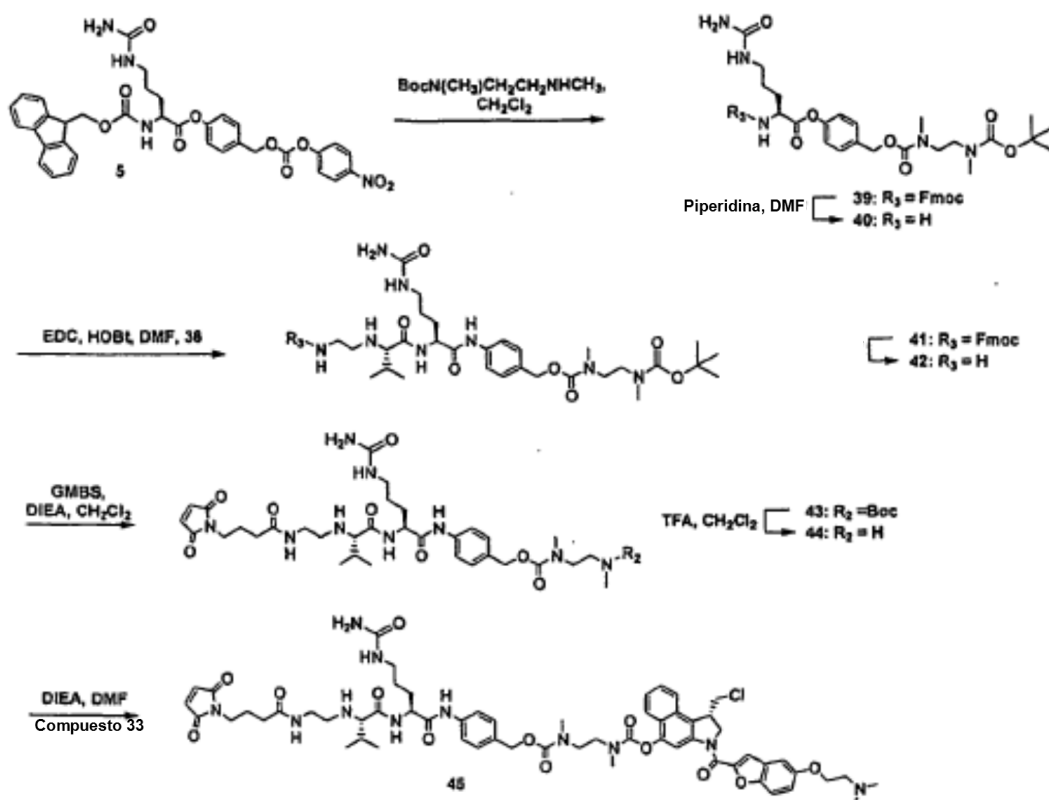


A una solución del Compuesto **8a** (0,1 mg) en solución de tampón de PBS (pH 7,2)/metanol (300 μ l, 2/1), se añadió una solución 20 mM de DTT (100 μ l, 15 equiv.) y se controló el progreso de la reacción mediante HPLC. La reacción sufrió una ciclación rápida, completándose en unos cuantos segundos, dando el producto 10 cuantitativamente. No se detectó el producto de reacción 9.

5

Ejemplo 5 (Ejemplo de referencia)





Síntesis del Compuesto 32. A una solución del Compuesto 30 (120 mg, 0,28 mmol) en acetato de etilo (10 ml), se borboteó HCl gaseoso durante 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otros 30 minutos y, a continuación, la mezcla se concentró. Se añadió éter a la mezcla de reacción y se recogió el precipitado de color blanco sobre un embudo de filtración. El sólido se secó durante una noche al vacío, proporcionando 100 mg del producto deseado, que se confirmó mediante CL-EM (IEN) 324 ($\text{M}+\text{H}^+$) y se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. A una solución de este compuesto (100 mg, 0,24 mmol) en DMF (5 ml) se añadieron el Compuesto 31 (65 mg, 0,26 mmol), HATU (100 mg, 0,26 mmol) y TEA (91 μl , 0,52 mmol). La mezcla así obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo sobre HPLC semi-preparativa con TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo como eluyente, dando el Compuesto 32 en forma de un aceite (110 mg, 80%). El producto deseado se confirmó mediante CL-EM 555 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Síntesis del Compuesto 33. Se agitó una solución del Compuesto 32 (110 mg, 0,2 mmol) en paladio sobre carbón vegetal (20 mg) en DCM (10 ml) en metanol (5 ml) bajo presión atmosférica de hidrógeno a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el paladio, y se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo sobre HPLC semi-preparativa con TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto deseado en forma de un aceite (80 mg, 78%). CL-EM (IEN) 465 ($\text{M}+\text{H}^+$). A una solución del residuo (80 mg, 0,17 mmol) en diclorometano (10 ml) y THF (5 ml), se añadió PNPCl (clorofornio de 4-nitrofenilo) (137 mg, 0,68 mmol) y trietilamina (144 μl , 1,02 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla así obtenida durante 30 minutos a 0°C y, a continuación, a temperatura ambiente durante 12 horas. Se concentró la mezcla de reacción al vacío, y se precipitó el residuo usando éter etílico (100 ml), dando el compuesto 33 en forma de un sólido de color amarillo (90 mg, 82%), que se secó al vacío y se confirmó mediante CL-EM (IEN) 631 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Síntesis del Compuesto 34: A una solución de bromuro de 2-bromoetilamina (5 g, 24,4 mmol) en DMF (50 ml), se añadió diisopropiletilamina (8,5 g, 48,8 mmol) y clorofornio de bencilo (3,48 ml, 24,4 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (3/7) como eluyente, dando el compuesto deseado 34 en forma de un aceite (4 g, 64%). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 3,54 (s.a., 2H), 3,61 (s.a., 2H), 5,12 (s, 2H), 7,36 (m, 5H).

Síntesis del Compuesto 35. A una solución del Compuesto 34 (3,34 g, 12,99 mmol) y *tert*-butiléster de valina (3,27 g, 15,59 mmol) en DMF (50 ml), se añadió carbonato de potasio (5,39 g, 38,97 mmol) y yoduro de potasio (2,59 g, 15,59 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a 100 °C durante una noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (2/8) como eluyente, dando el compuesto deseado 35 en forma de un aceite (3,12 g, 69%). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 0,92 (m, 6H), 1,46 (s, 9H), 1,86 (m, 1H), 2,53 (m, 1H), 2,80 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 5,25

(s.a., 1H), 7,36 (m, 5H); CL-EM (IEN) 296 (M+H-*t*-butilo⁺), 352 (M+H⁺).

Síntesis del Compuesto 36. Se agitó una solución del Compuesto **35** (3,4 g, 9,72 mmol) en paladio sobre carbón vegetal (200 mg) en metanol (30 ml) bajo presión atmosférica de hidrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtró el paladio y se concentró la mezcla de reacción hasta la sequedad, dando el compuesto deseado **36** en forma de un aceite (2,1 g, 98%)

Síntesis del Compuesto 37. A una solución del Compuesto **36** (2,1 g, 9,72 mmol) en diclorometano (30 ml), se añadió FmocOSu (9-fluorenilmetoxicarbonil-*N*-hidroxisuccinimida-éster) (3,28 g, 9,72 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla así obtenida durante 2 horas a 0 °C. Se eliminaron los disolventes en el evaporador rotatorio, y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano, seguido de metanol al 0,5% en diclorometano y, finalmente, metanol al 1% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto deseado **37** en forma de un aceite incoloro (2,55 g, 60%). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 0,95 (ft, 6H), 1,48 (s, 9H), 1,90 (m, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,82 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,37 (m, 2H), 5,40 (s.a., 1H), 7,30 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,60 (d, 2H), 7,75 (d, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 383 (M+H-*t*-butilo⁺), 440 (M+H⁺), 462 (M+Na⁺), 478 (M+K⁺).

Síntesis del Compuesto 38. A una solución del Compuesto **37** (177 mg, 0,4 mmol) en tetrahidrofurano-agua (3/1, 8 ml), se borboteó HCl gaseoso durante 5 min. Se agitó la mezcla de reacción a 37 °C durante una noche y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando el compuesto deseado **38** en forma de sólido (168 mg, 98%) que se confirmó mediante CL-EM (IEN) 383 (M+H⁺), 405 (M+Na⁺) y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL-EM (IEN) 383 (M+H⁺), 405 (M+Na⁺).

Síntesis del Compuesto 39. A una solución del Compuesto **5** (525 mg, 0,79 mmol) en DMF (5 ml) se añadió *N*-Boc-*N,N'*-dimetiletilenediamina (177 mg, 0,94 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 30 min. Se eliminó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano, seguido de metanol al 2% en diclorometano y, finalmente, de metanol al 5% en diclorometano como eluyente, dando el compuesto deseado **39** en forma de un aceite incoloro (364 mg, 65%). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 1,39 (s, 9H), 1,56 (m, 2H), 1,70 (m, 1H), 1,82 (m, 1H), 2,70 y 2,82 (2s, 3H), 2,90 (s, 3H), 3,09 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 3,30 a 3,37 (m, 4H), 4,16 (t, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,33 (d, 2H), 5,02 (s.a., 2H), 7,24 a 7,36 (m, 6H), 7,51 a 7,65 (m, 4H), 7,74 (d, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 618 (M+H-Boc⁺), 662 (M+H-*t*-butilo⁺), 718 (M+H⁺), 740 (M+Na⁺), 1435 (2M+H⁺).

Síntesis del Compuesto 40. El Compuesto **40** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **17a** en un rendimiento del 98%. CL-EM (IEN) 396 (M+H-Boc⁺), 496 (M+H⁺), 517 (M+Na⁺), 533 (M+K⁺), 992 (2M+H⁺).

Síntesis del Compuesto 41. A una solución del Compuesto **40** (138 mg, 0,28 mmol) en DMF (4 ml), se añadieron el Compuesto **38** (110 mg, 0,28 mmol), HOBt (36 mg, 0,28 mmol) y EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (50 mg, 0,28 mmol)). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo sobre HPLC semi-preparativa con TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto deseado **41** en forma de un aceite (178 mg, 70%). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 1,04 y 1,11 (2d, 6H), 1,40 (s, 9H), 1,58 (m, 2H), 1,77 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 2,24 (m, 1H), 2,72 y 2,84 (2s, 3H), 2,92 (s, 3H), 3,10 a 3,18 (m, 4H), 3,35 a 3,46 (m, 6H), 3,82 (d, 1H), 4,22 (t, 1H), 4,41, (m, 2H), 4,59 (m, 1H), 5,04 (s.a., 2H), 7,28 a 7,40 (m, 6H), 7,55 (m, 2H), 7,63 (m, 2H), 7,78 (d, 2H) ppm; CL-EM (IEN) 760 (M+H-Boc⁺), 804 (M+H-*t*-butilo⁺), 860 (M+H⁺), 882 (M+Na⁺), 899 (M+K⁺).

Síntesis del Compuesto 42. El Compuesto **42** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **17a** en un rendimiento del 98%. CL-EM (IEN) 538 (M+H-Boc⁺), 582 (M+H-*t*-butilo⁺), 638 (M+H⁺), 660 (M+Na⁺).

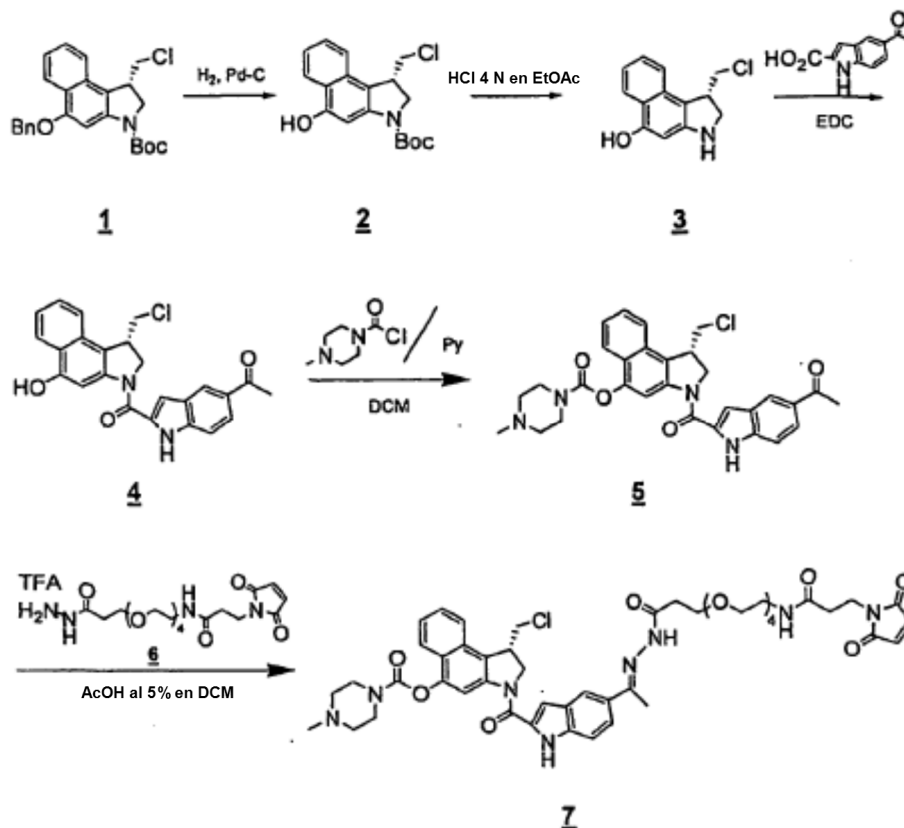
Síntesis del Compuesto 43. A una solución del Compuesto **42** (23 mg, 0,036 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadieron GMBS (*N*-(maleimidobutiriloxi)succinimida-éster) (14 mg, 0,05 mmol) y diisopropiletilamina (8,4 µl, 0,05 mmol) a 0 °C. Se calentó la mezcla hasta la sequedad y se purificó el residuo sobre HPLC semi-preparativa con TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto deseado **43** en forma de un aceite (26 mg, 79%). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 1,06 y 1,12 (2d, 6H), 1,41 (s, 9H), 1,59 (m, 2H), 1,78 (m, 1H), 1,86 a 1,93 (m, 3H), 2,24 (m, 3H), 2,74 y 2,84 (2s, 3H), 2,93 (s.a., 3H), 3,13 a 3,22 (m, 4H), 3,40 a 3,60 (m, 8H), 3,82 (d, 1H), 4,60 (m, 1H), 5,05 (s.a., 2H), 6,80 (s, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,57 (d, 2H), 8,78 (d, 1H) ppm; CL-EM (IEN) 703 (M+H-Boc⁺), 747 (M+H-*t*-butilo⁺), 803 (M+H⁺), 825 (M+Na⁺), 841 (M+K⁺).

Síntesis del Compuesto 44. El Compuesto **44** se preparó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto **15a** en un rendimiento del 98%. CL-EM (IEN) 703 (M+H⁺), 725 (M+Na⁺).

Síntesis del Compuesto 45. A una solución del Compuesto **44** (15 mg, 0,016 mmol) y el Compuesto **33** (10 mg, 0,016 mmol) en DMF (0,8 ml), se añadió diisopropiletilamina (5,5 µl, 0,032 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante una noche. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo sobre HPLC semi-preparativa con TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo como eluyente, dando el compuesto deseado **45** en forma de un aceite (10 mg, 45%). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 1,02 a 1,13 (m, 6H), 1,55 (m, 2H), 1,74 (m, 1H), 1,84 a 1,92 (m, 3H), 2,20 a 2,27 (m, 3H), 2,95 a 3,14 (m, 16H), 3,47 a 3,84 (m, 12H), 3,98 (m, 1H), 4,2 a 4,34 (m, 3H), 4,57 (m, 1H), 4,69 (m, 2H), 5,07 a 5,17 (m, 2H), 6,78 (s, 2H), 7,16 a 7,23 (m, 3H), 7,30 (m, 1H), 7,38 a 7,47 (m, 3H),

7,52 a 7,58 (m, 3H), 7,81 a 7,92 (m, 2H), 8,25 (s.a., 1H) ppm; CL-EM (IEN) 1.194 (M+H⁺), 1.215 (M+Na⁺), 1.233 (M+K⁺).

Ejemplo 6



5 **Síntesis del Compuesto (2).** Se desgasificó una solución de 1 (100 mg, 0,24 mmol) y Pd-C al 10% (35 mg) en MeOH/CH₂Cl₂ (1/2, 10 ml) al vacío durante 40 s. Se colocó la mezcla resultante bajo una atmósfera de hidrógeno y se agitó a 25 °C durante 7 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de celita (lavada con CH₂Cl₂). Se eliminó el disolvente al vacío. La cromatografía sobre gel de sílice eluida con EtOAc/Hex (2/8) proporcionó 2 (77 mg, 98%).
 10 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 10,36 (s, 1H), 8,04 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,72 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,61 (s.a., 1H), 7,45 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 7,261 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 4,06 (m, 4H), 3,73 (m, 1H), 1,52 (s, 9H).

Síntesis del Compuesto (4). Se agitó una solución de 2 (35 mg, 0,1 mmol) en HCl-EtOAc 4 M (5 ml) a 25 °C bajo Ar durante 30 min. Se eliminó el disolvente al vacío. Al residuo, se añadió ácido 5-acetilindona-2-carboxílico (24,4 mg, 0,12 mmol). Se añadió una solución de EDC (22,9 mg, 0,12 mmol) en DMF (3 ml) y se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante 5 h. Se eliminó el disolvente. Se cromatografió el producto en bruto sobre gel de sílice eluido con MeOH al 10% en CH₂Cl₂, dando 4 (40,7mg, 93%).
 15 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 12,03 (s, 1H), 10,47 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,10 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,96 (s.a., 1H), 7,85 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,54 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,51 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 7,36 (t, 1H, J = 7,6), 7,35 (s, 1H), 4,81 (t, 1H, 11,2 Hz), 4,54 (dd, 1H, 8,8 Hz), 4,23 (m, 1H), 4,01 (dd, 1H, J = 10,2 Hz), 3,86 (dd, 1H, J = 10,7 Hz), 2,61 (s, 3H).

Síntesis del Compuesto (5). Se añadió clorhidrato de cloruro de 4-metil-1-piperazin-carbonilo (19,9 mg, 0,1 mmol) a una solución de 4 (20 mg, 0,05 mmol) y piridina anhidra (25 µl, 0,3 mmol) en alcohol alílico al 3% en cloruro de metileno seco (4 ml) y se agitó la mezcla durante 16 h. La purificación del producto en bruto sobre gel de sílice proporcionó 5 (23,6 mg, 91%).
 20 RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 12,03 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 8,01 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,82 (dd, 1H, J = 8,4 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 8,1 Hz), 7,51 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,46 (t, 1H, J = 7,6 Hz), 7,37 (s, 1H), 4,86 (t, 1H, J = 10,8 Hz), 4,57 (dd, 1H, J = 10,8 Hz), 4,38 (m, 1H), 4,06 (dd, 1H, J = 10,8 Hz), 3,86 (dd, 1H, J = 11 Hz), 3,41 (a, 4H), 3,29 (a, 4H), 2,82 (s, 3H), 2,57 (s, 3H).

Síntesis del Compuesto (7). Se agitó una solución de 5 (13 mg, 24 µmol) y engarce 6 (16,9 mg, 31 µmol) en ácido acético al 5% en cloruro de metileno seco (1 ml) durante 30 min a 25 °C. Se eliminó completamente el disolvente al vacío y se purificó mediante HPLC (SymmetryPrep C₁₈, columna de 7 µm, 19 x 150 mm), dando 7 (18,5 mg, 81%).
 25 EM: calc. para C₄₈H₅₇ClN₈O₁₁ (M+H) *m/z* 958,38; encontrada: 958,10.

Síntesis del Compuesto 1

A una solución de bromuro de 2-bromoetilamina (5 g, 24,4 mmol) en DMF (50 ml), se añadió diisopropiletilamina (8,5 ml, 48,8 mmol) y cloroforniato de bencilo (3,48 ml, 24,4 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (3/7) en forma de gradiente, dando el Compuesto 1 en forma de un aceite (4 g, 64%). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 3,54 (s.a., 2H), 3,61 (s.a., 2H), 5,12 (s, 2H), 7,36 (m, 5H).

Síntesis del Compuesto 2

A una solución del Compuesto 1 (3,34 g, 12,99 mmol) y *terc*-butiléster de valina (3,27 g, 15,59 mmol) en DMF (50 ml), se añadieron carbonato de potasio (5,39 g, 38,97 mmol) y yoduro de potasio (2,59 g, 15,59 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a 100 °C durante una noche. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos (2/8) en forma de gradiente, dando el Compuesto 2 en forma de un aceite (3,12 g, 69%). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 0,92 (m, 6H), 1,46 (s, 9H), 1,86 (m, 1H), 2,53 (m, 1H), 2,80 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,31 (m, 5 1H), 5,10 (s, 2H), 5,25 (s.a., 1H), 7,36 (m, 5H); CL-EM (IEN) 296 ($\text{M}+\text{H}-t\text{-butilo}^+$), 352 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Síntesis del Compuesto 3

Se colocó una solución del Compuesto 2 (3,4 g, 9,72 mmol) y paladio sobre carbón vegetal (200 mg) en metanol (30 ml) bajo presión atmosférica de hidrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtró el paladio y se concentró la mezcla de reacción hasta la sequedad, dando el Compuesto 3 en forma de un aceite (2,1 g, 98%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 0,94 (m, 6H), 1,47 (s, 9H), 1,63 (s.a., 2H), 1,90 (m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,73 (m, 2H).

Síntesis del Compuesto 4

A una solución del Compuesto 3 (2,1 g, 9,72 mmol) en diclorometano (30 ml), se añadió FmocOSu (*N*-(9-fluorenilmetoxycarboniloxi)succinimida (3,28 g, 9,72 mmol) a 0 °C. Se agitó la mezcla así obtenida durante 2 horas a 0 °C. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y luego se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con diclorometano al 100%, seguido de metanol al 0,5% en diclorometano y, finalmente, metanol al 1% en diclorometano en forma de gradiente, dando el Compuesto 4 en forma de un aceite incoloro (2,55 g, 60%). ^1H -NMR (CDCl_3) δ 1,03 (d, 3H), 1,14 (d, 3H), 1,52 (s, 9H), 2,28 (m, 1H), 3,14 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 3,89 (d, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,44 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,64 (m, 2H), 7,80 (d, 2H); CL-EM (IEN) 383 ($\text{M}+\text{H}-t\text{-butilo}^+$), 440 ($\text{M}+\text{H}^+$), 462 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 478 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto 5

A una solución del Compuesto 4 (177 mg, 0,4 mmol) en tetrahidrofurano-agua (3/1, 8 ml), se borboteó HCl gaseoso durante 5 min. Se agitó la mezcla de reacción a 37 °C durante una noche y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando el Compuesto 5 en forma de sólido (168 mg, 98%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN de ^1H (CDCl_3) δ 1,04 (d, 3H), 1,14 (d, 3 H), 2,32 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 3,95 (d, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,42 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,64 (m, 2H), 7,79 (d, 2H); CL-EM (IEN) 383 ($\text{M}+\text{H}^+$), 405 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Síntesis del Compuesto 23

Se colocó una solución de etil-5-nitroindol-2-carboxilato (2 g, 8,5 mmol) y paladio sobre carbón vegetal (200 mg) en metanol al 50% en diclorometano (100 ml) bajo presión atmosférica de hidrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se filtró el paladio y se concentró la mezcla de reacción hasta la sequedad, dando el Compuesto 23 en forma de un aceite incoloro (1,68 g, 97%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,38 (t, 3H), 4,34 (c, 2H), 6,86 (dd, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,98 (d, 1H), 7,25 (d, 1H).

Síntesis del Compuesto 24

A una solución del Compuesto 23 (300 mg, 1,47 mmol) en diclorometano (5 ml), se añadió Boc_2O (385 mg, 1,76 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo al 10% en hexanos en forma de gradiente, dando el Compuesto 24 en forma de un sólido blanco (272 mg, 61%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,39 (t, 3H), 1,52 (s, 9H), 4,37 (c, 2H), 7,07 (s, 1H), 7,23 (dd, 1H), 7,34 (d, 1H), 7,68 (s.a., 1H).

Síntesis del Compuesto 25

A una solución del Compuesto 24 (100 mg, 0,33 mmol) en etanol (3 ml), se añadió una solución de LiOH (12 mg, 0,49 mmol) en agua (1 ml). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 2 horas a 50 °C. Se concentró la mezcla de reacción hasta la sequedad, dando un aceite. Se disolvió el residuo en agua y se acidificó hasta un pH 3 con HCl al 10%, seguido de la extracción con EtOAc. Se secó la solución orgánica sobre Na_2SO_4 , se

filtró y se concentró hasta la sequedad, dando el Compuesto **25** en forma de un aceite incoloro (85 mg, 92%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,51 (s, 9H), 7,07 (d, 1H), 7,23 (dd, 1H), 7,33 (d, 1H), 7,68 (s.a., 1H).

Síntesis del Compuesto **26**

- 5 A una solución de Fmoc-Cit-OH (206 mg, 0,52 mmol) en solución de DMF al 30% en diclorometano (3 ml), se añadieron EDC (120 mg, 0,62 mmol), HOBt (84 mg, 0,62 mmol) y *tert*-butil-4-amino-benzoato (120 mg, 0,62 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida durante 10 minutos, y luego se añadió cloruro de cobre (84 mg, 0,62 mmol) a la mezcla. Se agitó la mezcla durante una noche. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y luego se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5% en diclorometano en forma de gradiente, dando el Compuesto **26** en forma de un aceite incoloro (184 mg, 62%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,53-1,58 (m, 2H), 1,57 (s, 9H), 1,71 (m, 1H), 1,82 (m, 1H), 3,08 (m, 1H), 3,19 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 4,38 (m, 2H), 7,28-7,39 (m, 3H), 7,49 (m, 2H), 7,56-7,86 (m, 5H), 7,89 (m, 2H); CL-EM (IEN), 573 ($\text{M}+\text{H}^+$), 595 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 611 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto **27**

- 15 A una solución del Compuesto **26** (1 g, 1,75 mmol) en DMF (18 ml), se añadió piperidina (2 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y luego se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida con diclorometano al 100%, seguido de metanol al 5% en diclorometano y, finalmente, metanol al 20% en diclorometano en forma de gradiente, dando un aceite incoloro (561 mg, 92%).

- 20 A una solución del aceite (561 mg, 1,6 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron diisopropiletilamina (679 μl , 3,9 mmol), el compuesto **5** (509 mg, 1,3 mmol) (véase el Ejemplo 1 para la preparación) y HATU (494 mg, 1,3 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 3 horas. Se concentró la mezcla hasta la sequedad y luego se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con metanol al 5% en diclorometano en forma de gradiente, dando el Compuesto **27** en forma de un aceite incoloro (691 mg, 65%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,36 (dd, 6H), 1,58-1,62 (m, 2H), 1,6 (s, 9H), 1,71 (m, 1H), 1,82 (m, 1H), 2,00 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 3,2-3,3 (m, 4H), 3,70 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,28 (m, 2H), 4,38 (m, 2H), 4,60 (m, 1H), 7,28-7,39 (m, 4H), 7,60-7,70 (m, 4H), 7,8 (d, 2H), 7,89 (d, 2H); CL-EM (IEN), 716 25 ($\text{M}+\text{H}^+$), 737 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 753 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto **28**

- 30 A una solución del Compuesto **27** (300 mg, 0,45 mmol) en DMF (9 ml), se añadió piperidina (1 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando un aceite que precipitó en éter (20 ml). Se filtró el material, dando un sólido blanco (186 mg, 84%).

- 35 A una solución de la amina libre (32 mg, 0,065 mmol) en diclorometano (1 ml), se añadió MAL-PEG₄-NH-éster (50 mg, 0,097 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 4 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante HPLC semi-preparativa, dando el Compuesto **28** en forma de un aceite (47 mg, 95%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,10 y 1,15 (2d, 6H), 1,58-1,62 (m, 2H), 1,6 (s, 9H), 1,75 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,45 (t, 2H), 2,5 (t, 2H), 3,10-3,25 (m, 4H), 3,30 (m, 2H), 3,45-3,65 (m, 16H), 3,75 (m, 4H), 3,85 (d, 1H), 4,65 (m, 1H), 6,80 (s, 2H), 7,67 (d, 2H), 7,90 (d, 2H), 8,80 (d, 1H), 10,20 (s, 1H); CL-EM (IEN), 891 ($\text{M}+\text{H}^+$), 913 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 929 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto **29**

- 40 A una solución del Compuesto **28** (47 mg, 0,062 mmol) en diclorometano (0,5 ml), se añadió ácido trifluoroacético (0,5 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando el Compuesto **29** en forma de un aceite que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (40 mg, 92%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,10 y 1,15 (2d, 6H), 1,60 (m, 2H), 1,80 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,45 (t, 2H), 2,5 (t, 2H), 3,10-3,25 (m, 4H), 3,30 (m, 2H), 3,45-3,65 (m, 16H), 3,75 (m, 4H), 3,85 (d, 1H), 4,65 (m, 1H), 6,80 (s, 2H), 7,67 (d, 2H), 7,95 (d, 2H), 8,80 (d, 1H); CL-EM (IEN), 836 ($\text{M}+\text{H}^+$), 858 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 874 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto **31**

- 50 A una solución de **30** (100 mg, 0,2 mmol) en EtOAc (2 ml), se añadió una solución de HBr concentrado en EtOAc (3 ml) a temperatura ambiente. La desprotección de Boc se completó tras 1 hora. Se filtró el material precipitado (rendimiento cuantitativo). A continuación, se disolvió la amina salada con TFA en DMF (3 ml). A esta solución, se añadieron el Compuesto **25** (55 mg, 0,2 mmol), diisopropiletilamina (173 μl , 1 mmol) y HATU (79 mg, 0,2 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 3 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante HPLC semi-preparativa, dando el Compuesto **31** en forma de un sólido blanco (86 mg, 57%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,54 (s, 9H), 2,91 (s, 3H), 3,10-3,60 (m, 8H), 3,72 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 4,30-4,60 (m, 3H), 6,94 (s.a., 1H), 7,05 (m, 1H), 7,12 (d, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,68 (d, 1H), 7,75 (s.a., 1H), 7,86 (d, 1H), 8,23 (s.a., 1H); CL-EM (IEN), 562 ($\text{M}+\text{H}-100^+$), 606 ($\text{M}+\text{H}-56^+$), 662 ($\text{M}+\text{H}^+$), 685 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 701 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Síntesis del Compuesto 32

A una solución del Compuesto **31** (30 mg, 0,039 mmol) en diclorometano (0,5 ml), se añadieron anisol (100 μ l) y ácido trifluoroacético (0,4 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se concentró la mezcla hasta la sequedad, dando un aceite que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución del aceite en DMF (1 ml), se añadieron el Compuesto **29** (36 mg, 0,039 mmol), diisopropiletilamina (40 μ l, 0,23 mmol) y HATU (15 mg, 0,039 mmol). Se agitó la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante HPLC semi-preparativa, dando el Compuesto 32 en forma de un aceite (36 mg, 60%). RMN de ^1H (CD_3OD) δ 1,09 y 1,15 (2d, 6H), 1,62 (m, 2H), 1,81 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,45 (t, 2H), 2,51 (t, 2H), 2,98 (s, 3H), 3,13-3,25 (m, 4H), 3,47-3,62 (m, 24H), 3,76 (m, 4H), 3,82 (m, 1H), 3,85 (d, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,55-4,70 (m, 4H), 6,79 (s, 2H), 7,06 (s, 1H), 7,36 (s.a., 1H), 7,43-7,54 (m, 2H), 7,72-7,81 (m, 3H), 7,91 (m, 3H), 8,05 (s, 1H), 8,25 (s.a., 1H), 8,82 (d, 1H), 10,25 (s, 1H); CL-EM (IEN), 691 ($\text{M}+2\text{H}^+$)/2, 1381 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1419 ($\text{M}+\text{K}^+$).

Ejemplo 8: Ensayos de proliferación

La actividad biológica de los compuestos citotóxicos de la invención se puede analizar mediante el ensayo de proliferación de ^3H -timidina bien establecido. Se trata de un procedimiento conveniente para la cuantificación de la proliferación celular, pues evalúa la síntesis del ADN mediante la medición de la incorporación de la ^3H -timidina radiomarcada exógena. Este ensayo es muy reproducible y se puede adaptar a grandes números de compuestos.

Para llevar a cabo el ensayo, se cultivan células de leucemia promielocítica, HL-60, en medios RPMI que contienen suero bovino fetal (FCS) desactivo con calor al 10%. El día del estudio, se recogen las células, se lavan y se vuelven a suspender a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en RPMI que contiene FCS al 10%. Se añaden 100 μ l de suspensión celular a placas de 96 pocillos. Se realizan diluciones en serie (incrementos triples) de doxorrubicina (como control positivo) o compuestos de prueba, y se añaden 100 μ l de compuestos por pocillo. Finalmente, se añaden 10 μ l de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina por pocillo y se incuban las placas durante 24 horas. Se cosechan las placas con un cosechador de 96 pocillos (Packard Instruments) y se realiza el recuento en un contador Top Count de Packard. Se ajustan curvas logísticas de cuatro parámetros a la incorporación de ^3H -timidina en función de la molaridad de fármaco mediante el programa informático Prism para determinar los valores de CI_{50} .

En general, los compuestos de la invención tienen un valor de CI_{50} en el ensayo anterior de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 nM, preferentemente de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 10 nM.

Ejemplo 9: Conjugación de moléculas de fármaco-engarce con anticuerpos

El presente ejemplo describe las condiciones de reacción y las metodologías para la conjugación de una molécula de fármaco-engarce de la invención (que incluye opcionalmente otros grupos tales como espaciadores, grupos funcionales reactivos) con un anticuerpo como agente de direccionamiento, X^4 . Las condiciones y metodologías son a título meramente ilustrativo. En la técnica, se conocen otros enfoques para la conjugación de moléculas de fármaco-engarce con anticuerpos.

El procedimiento de conjugación descrito en la presente memoria se basa en la introducción de grupos tiol libres en el anticuerpo a través de la reacción de lisinas del anticuerpo con 2-iminotiolano, seguida de la reacción de la molécula de fármaco-engarce con un grupo maleimida activo. Inicialmente, se intercambió el anticuerpo que se iba a conjugar en tampón de fosfato 0,1 M, pH 8,0, que contenía NaCl 50 mM, DTPA 2 mM, pH 8,0, y se concentró hasta 5-10 mg/ml. La tiolación se realizó mediante la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano por añadir se determinó en experimentos preliminares, y varía de un anticuerpo a otro. En los experimentos preliminares, se añadió una valoración de cantidades crecientes de 2-iminotiolano al anticuerpo y, tras una incubación con el anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente, se desaló el anticuerpo en tampón de HEPES 50 mM, pH 6,0, con una columna Sephadex G-25 y se determinó rápidamente el número de grupos tiol introducido mediante la reacción con ditiopiridina (DTDP). La reacción de los grupos tiol con DTDP produce la liberación de tiopiridina que se controla a 324 nm. Se usaron muestras a una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. Se usó la absorbancia a 280 nm para determinar con exactitud la concentración de proteína en las muestras, y luego se incubó una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. También se incubaron muestras en blanco solo de tampón más DTDP al lado. Tras 10 minutos, se midió la absorbancia a 324 nm y se cuantificó el número de tioles presente con un coeficiente de extinción de la tiopiridina de 19.800 M^{-1} .

Típicamente, se desea un nivel de tiolación de tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con un determinado anticuerpo, esto se realizó mediante la adición de un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Por tanto, el anticuerpo por conjugar se incubó con 2-iminotiolano a la proporción molar deseada y luego se desaló en tampón de conjugación (tampón HEPES 50 mM, pH 6,0, que contenía glicina 5 mM, glicerol al 3% y DTPA 2 mM). Se mantuvo el material tiolado sobre hielo mientras se cuantificaba el número de tioles introducido como se ha descrito anteriormente.

5

10

15

20

25

30



40

45

conjugados purificados resultantes en una célula agitada bajo nitrógeno, usando una membrana de corte de 10 kDa. Se determinaron las concentraciones y las proporciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) de los conjugados usando una absorbancia a 280 nm y 340 nm, como referencia a los coeficientes de extinción tanto del anticuerpo como del Compuesto A a cada longitud de onda medida previamente.

- 5 Se analizó la eficacia antitumoral de anti-PSMA (clon 2A10) conjugado con el Compuesto A en LNCaP, que es un xenoinjerto de carcinoma de próstata humano, desarrollado en ratones CB17.SCID macho (disponibles en Taconic, Germantown, NY). Se obtuvieron células cancerosas de próstata LNCaP que expresaban niveles elevados de PSMA de la ATCC (Nº de cat. CRL-1740) y se expandieron *in vitro* siguiendo las instrucciones de la ATCC. Se implantaron subcutáneamente en ratones CB17.SCID macho de 8 semanas de vida adquiridos en Taconic, en el lado derecho, 2,5 x 10⁶ células LNCaP en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Se pesaron los ratones y se midieron los tumores tridimensionalmente con un calibrador electrónico dos veces por semana, comenzando a las tres semanas de la implantación. Cada volumen tumoral se calculó como altura x anchura x longitud. Se distribuyeron aleatoriamente ratones con tumores vascularizados (determinados según el aspecto de los tumores) de tamaños apropiados en grupos de tratamiento y recibieron la dosis según el peso corporal el día 0. Se controló el crecimiento del tumor de los ratones alrededor de 60 días después de la dosificación, finalizando al terminar el estudio. Se practicó la eutanasia a los ratones cuando los tumores alcanzaron el valor final del tumor (1.500 mm³).

Tabla 1. Resumen del estudio del xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis (µmol/kg de citotóxicos)	N por grupo	Vía de dosificación	Volumen tumoral medio en el día 1 (mm ³)
Vehículo	-	3	i.p.	100
Conjugado de Ac isotipo-Comp. A	0,3	3	i.p.	100
Conjugado de 2A10-Comp. A	0,3	3	i.p.	100

- 20 Como se muestra en la Fig. 1, 0,3 µmol/kg (con respecto a los moles del Compuesto citotóxico A) del conjugado de 2A10-Compuesto A indujeron la regresión completa de los tres tumores LNCaP pequeños establecidos.

B. Estudio de dosis-respuesta

- 25 Se intercambió el anti-PSMA (2A10) con tampón de fosfato 0,1 M, pH 8,0, que contenía NaCl 50 mM, DTPA 2 mM, y se concentró hasta 5,6 mg/ml. Se tioló el anticuerpo mediante la incubación con un exceso molar de 7,5 veces de 2-iminotiolano durante una hora a temperatura ambiente, tras lo que se desaló en tampón HEPES 50 mM, pH 6,0, que contenía glicina 5 mM, DTPA 2 mM y glicerol al 3% (v/v) con una columna Sephadex G-25. Se mantuvo el anticuerpo tiolado sobre hielo mientras se determinaba el número de grupos tiol introducido. Esto se realizó mediante la reacción de una muestra de anticuerpo tiolado con ditiodipiridina (DTDP). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína de las muestras, y luego se incubó una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron muestras en blanco solo de tampón más DTDP al lado. Se midió la absorbancia a 324 nm y se cuantificó el número de tioles presente por anticuerpo con un coeficiente de extinción para la tiopiridina de 19.800 M⁻¹.

- 35 Entonces se incubó el anticuerpo tiolado con un exceso molar del doble del Compuesto A frente a la concentración molar de los grupos tiol. Se añadió el Compuesto A, solución madre 5 mM en DMSO al 10% (v/v)/dimetiléter de etilenglicol al 90% (v/v) al anticuerpo tiolado junto con suficiente dimetiléter de etilenglicol para alcanzar la concentración final del 5% (v/v). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, se purificó el conjugado de anticuerpo-Compuesto A mediante cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó la mezcla de reacción a una columna SP-Sepharose previamente equilibrada en tampón A (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 6,0). Se lavó la columna con tampón A, luego con tampón A al 95%, tampón B al 5% (HEPES 50 mM, NaCl 1 M, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2) y luego se eluyó el conjugado de anticuerpo-Compuesto A con tampón B al 10%, tampón A al 90%. Se recogieron y se combinaron las fracciones que contenían conjugado monomérico, y se ajustó el pH hasta 7,2 mediante la adición de monoetanolamina. Entonces se sometió a diálisis el conjugado purificado resultante en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2, y luego se concentró en una célula agitada bajo nitrógeno, usando una membrana de corte de 10 kDa. Se determinaron las concentraciones y las proporciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) del conjugado usando una absorbancia a 280 nm y 340 nm, como referencia a los coeficientes de extinción tanto del anticuerpo como del Compuesto A a cada longitud de onda medida previamente. El conjugado de control de isotipo (2H5 anti-CD70) se preparó mediante el mismo procedimiento, a excepción de que la elución del conjugado de la columna de intercambio iónico se realizó con tampón B al 15% y tampón A al 85%.

Se determinó la eficacia y la selectividad de los conjugados usando xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP desarrollados en ratones CH17.SCID macho como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 2, se resume el diseño del estudio de este xenoinjerto.

Tabla 2. Resumen del estudio del xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{mol/kg}$ de citotoxina)	N por grupo	Vía de dosificación	Volumen tumoral medio en el día 1 (mm^3)
Vehículo	-	9	i.p.	160
Ac isotipo-Comp. A	0,05; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,90	9	i.p.	160
2A10-Comp. A	0,05; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,90	9	i.p.	160

Como se muestra en la Tabla 2 y las Fig. 2-3, 0,15 $\mu\text{mol/kg}$ de anti-PSMA-Compuesto A (Fig. 2) tuvieron una mejor eficacia antitumoral que 0,90 $\mu\text{mol/kg}$ de control de isotipo-Compuesto A, lo que indica una selectividad de al menos > de 6 veces (Fig. 3). 0,90 $\mu\text{mol/kg}$ de anti-PSMA-Compuesto A solo mostraron una toxicidad transitoria (Fig. 5) y fue inferior a la dosis máxima tolerada. Por lo tanto, se identificó un índice terapéutico de más de 6 veces para el anti-PSM-Compuesto A en ratones que portaban tumores LNCaP.

C. Eficacia en tumores de gran tamaño

Se intercambié el anti-PSMA (2A10) con tampón de fosfato 0,1 M, pH 8,0, que contenía NaCl 50 mM, DTPA 2 mM, pH 2mM, y se concentró hasta 5,6 mg/ml. Se tioló el anticuerpo mediante la incubación con un exceso molar de 9 veces de 2-iminotiolano durante una hora a temperatura ambiente, tras lo que se desaló en tampón HEPES 50 mM, pH 6,0, que contenía glicina 5 mM, DTPA 2 mM y glicerol al 3% (v/v) con una columna Sephadex G-25. Se mantuvo el anticuerpo tiolado sobre hielo mientras se determinaba el número de grupos tiol introducido. Esto se realizó mediante la reacción de una muestra de anticuerpo tiolado con ditiodipiridina (DTDP). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína en las muestras, y luego se incubó una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron muestras en blanco solo de tampón más DTDP al lado. Se midió la absorbancia a 324 nm y se cuantificó el número de tioles presente por anticuerpo con un coeficiente de extinción para la tiopiridina de 19.800 M^{-1} .

Entonces, se incubó el anticuerpo tiolado con un exceso molar del doble del Compuesto A frente a la concentración molar de los grupos tiol. Se añadió el Compuesto A, solución madre 5 mM en DMSO al 10% (v/v)/dimetiléter de etilenglicol al 90% (v/v) al anticuerpo tiolado junto con suficiente dimetiléter de etilenglicol para alcanzar la concentración final del 5% (v/v). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, se purificó el conjugado de anticuerpo-Compuesto A mediante cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó la mezcla de reacción a una columna SP-Sepharose previamente equilibrada en HEPES 50 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 6,0 (tampón A). Se lavó la columna con tampón A, luego con tampón A al 95%, tampón B al 5% (HEPES 50 mM, NaCl 1 M, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2) y luego se eluyó el conjugado de anticuerpo-Compuesto A con tampón B al 10%, tampón A al 90%. Se recogieron y se combinaron las fracciones que contenían conjugado monomérico, y se ajustó el pH hasta 7,2 mediante la adición de monoetanolamina. Entonces se sometió a diálisis el conjugado purificado resultante en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, glicina 5 mM, glicerol al 3% (v/v), pH 7,2, y luego se concentró en una célula agitada bajo nitrógeno, usando una membrana de corte de 10 kDa. Se determinaron las concentraciones y las proporciones de sustitución (número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo) del conjugado usando una absorbancia a 280 nm y 340 nm, como referencia a los coeficientes de extinción tanto del anticuerpo como del Compuesto A a cada longitud de onda medida previamente. El conjugado de control isotipo (2H5 anti-CD70) se preparó mediante el mismo procedimiento, a excepción de que la elución del conjugado de la columna de intercambio iónico se realizó con tampón B al 15% y tampón A al 85%.

Se determinaron la eficacia y la selectividad de los conjugados usando xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP desarrollados en ratones CB17.SCID macho como se ha descrito anteriormente. En las Tablas 3 y 4, se resume el diseño de estos estudios del xenoinjerto.

Tabla 3. Resumen del estudio del xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{mol/kg}$ de citotoxina)	N por grupo	Vía de dosificación	Volumen tumoral medio en el día 1 (mm^3)
Vehículo	-	8	i.v.	240
Ac isotipo-Comp. A	0,15	8	i.v.	240
2A10-Comp. A	0,15	8	i.v.	240

Como se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 6, una sola dosis baja de 0,15 $\mu\text{mol/kg}$ de anti-PSMA-Compuesto A inhibió enormemente el crecimiento de los tumores LNCaP de gran tamaño establecidos, de tamaños medios de 240 mm^3 . Por el contrario, 0,15 $\mu\text{mol/kg}$ del control de isotipo-Compuesto A tuvieron una eficacia antitumoral mínima. Como se muestra en la Tabla 4 y en la Fig. 7, una sola dosis baja de 0,30 $\mu\text{mol/kg}$ de anti-PSMA-Compuesto A produjo la regresión e inhibió el crecimiento de los tumores LNCaP de gran tamaño, de tamaños medios de 430 mm^3 .

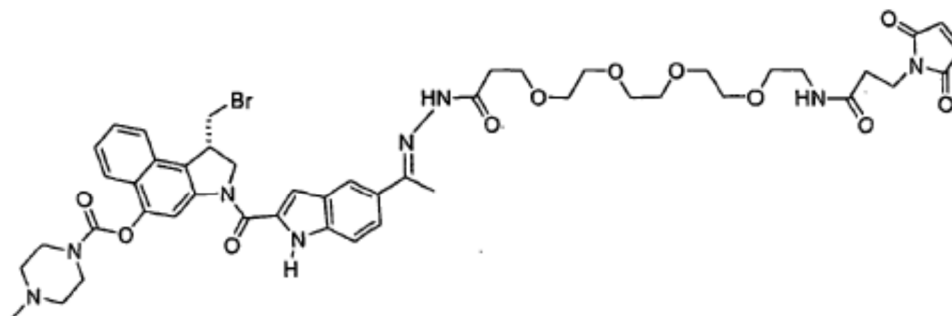
Tabla 4. Resumen del estudio del xenoinjerto LNCaP

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{mol/kg}$ de citotoxina)	N por grupo	Vía de dosificación	Volumen tumoral medio en el día 1 (mm^3)
Vehículo	-	6	i.p.	430
2A10-Comp. A	0,15, 0,30, 0,45	6	i.p.	430

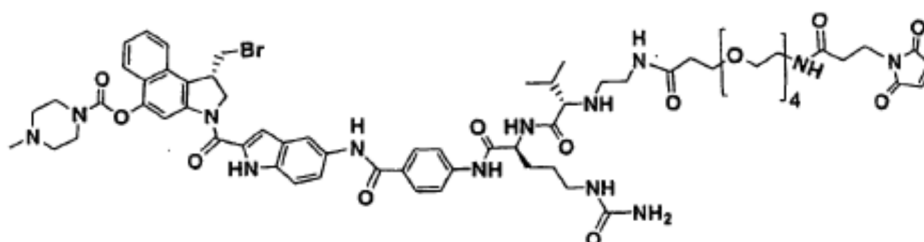
Ejemplo 11: Estudios *in vivo*

Se prepararon las siguientes muestras, en general, de acuerdo con los ejemplos proporcionados anteriormente.

Grupo	Sustancias de prueba	Conc. (mg/ml)	Proporción de sustitución	Almacenamiento
1	IgG1 control de isotipo	5,00	-	4 °C
2	Anticuerpo anti-CD70 (CD70.1)	5,00	-	4 °C
3	Anticuerpo anti-CD70 defucosilado (CD70.1 df)	5,30	-	4 °C
4	Anticuerpo anti-CD70 conjugado con toxina 1 (CD70.1-Toxina 1)	3,00	1,7	-80 °C
5	Anticuerpo anti-CD70 defucosilado conjugado con toxina 1 (CD70.1 df-Toxina 1)	2,98	1,7	-80 °C
6	Anticuerpo anti-CD70 conjugado con toxina 2 (CD70.1-Toxina 2)	2,50	1,8	-80 °C



Toxina 1



Toxina 2

Se obtuvieron cinco (5) muestras de capa leucocitaria recién recogida de donantes voluntarios sanos. Se purificaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con una centrifugación en gradiente de acuerdo con el procedimiento Ficoll-Paque® plus (Ref. 07907, StemCell Technologies, Meylan, Francia). Se evaluó la viabilidad de las células PBMC mediante exclusión con azul de tripano al 0,25% antes de realizar los análisis FACS, así como antes de la inyección *in vivo*.

Se analizaron los cinco marcadores CD enumerados en la siguiente tabla:

Antígeno	Expresión del antígeno principal
CD3	Linfocitos T
CD 14	Monocitos, macrófagos, células de Langerhans
CD16b	Solo granulocitos neutrófilos
CD20	Subconjunto de linfocitos B precursores, linfocitos B
CD56	Células NK, subconjunto de linfocitos T

Se usaron dos muestras diferentes de PBMC, una primera para los grupos 1 a 3 (estudio de los anticuerpos desnudos) y una segunda para los Grupos 4 a 6 (estudio de los anticuerpos conjugados con toxina). Los criterios para la selección fueron el número de células total, el porcentaje más alto de CD56 y la viabilidad celular.

Se indujeron los tumores subcutáneamente mediante la inyección de 5×10^6 células 786-O en 200 μ l de RPMI 1640 en el lado derecho de 78 ratones nod-SCID. Se observó que estas células 786-O expresaron el antígeno diana CD70 mediante FACS usando el mismo anticuerpo que se usó en estos experimentos *in vivo*. El tratamiento comenzó cuando el volumen tumoral medio alcanzó los 80 mm³ (aproximadamente 15 días). Antes de comenzar los tratamientos, se distribuyeron aleatoriamente 48 ratones portadores de tumor de los 78 en los que se había realizado el injerto en 6 grupos de 8 animales. El volumen tumoral medio de cada grupo era comparable y no se diferenciaba estadísticamente del resto de grupos (análisis de varianza). Los 48 ratones distribuidos aleatoriamente recibieron una sola inyección i.p. de muestra de PBMC humanas con $3,6 \times 10^7$ células por ratón (correspondiente a $4,81 \times 10^6$ células positivas en CD56 por ratón) para los grupos 1 a 3 y $4,5 \times 10^7$ células por ratón (correspondientes a $4,79 \times 10^6$ células positivas en CD56 por ratón) para los grupos 4 a 6.

La pauta de tratamiento fue la siguiente:

Grupo	Número de ratones	Tratamiento	Dosis (mg/kg/inyección)	Volumen del tratamiento (ml) (ratón de 25 g)	Vía de administración	Pauta de tratamiento
1	8	IgG1 control de isotipo	15	0,250	i.p.	Q4Dx
2	8	Anticuerpo anti-CD70	15	0,250	i.p.	Q4Dx
3	8	Anticuerpo defucosilado anti-CD70	15	0,250	i.p.	Q4Dx
4	8	CD70.1-Toxina 1	0,3	0,226	i.v.	Q14Dx2
5	8	CD70.1 df - Toxina 1	0,3	0,424	i.v.	Q14Dx2
6	8	CD70.1-Toxina 2	0,3	0,085	i.v.	una sola dosis

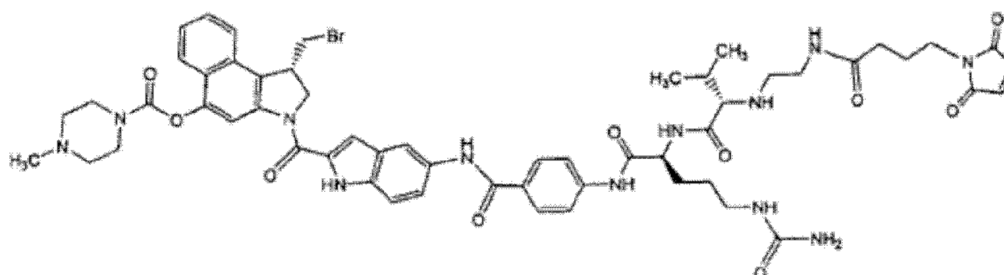
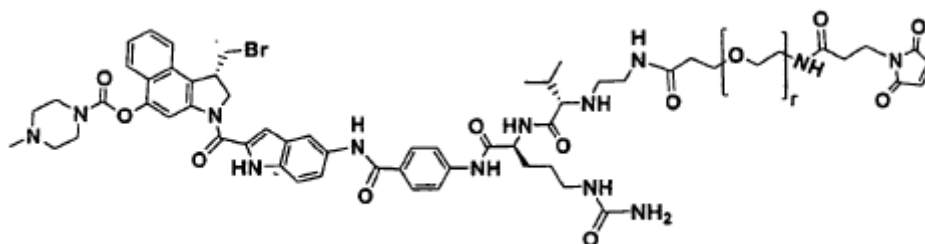
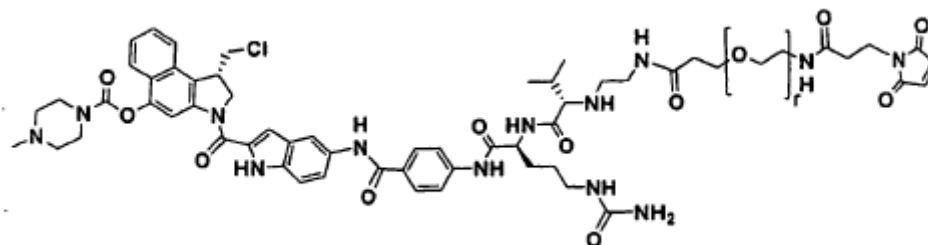
• Los ratones del grupo 1 recibieron repetidas inyecciones i.p. de IgG1 control de isotipo a 15 mg/kg/inyección siguiendo la pauta de tratamiento de Q4Dx.
 • Los ratones del grupo 2 recibieron repetidas inyecciones i.p. de anticuerpo anti-CD70 a 15 mg/kg/inyección siguiendo la pauta de tratamiento de Q4Dx.
 • Los ratones del grupo 3 recibieron repetidas inyecciones i.p. de anticuerpo defucosilado anti-CD70 a 15 mg/kg/inyección siguiendo la pauta de tratamiento de Q4Dx.
 • Los ratones del grupo 4 recibieron dos inyecciones i.v. de anticuerpo anti-CD70 conjugado con toxina 1 siguiendo la pauta de tratamiento de Q14Dx2.
 • Los ratones del grupo 5 recibieron dos inyecciones i.v. de anticuerpo defucosilado anti-CD70 conjugado con toxina 1 siguiendo la pauta de tratamiento de Q14Dx2.
 • Los ratones del grupo 6 recibieron una sola inyección i.v. de anticuerpo anti-CD70 conjugado con toxina 2.

La Fig. 8 ilustra el tamaño tumoral durante el estudio. Todas las toxinas conjugadas con anticuerpo produjeron una disminución del tamaño tumoral, particularmente en comparación con el crecimiento sin ninguna toxina. La Fig. 9 ilustra el peso corporal durante el estudio.

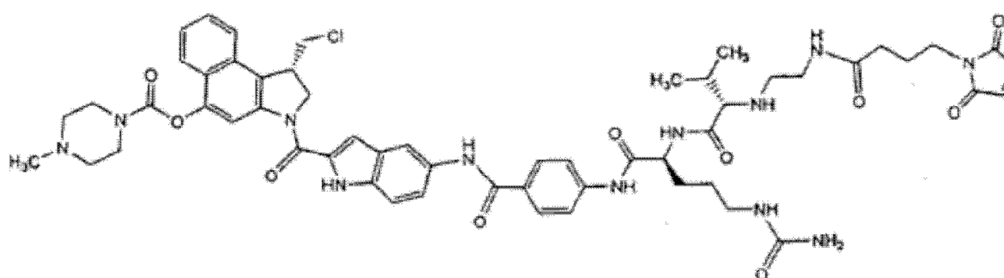
5

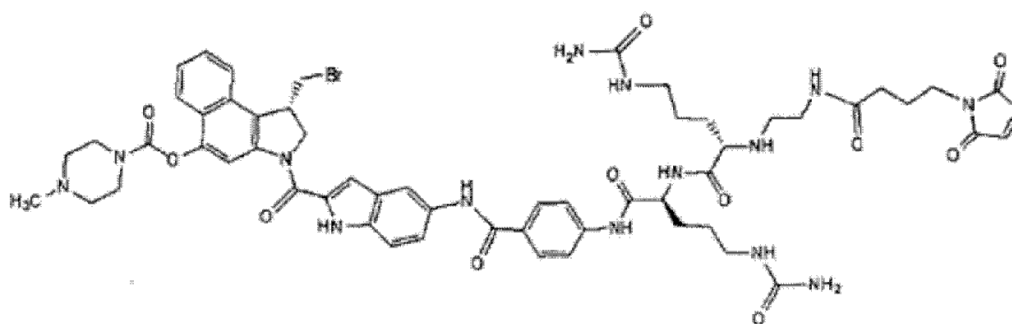
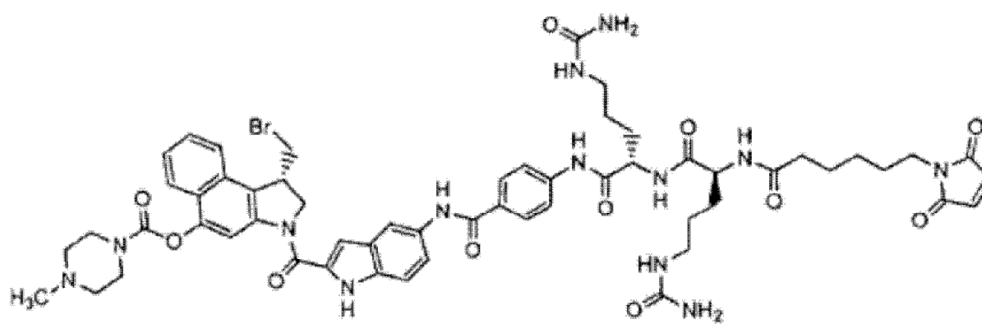
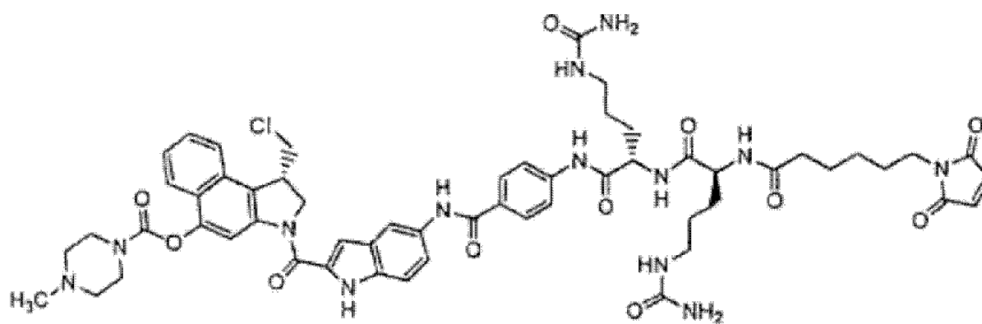
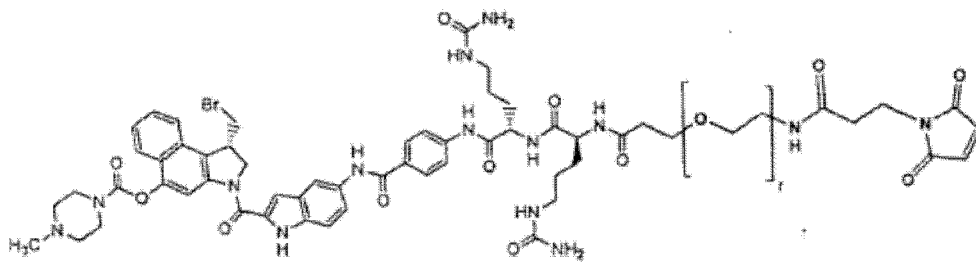
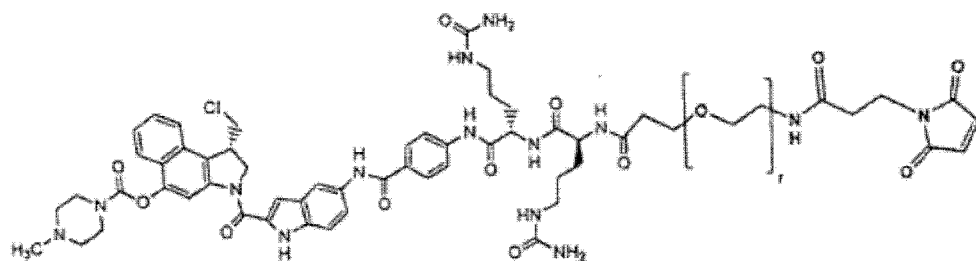
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de entre:

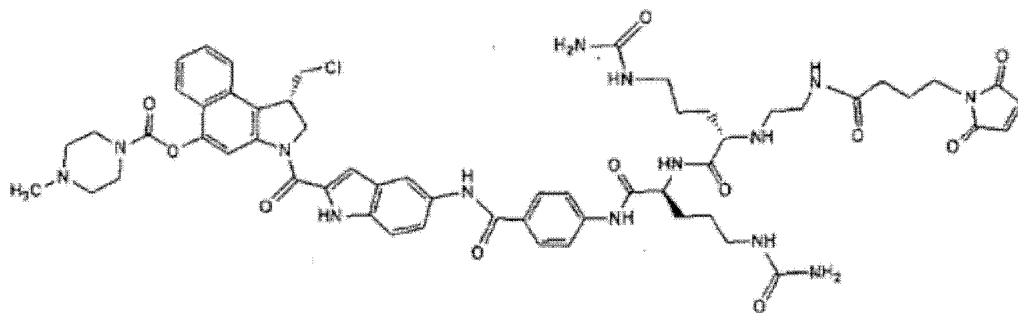


y





y



en los que r es un número entero que varía de 0 a 24.

2. Un procedimiento para preparar un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende la conjugación del compuesto de la reivindicación 1 con un anticuerpo o un fragmento del mismo.
- 5 3. Un conjugado de anticuerpo-fármaco preparado mediante el procedimiento de la reivindicación 2.
4. Una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o el conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. El conjugado de anticuerpo-fármaco de la reivindicación 3 para su uso en terapia.

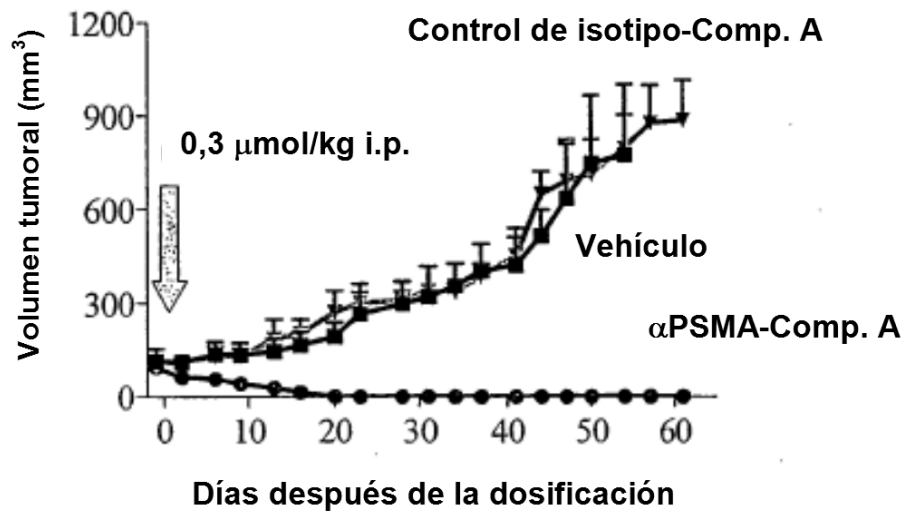


Fig. 1

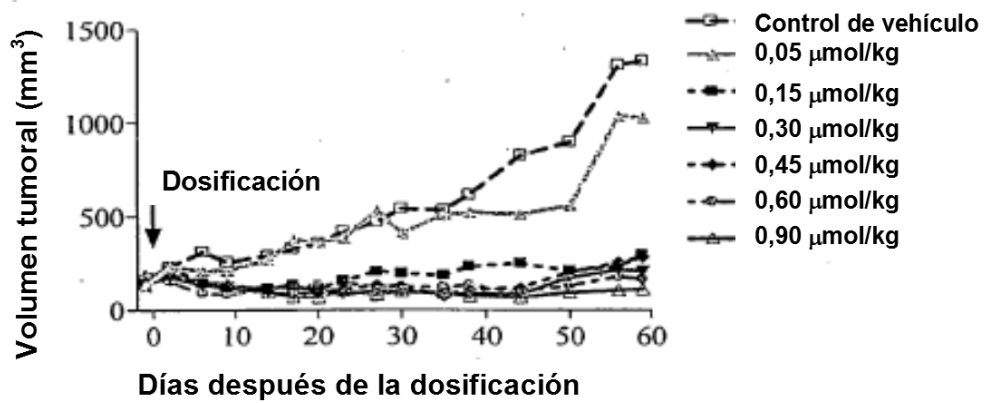


Fig. 2

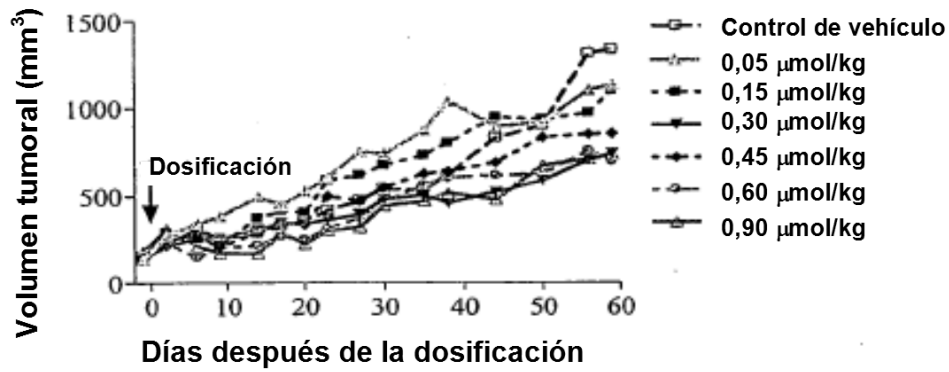


Fig. 3

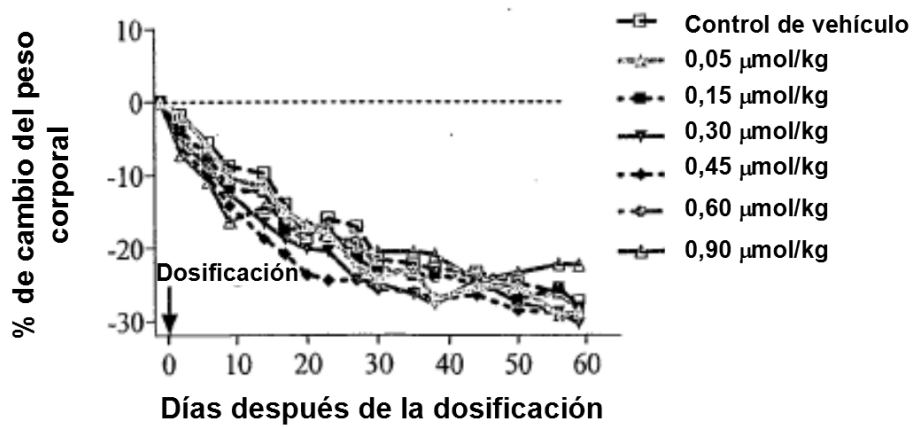


Fig. 4

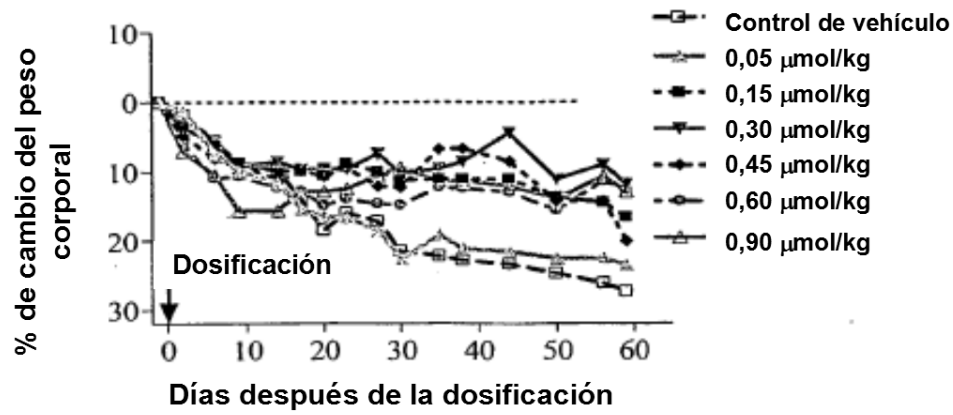


Fig. 5

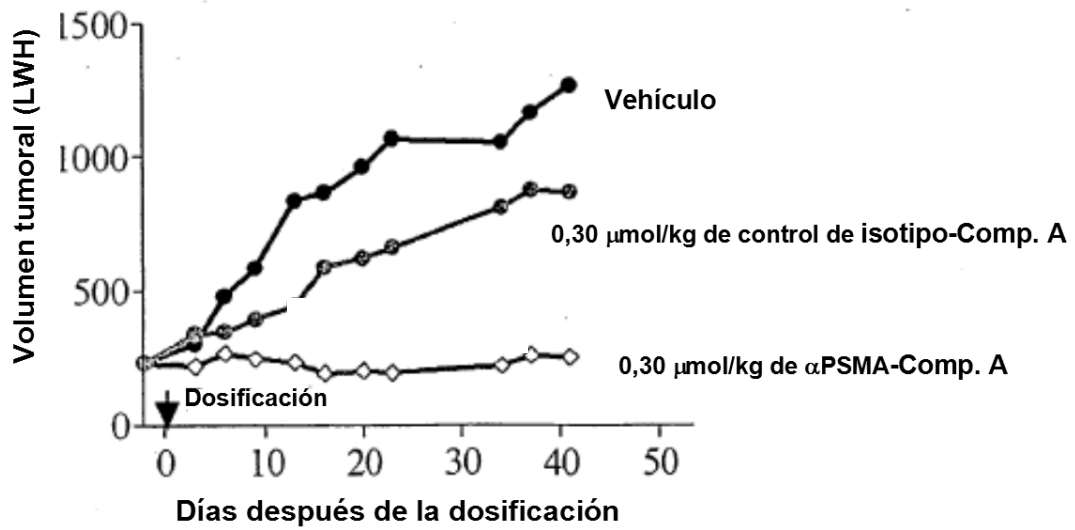


Fig. 6

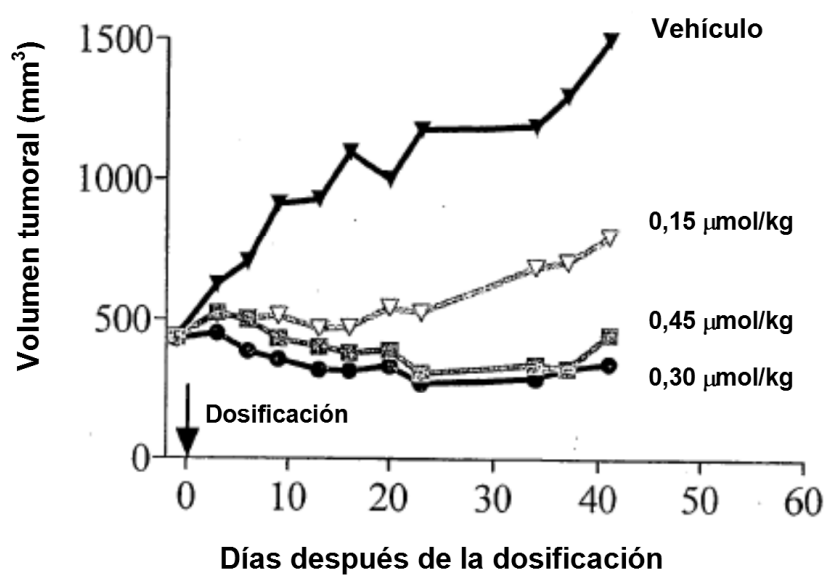


Fig. 7

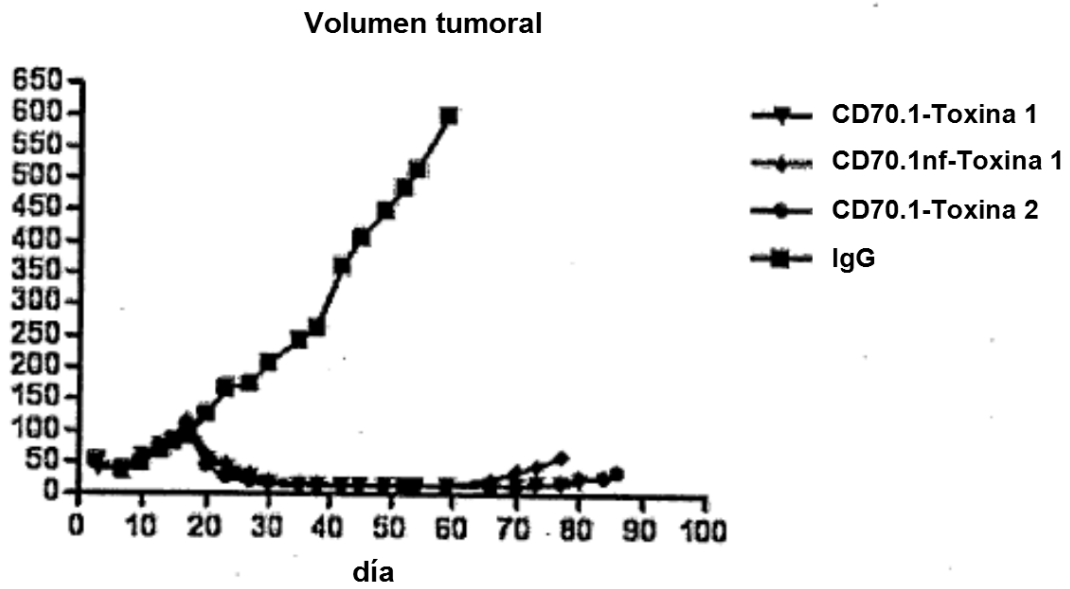


Fig. 8

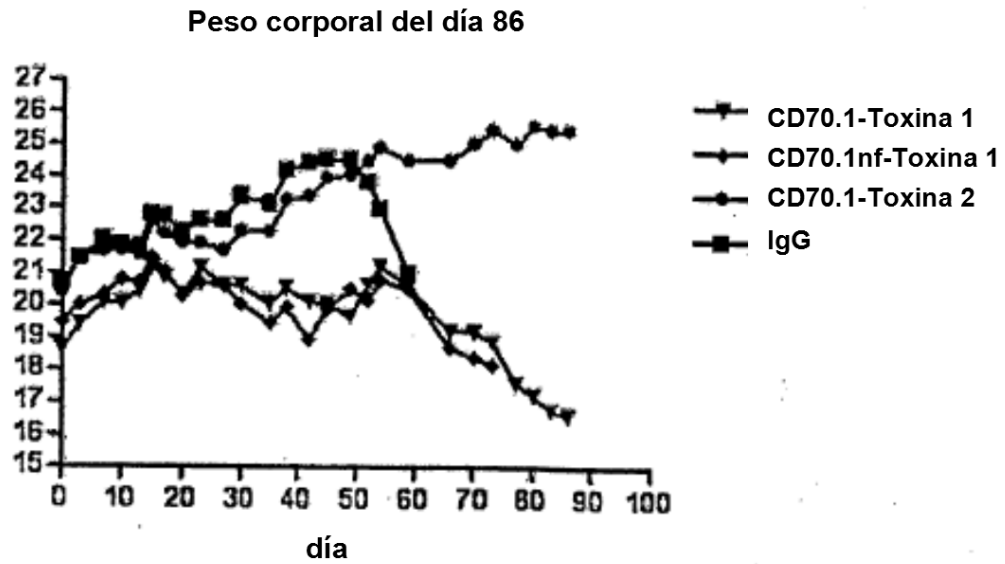


Fig. 9