

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 567**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11716146 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2528625**

54 Título: **Pirrolobenzodicepinas y conjugados de las mismas**

30 Prioridad:

06.10.2010 GB 201016802

15.04.2010 GB 201006341

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

21.11.2013

73 Titular/es:

SPIROGEN SÀRL (100.0%)

**Chemin de la Pacottaz 1, c/o Michael Forer, 1806
St-Légier-La Chiésaz, CH**

72 Inventor/es:

HOWARD, PHILIP WILSON;

MASTERSON, LUKE;

TIBERGHEN, ARNAUD;

FLYGARE, JOHN A.;

GUNZNER, JANET L.;

POLAKIS, PAUL;

POLSON, ANDREW;

RAAB, HELGA E. y

SPENCER, SUSAN D.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 430 567 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

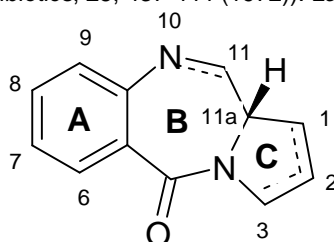
Pirrolobenzodiacepinas y conjugados de las mismas

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiacepinas (PBD), en concreto pirrolobenzodiacepinas que tienen un grupo protector N10, en forma de un enlazador a un agente de unión a célula.

Antecedentes de la invención

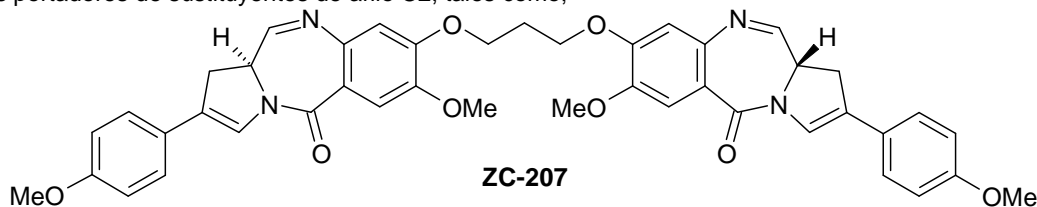
10 *Pirrolobenzodiacepinas*

Algunas pirrolobenzodiacepinas (PBS) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGPu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, antramycin, se descubrió en 1965 (Leimgruber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5793-5795 (1965); Leimgruber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5791-5793 (1965)). Desde entonces se han comunicado numerosas PBD naturales y se han desarrollado más de 10 vías sintéticas de una serie de análogos (Thurston, y col., *Chem. Rev.* **1994**, 433-465 (1994)). Los miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski, y col., *J. Antibiotics*, **40**, 145-148 (1987)), quicamicina (Konishi, y col., *J. Antibiotics*, **37**, 200-206 (1984)), DC-81 (patente japonesa 58-180 487; Thurston, y col., *Chem. Brit.*, **26**, 767-772 (1990); Bose, y col., *Tetrahedron*, **48**, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, y col., *J. Antibiotics*, **33**, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, y col., *J. Antibiotics*, **29**, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, y col., *J. Antibiotics*, **41**, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, y col., *J. Antibiotics*, **29**, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, *J. Org. Chem.*, **52**, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, y col., *J. Antibiotics*, **41**, 702-704 (1988); Itoh, y col., *J. Antibiotics*, **41**, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, y col., *J. Antibiotics*, **25**, 437-444 (1972)). Las PBD tienen la estructura general:



25 Difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, en sus anillos A aromáticos y en los anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un carbinolamina metiléter (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11, que es el centro electrófilo responsable de la alquilación del AND. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11a quiral que les proporciona un giro dextrógiro cuando se ve desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional adecuada para isohelicidad con la ranura menor del ADN de la forma B, lo que conduce a un acoplamiento preciso en el sitio de unión (Kohn, En *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir en el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

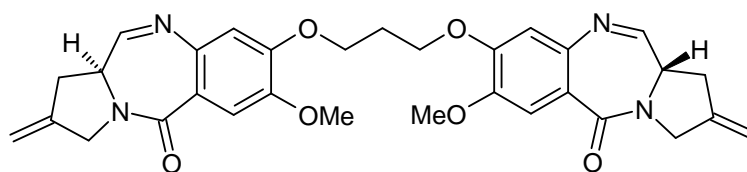
35 Los presentes inventores han divulgado anteriormente en el documento WO 2005/085251, compuestos de PBD diméricos portadores de sustituyentes de anillo C2, tales como;



Se ha demostrado que estos compuestos son muy útiles como agentes citotóxicos.

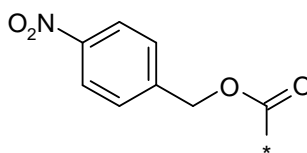
40 Un compuesto de pirrolobenzodiacepina particularmente ventajoso se describe en Gregson y col. (*Chem. Commun.* **1999**, 797-798) como compuesto **1** y Gregson y col. (*J. Med. Chem.* **2001**, **44**, 1161-1174) como compuesto **4a**. Este compuesto, también conocido como SJG-136, se muestra a continuación:

45



SJK-136

5 Los presentes inventores han divulgado previamente que los compuestos de PBS pueden emplearse como profármacos protegiéndolos en la posición N10 con un grupo protector de nitrógeno, que se puede eliminar *in vivo* (documento WO 00/12507). Muchos de estos grupos protectores son carbamatos y tienen, por ejemplo, la estructura:



10 En la que el asterisco (*) indica el punto de unión al átomo N10 de I PBD.

Los presentes inventores también han descrito la preparación de compuestos de PBD que tienen un grupo protector de carbamato de nitrógeno en la posición N10 (documento 2005/023814). Los grupos protectores se pueden eliminar de la posición N10 del grupo PBD para dejar un enlace imina N10-C11. Se describe una serie de grupos protectores, incluidos grupos que se pueden escindir mediante la acción de enzimas.

15 El documento WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos diméricos de OBS que tienen grupos enlazadores para conectar con un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo. El enlazador está presente en el puente que une las unidades monoméricas de PBD del dímero.

20 *Conjugados anticuerpo-fármaco*

Se ha establecido una terapia de anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), es decir inmunoconjugados, para la liberación local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer, está dirigido a la liberación del grupo farmacológico a tumores, y acumulación celular en los mismos, mientras que la administración sistémica de estos fármacos no conjugados puede tener como resultado niveles inaceptables de toxicidad en las células normales así como en las células tumorales que se busca eliminar (Xie y col. (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun y col. (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law y col. (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu y col. (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patentes* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

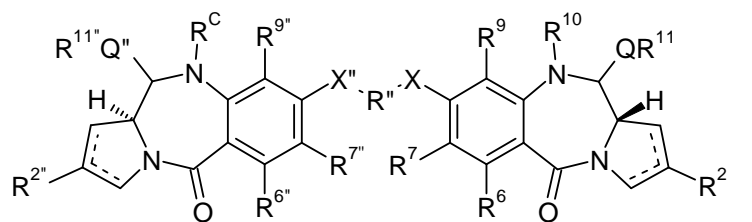
De este modo se busca una eficacia máxima con una toxicidad mínima. Los esfuerzos para diseñar y perfeccionar los ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (AcMo) además de en el mecanismo de acción, la unión al fármaco y la proporción fármaco/anticuerpo (carga) y las propiedades de liberación de fármaco (Junutula, y col., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan y col (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Doronina y col. (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson y col (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8; Sanderson y col. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey y col. (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett y col. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Los grupos farmacológicos pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos, incluida la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo enfoque para la formación de conjugados de PBD con agentes de unión a célula y, en concreto, conjugados de anticuerpos con PBD.

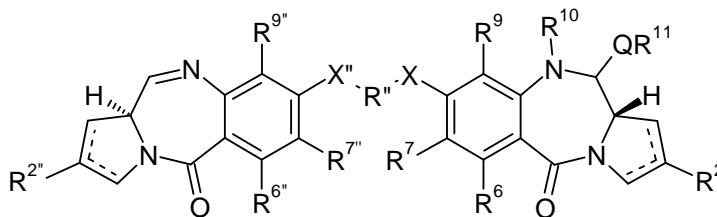
50 **Descripción resumida de la invención**

En un aspecto general, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de PBD conectado a través de la posición N10 mediante un enlazador a un agente de unión a célula. El enlazador es un enlazador lábil y puede ser un enlazador lábil a enzimas. El agente de unión a célula es, preferentemente, un anticuerpo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona conjugados de fórmula (AB) o (AC):



15 **AB**



25 **AC**

y sales y solvatos del mismo, en el que:

las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;

30 R² se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente se selecciona adicionalmente entre halo o dihalo;

en los que R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo;

R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R⁷ se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

35 R¹⁰ es un enlazador conectado a un agente de unión a célula seleccionado entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico;

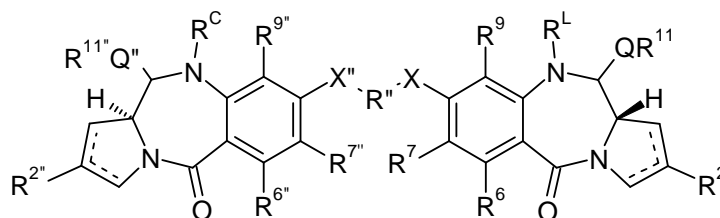
Q se selecciona independientemente entre O, S y NH;

R¹¹ es H o R o, cuando Q es O, SO₃M, en el que M es un catión metálico;

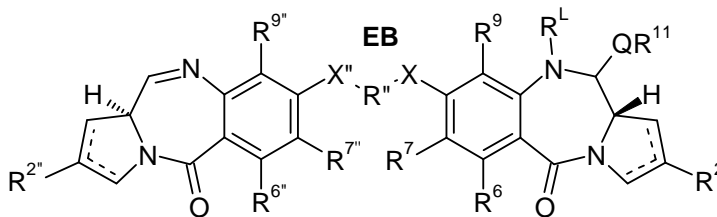
40 cada uno de R y R' se selecciona independientemente entre los grupos opcionalmente sustituidos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, y opcionalmente en relación al grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4, 5, 6 ó 7 miembros; y

en el que R², R⁶, R⁷, R⁹, X'', Q'' y R¹¹ son como se han definido de acuerdo con R², R⁶, R⁷, R⁹, X, Q y R¹¹ respectivamente, y R^C es un grupo de terminación.

45 La presente invención también proporciona compuestos de fórmula (EB) o (EC):



60 **EB**



EC

y sales y solvatos del mismo, en el que

las líneas de puntos indican la presencia opcional de a doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;

R² se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R,

5 CO₂R y COR, y opcionalmente se selecciona adicionalmente entre halo o dihalo;

en los que R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H, y halo;

R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R⁷ se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

10 R^L es un enlazador para la conexión a un agente de unión a célula seleccionado entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico;

Q se selecciona independientemente entre O, S y NH;

R¹¹ es H, o R o, cuando Q es O, R¹¹ es SO₃M, en el que M es un catión metálico;

15 cada uno de R y R' se selecciona independientemente entre los grupos opcionalmente sustituidos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, y opcionalmente en relación al grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4, 5, 6 ó 7 miembros;

R" es un grupo alquileo C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, estando dichos anillos opcionalmente sustituidos con NH₂;

20 cada X es O, S o N(H); y

en el que R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹, Q" y X" son como se han definido de acuerdo con R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹, Q y X respectivamente, y R^C es un grupo de terminación;

en el que R^L es diferente a R^C.

25 Breve Descripción De Las Figuras

La Figura 1 muestra realizaciones particulares de la presente invención;

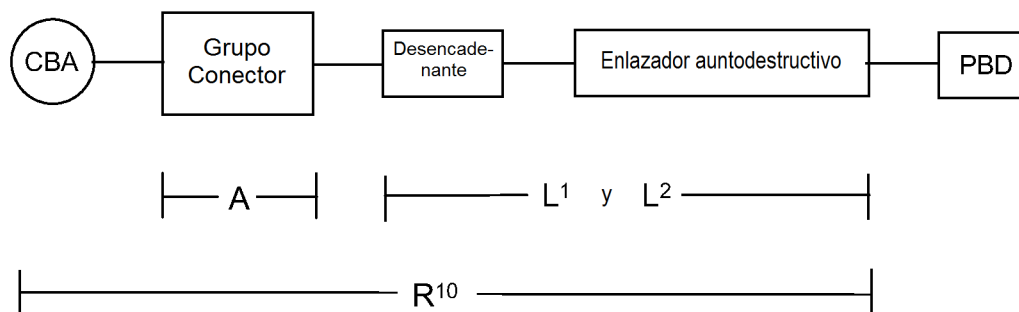
Las Figuras 2 a 6 muestran el resultado de los ensayos biológicos en realizaciones particulares de la presente invención.

30

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de PBD conectado a través de la posición N10 mediante un enlazador a un agente de unión a célula. En una realización, el conjugado comprende un agente de unión a célula conectado a un grupo espaciador de conexión, el espaciador conectado a un desencadenante, el desencadenante conectado a un enlazador de auto-destrucción y el enlazador de auto-destrucción conectado a la posición N10 del compuesto PBD. Dicho conjugado se ilustra a continuación:

35



40 en el que CBA es un agente de unión a célula y PBD es un compuesto de pirrolobenzodiazepina, como se describe en el presente documento. La ilustración muestra las porciones que corresponden a R¹⁰, A, L¹ y L² en ciertas realizaciones de la invención.

La presente invención es adecuada para su uso en la prestación de un compuesto de PBD a un sitio preferido en un sujeto. En las realizaciones preferidas, el conjugado permite la liberación de un compuesto de PBD activo que no retiene ninguna parte del enlazador. No hay ningún detalle presente que pueda afectar a la reactividad del compuesto de PBD.

45

En ciertas realizaciones, la invención proporciona conjugados que comprenden un grupo dimérico de PBD que tiene un enlazador conectado a un agente de unión a célula. Los inventores de la presente invención describen en el presente documento procedimientos de síntesis que permiten que dicho dímero se conjugue para que pueda prepararse mediante el uso de nuevas técnicas de desimetrización de PBD.

50

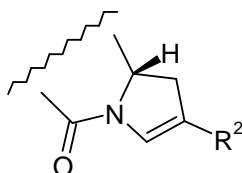
Preferencias

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención como se ha descrito anteriormente o pueden referirse a un solo aspecto. Las preferencias pueden combinarse entre sí en cualquier combinación.

5 **Doble enlace**

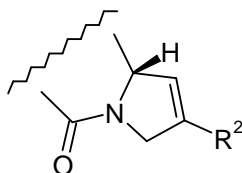
En una realización, no hay doble enlace presente en C1 y C2, y C2 y C3.

10 En una realización, las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C2 y C3, como se muestra a continuación:



En una realización, un doble enlace está presente entre C2 y C3 cuando R² es arilo C₅₋₂₀ o alquilo C₁₋₁₂.

15 En una realización, las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2, como se muestra a continuación:



En una realización, un doble enlace está presente entre C1 y C2 cuando R² es arilo C₅₋₂₀ o alquilo C₁₋₁₂.

R²

20 En una realización, R² se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente se seleccionan adicionalmente entre halo o dihalo. En una realización, R² se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR.

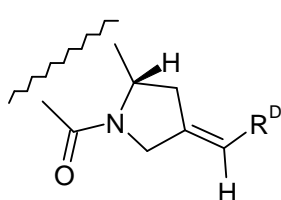
25 En una realización, R² se selecciona independientemente entre H, =O, =CH₂, R, =CH-R^D y =C(R^D)₂.

En una realización, R² es independientemente H.

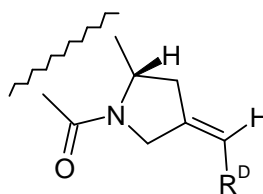
En una realización, R² es independientemente =O.

30 En una realización, R² es independientemente =CH₂.

En una realización, R² es independientemente =CH-R^D. Dentro del compuesto PBD, el grupo =CH-R^D puede tener las dos configuraciones que se muestran a continuación.



(I)



(II)

35 En una realización, la configuración es la configuración (I).

En una realización, R² es independientemente =C(R^D)₂.

40 En una realización, R² es independientemente =CF₂.

En una realización, R² es independientemente R.

En una realización, R² es independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente arilo C_{5-7} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente arilo C_{8-10} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente fenilo opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente naftilo opcionalmente sustituido.

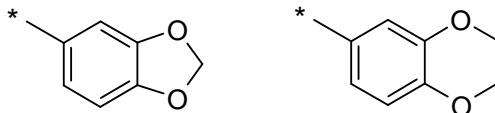
En una realización, R^2 es independientemente piridilo opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 es independientemente quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituido.

En una realización, R^2 porta de uno a tres grupos sustituyentes, prefiriéndose más 1 y 2, y siendo lo más preferido grupos sustituidos una sola vez. Los sustituyentes pueden estar en cualquier posición.

Cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-7} , un solo sustituyente está preferentemente en un átomo del anillo que no es adyacente al enlace con el grupo del compuesto, es decir, es preferentemente β o γ con respecto al enlace con el grupo del compuesto. Por lo tanto, cuando el grupo arilo C_{5-7} es fenilo, el sustituyente está preferentemente en las posiciones meta o para y más preferentemente está en la posición para.

En una realización, R^2 se selecciona entre:



en las que los asteriscos indican el punto de unión.

Cuando R^2 es un grupo arilo C_{8-10} , por ejemplo quinolinilo o isoquinolinilo, éste puede portar cualquier número de sustituyentes en cualquier posición de los anillos de quinolina o isoquinolina. En algunas realizaciones, éste porta uno, dos o tres sustituyentes, y éstos pueden estar en los anillos proximales o distales, o en ambos (si hay más de un sustituyente).

En una realización, cuando R^2 está opcionalmente sustituido, los sustituyentes se seleccionan entre los sustituyentes dados en la sección de sustituyentes posterior.

Cuando R está opcionalmente sustituido, los sustituyentes se seleccionan preferentemente entre:

Halo, Hidroxilo, Éter, Formilo, Acilo, Carboxi, Ester, Aciloxi, Amino, Amido, Acilamido, Aminocarbonilo, Ureido, Nitro, Ciano y Tioéter.

En una realización, cuando R o R^2 está opcionalmente sustituido, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en R, OR, SR, NRR' , NO_2 , halo, CO_2R , COR, $CONH_2$, $CONHR$ y $CONRR'$.

Cuando R^2 es alquilo C_{1-12} , el sustituyente opcional puede incluir adicionalmente grupos heterociclilo C_{3-20} y arilo C_{5-20} .

Cuando R^2 es heterociclilo C_{3-20} , el sustituyente opcional puede incluir adicionalmente grupos alquilo C_{1-12} y arilo C_{5-20} .

Cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-20} , el sustituyente opcional puede incluir adicionalmente grupos heterociclilo C_{3-20} y alquilo C_{1-12} .

Se entiende que el término "alquilo" abarca las subclases alqueno y alquino, así como cicloalquilo. Por lo tanto, cuando R^2 es alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, se entiende que el grupo alquilo contiene opcionalmente uno o más dobles o triples enlaces carbono-carbono, que pueden formar parte de un sistema conjugado. En una realización, el grupo alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido contiene al menos un doble o triple enlace carbono-carbono, y este enlace está conjugado con un doble enlace presente entre C1 y C2, o C2 y C3. En una realización, el grupo alquilo C_{1-12} es un grupo seleccionado entre alquilo C_{1-12} saturado, alqueno C_{2-12} , alquino C_{2-12} y cicloalquilo C_{3-12} .

Si un sustituyente en R^2 es halo, éste es preferentemente F o Cl, más preferentemente Cl.

Si un sustituyente en R² es éter, éste puede ser en algunas realizaciones un grupo alcoxi, por ejemplo, un grupo alcoxi C₁₋₇ (por ejemplo, metoxi, etoxi) o puede ser en algunas realizaciones un grupo ariloxi C₅₋₇ (por ejemplo, fenoxi, piridiloxi, furaniloxi).

Si un sustituyente en R² es alquilo C₁₋₇, éste puede ser preferentemente un grupo alquilo C₁₋₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo).

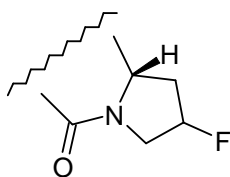
Si un sustituyente en R² es heterociclilo C₃₋₇, éste puede ser en algunas realizaciones un grupo heterociclilo C₆ que contiene nitrógeno, por ejemplo morfolino, tiomorfolino, piperidinilo, piperazinilo. Estos grupos pueden estar enlazados al grupo del grupo PBD mediante el átomo de nitrógeno. Estos grupos pueden estar adicionalmente sustituidos, por ejemplo, con grupos alquilo C₁₋₄.

Si un sustituyente en R² es bis-oxi-alquilenos C₁₋₃, éste es preferentemente bis-oxi-metileno o bis-oxi-etileno.

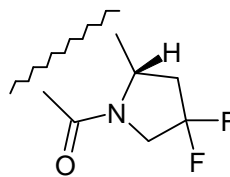
Los sustituyentes particularmente preferidos para R² incluyen metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metil-tienilo.

Los grupos R² sustituido particularmente preferidos incluyen, pero sin limitación, 4-metoxi-fenilo, 3-metoxifenilo, 4-etoxi-fenilo, 3-etoxi-fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 3,4-bisoximetileno-fenilo, 4-metiltienilo, 4-cianofenilo, 4-fenoxifenilo, quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo, isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo, 2-tienilo, 2-furanilo, metoxinaftilo y naftilo.

En una realización, R² es halo o dihalo. En una realización, R² es -F o -F₂, sustituyentes que se ilustran a continuación como (III) y (IV) respectivamente:



(III)



(IV)

R^D

En una realización, R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo.

En una realización, R^D es independientemente R.

En una realización, R^D es independientemente halo.

R⁶

En una realización, R⁶ se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn- y Halo.

En una realización, R⁶ se selecciona independientemente entre H, OH, OR, SH, NH₂, NO₂ y Halo. En una realización, R⁶ se selecciona independientemente entre H y Halo.

En una realización, R⁶ es independientemente H.

En una realización, R⁶ y R⁷ juntos forman un grupo -O-(CH₂)_p-O-, en el que p es 1 ó 2.

R⁷

R⁷ se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo.

En una realización, R⁷ es independientemente OR.

En una realización, R⁷ es independientemente OR^{7A}, en el que R^{7A} es independientemente alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido.

En una realización, R^{7A} es opcionalmente alquilo C₁₋₆ saturado opcionalmente sustituido.

En una realización, R^{7A} es independientemente alquenilo C_{2-4} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^{7A} es independientemente Me.

En una realización, R^{7A} es independientemente CH_2Ph .

En una realización, R^{7A} es independientemente alilo.

R^9

En una realización, R^9 se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , NO_2 , Me_3Sn - y Halo.

En una realización, R^9 es independientemente H.

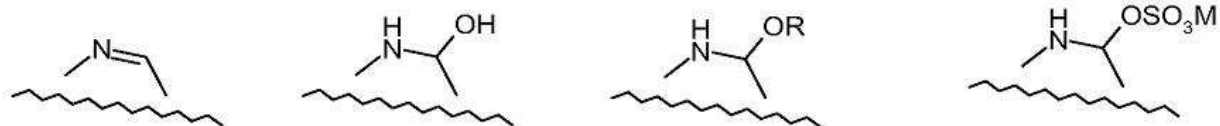
En una realización, R^9 es independientemente R u OR.

R^{10}

Para evitar dudas, cuando R^{10} es un enlazador conectado a un agente de unión a célula, el agente de unión a célula es parte del grupo R^{10} .

En ciertas realizaciones de la invención, cuando el conjugado es un dímero que comprende dos monómeros A, un monómero tiene un grupo R^{10} que es un enlazador conectado a un agente de unión a célula, y el otro monómero tiene un grupo R^{10} que es un enlazador conectado a un grupo de terminación R^C .

En una realización, el grupo R^{10} puede eliminarse de la posición N10 del grupo PBD para dejar un enlace imina N10-C11, una carbinolamina, una carbinolamina sustituida, en la que QR^{11} es OSO_3M , un aducto de bisulfito, una tiocarbinolamina, una tiocarbinolamina sustituida o una tiocarbinolamina sustituida, como se ilustra a continuación:

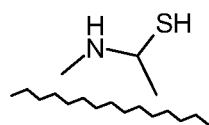


imina N10-C11

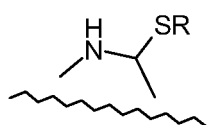
carbinolamina

carbinolamina sustituida

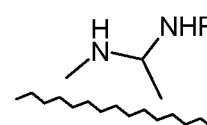
aducto de bisulfito



tiocarbinolamina



tiocarbinolamina sustituida



tiocarbinolamina sustituida

en las que R y M son como se definen para los conjugados de la invención.

En una realización, el grupo R^{10} puede eliminarse de la posición N10 del grupo PBD para dejar un enlace imina N10-C11.

En algunas realizaciones, el conjugado de la invención es un compuesto dimérico que comprende un monómero de fórmula (A) y un monómero de fórmula (B). En esta realización, el grupo R^{10} no necesita eliminarse de la posición N10, puesto que el monómero (B) tiene una funcionalidad adecuada en las posiciones N10 y C11 para actividad biológica.

Sin embargo, se prefiere que el grupo R^{10} pueda eliminarse así para proporcionar un dímero que tenga una

funcionalidad adecuada en las posiciones N10 y C11 en ambas unidades monoméricas. Dicha funcionalidad se considera necesaria para permitir la actividad reticulante del dímero PBD.

La presente solicitud se refiere particularmente a aquellos grupos R¹⁰ que tienen una unión carbamato en la posición N10.

El enlazador une el Agente de Unión a Célula (CBA), por ejemplo un anticuerpo, al grupo D del profármaco PBD a través de un enlace o enlaces covalentes. El enlazador es un grupo bifuncional o monofuncional que puede usarse para enlazar uno o más grupos de fármaco (D) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). El enlazador (L) puede ser estable fuera de una célula, es decir extracelular, o puede escindirse por actividad enzimática, hidrólisis u otras condiciones metabólicas. Pueden prepararse convenientemente conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) usando un enlazador que tenga una funcionalidad reactiva para unir el grupo farmacológico al anticuerpo. Un tiol de cisteína o una amina, por ejemplo extremo N-terminal o cadena lateral de aminoácido, tal como lisina, del anticuerpo (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo enlazador o espaciador, grupo farmacológico PBD (D) o reactivo de enlace a fármaco (D-L).

Muchos grupos funcionales reactivos en el enlazador unidos a la posición N10 del grupo PBD pueden ser útiles para hacerlo reaccionar con el agente de unión a célula. Por ejemplo, pueden formarse uniones éster, tioéster, amida, tioamida, carbamato, tiocarbamato, urea, tiourea, éter, tioéter o disulfuro a partir de la reacción de los intermedios enlazador-fármaco PBD y el agente de unión a célula.

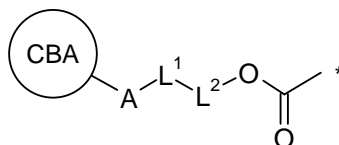
Los enlazadores de los ADC previenen preferentemente la agregación de moléculas de ADC y mantienen el ADC fácilmente soluble en medios acuosos y en estado monomérico.

Los enlazadores de los ADC son preferentemente estables extracelularmente. Antes del transporte o liberación en una célula, el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es preferentemente estable y permanece intacto, es decir, el anticuerpo permanece unido al grupo farmacológico. Los enlazadores son estables fuera de la célula diana y pueden escindirse con cierto grado de eficacia dentro de la célula. Un enlazador eficaz: (i) mantendrá las propiedades de enlace específicas del anticuerpo; (ii) permitirá la liberación intracelular del conjugado o grupo farmacológico; (iii) se mantendrá estable e intacto, es decir no se escindirá, hasta que el conjugado se haya liberado o transportado a su sitio elegido; y (iv) mantendrá un efecto linfocítico citotóxico o un efecto citostático del grupo farmacológico PBD. La estabilidad del ADC puede medirse por técnicas analíticas convencionales, tales como espectroscopía de masas, HPLC, y la técnica de separación/análisis LC/MS.

La unión covalente del anticuerpo y el grupo farmacológico requiere que el enlazador tenga dos grupos funcionales reactivos, es decir, bivalencia en un sentido reactivo. Los reactivos enlazadores bivalentes que son útiles para unir dos o más grupos funcionales o biológicamente reactivos, tales como péptidos, ácidos nucleicos, fármacos, toxinas, anticuerpos, haptenos grupos indicadores son conocidos, y se han descrito procedimientos para sus derivados conjugados (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242).

En otra realización, el enlazador puede estar sustituido con grupos que modulan la agregación, solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente sulfonato puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el anticuerpo o el grupo farmacológico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L con D, o D-L con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

En una realización, R¹⁰ es un grupo:



en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, CBA es un agente de unión a célula, L¹ es un enlazador, A es un grupo de conexión que conecta L¹ al agente de unión a célula, L² es un enlace covalente o junto con -OC(=O)- forman un enlazador de auto-destrucción y L¹ o L² es un enlazador escindible.

L¹ es preferentemente el enlazador escindible y puede denominarse como un desencadenante de la activación para la escisión del enlazador.

La naturaleza de L¹ y L², cuando están presentes, puede variar ampliamente. Estos grupos seleccionan en base a sus características de escisión, que pueden estar dictadas por condiciones en el sitio en el que se libera el conjugado. Se prefieren aquellos enlazadores que se escinden por la acción de enzimas, aunque también pueden usarse enlazadores que puedan escindirse por cambios en el pH (por ejemplo, lábiles a ácido o base), temperatura o después de irradiación (por ejemplo, fotolábiles). También utilizarse enlazadores que puedan escindirse en condiciones de reducción u oxidación en la presente invención. L¹ puede comprender una secuencia contigua de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos puede ser el sustrato diana para la escisión enzimática, permitiendo de

esta manera la escisión de R¹⁰ de la posición N10.

En una realización, L¹ puede escindirse por la acción de una enzima. En una realización, la enzima es una esterasa o una peptidasa.

5 En una realización, L² está presente, y junto con -C(=O)O-, forma un enlazador de auto-destrucción. En una realización, L² es un sustrato para la actividad enzimática, permitiendo de esta manera la liberación de R¹⁰ de la posición N10.

10 En una realización, en la que L¹ puede escindirse por la acción de una enzima y L² está presente, la enzima escinde el enlace entre L¹ y L².

L¹ y L², cuando están presentes, pueden estar conectados por un enlace seleccionado entre:

15 -C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 20 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH- y
 -NHC(=O)NH-.

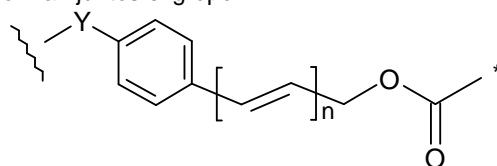
25 Un grupo amino de L¹ que conecta a L² puede ser el extremo N-terminal de un aminoácido o puede obtenerse a partir de un grupo amino de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, una cadena lateral de aminoácido de lisina.

Un grupo carboxilo de L¹ que conecta a L² puede ser el C-terminal de un aminoácido o puede obtenerse a partir de un grupo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, una cadena lateral de aminoácido de ácido glutámico.

30 Un grupo hidroxilo de L¹ que conecta a L² puede obtenerse a partir de un grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, una cadena lateral de aminoácido de serina.

35 La expresión "cadena lateral de aminoácido" aquellos grupos encontrados en: (i) aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, tales como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; (ii) aminoácidos menores, tales como ornitina y citrulina; (iii) aminoácidos no naturales, beta-aminoácidos, análogos sintéticos y derivados de aminoácidos que aparecen en la naturaleza; y (iv) todos los enantiómeros, diastereómeros, enriquecidos isoméricamente, marcados isotópicamente (por ejemplo, ²H, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N), formas protegidas y mezclas racémicas de los mismos.

40 En una realización, -C(=O)O- y L² forman juntos el grupo:



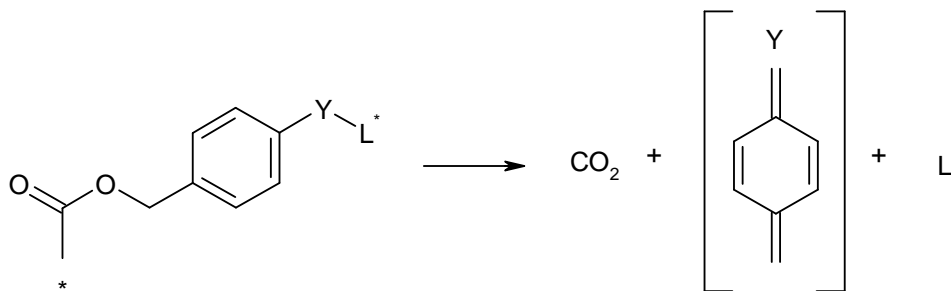
45 en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador L¹, Y es -N(H)-, -O-, -C(=O)N(H)- o -C(=O)O-, y n es de 0 a 3. El anillo fenileno está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes como se describen en el presente documento. En una realización, el grupo fenileno está opcionalmente sustituido con halo, NO₂, R u OR.

En una realización, Y es NH.

50 En una realización, n es 0 ó 1. Preferentemente, n es 0.

Cuando Y es NH y n es 0, el enlazador de auto-destrucción puede denominarse como un enlazador de p-aminobencilcarbonilo (PABC).

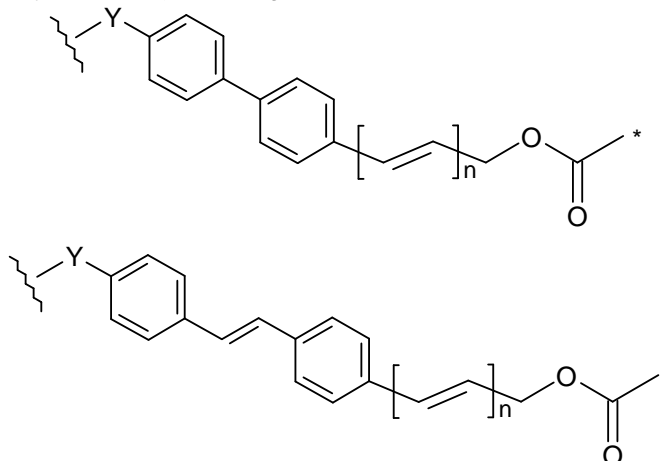
55 El enlazador de auto-destrucción permitirá la liberación del compuesto protegido cuando se activa un sitio remoto, realizándose según los principios que se muestran a continuación (para n = 0):



donde L^* es la forma activada de la porción restante del enlazador. Estos grupos tienen la ventaja de separar el sitio de activación del compuesto que se está protegiendo. Como se ha descrito anteriormente, el grupo fenilo puede estar opcionalmente sustituido.

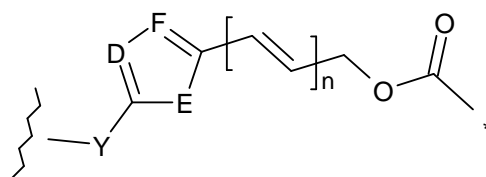
5 En una realización descrita en el presente documento, el grupo L^* es un enlazador L^1 como se describe en el presente documento, que pueden incluir un grupo dipeptídico.

En otra realización, $-C(=O)O-$ y L^2 forman juntos un grupo seleccionado entre:



10 en los que el asterisco, la línea ondulada, Y y n son como se han definido anteriormente. Cada anillo fenileno está opcionalmente sustituido con uno, dos o tres sustituyentes como se describen en el presente documento. En una realización, el anillo fenileno que tiene el sustituyente Y está opcionalmente sustituido y el anillo fenileno que no tiene el sustituyente Y está sin sustituir. En una realización, el anillo fenileno que tiene el sustituyente Y está sin sustituir y el anillo fenileno que no tiene el sustituyente Y está opcionalmente sustituido.

15 En otra realización, $-C(=O)O-$ y L^2 forman juntos un grupo seleccionado entre:



20 en el que el asterisco, la línea ondulada, Y y n son como se han definido anteriormente, E es O , S o NR , D es N , CH , o CR , y F es N , CH , o CR .

En una realización, D es N .

25 En una realización, D es CH .

En una realización, E es O o S .

En una realización, F es CH .

30 En una realización preferida, el enlazador es un enlazador lábil de catepsina.

En una realización, L^1 comprende un dipéptido. El dipéptido puede representarse como $-NH-X_1-X_2-CO-$, en el que

-NH- y -CO- representan los N- y C-terminales de los grupos aminoacídicos X_1 y X_2 respectivamente. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil de catepsina, el dipéptido puede estar en el sitio de acción para la escisión mediante por catepsina.

5 Además, para aquellos grupos aminoacídicos que tienen una funcionalidad carboxilo o de cadena lateral amino, por ejemplo Glu y Lys respectivamente, CO y NH pueden representar dicha funcionalidad de cadena lateral.

En una realización, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, se selecciona entre:

10 -Phe-Lys-,
-Val-Ala-,
-Val-Lys-,
-Ala-Lys-,
15 -Val-Cit-,
-Phe-Cit-,
-Leu-Cit-,
-Ile-Cit-,
-Phe-Arg-,
20 -Trp-Cit-

en el que Cit es citrulina.

Preferentemente, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, se selecciona entre:

25 -Phe-Lys-,
-Val-Ala-,
-Val-Lys-,
-Ala-Lys-,
30 -Val-Cit-

Más preferentemente, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, es -Phe-Lys- o -Val-Ala-.

35 Pueden usarse otras combinaciones dipeptídicas, incluyendo las descritas por Dubowchik y col., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869.

En una realización, la cadena lateral de aminoácido se derivatiza, cuando es adecuado. Por ejemplo, un grupo amino o grupo carboxi de una cadena lateral de aminoácido puede derivatizarse. En una realización, un grupo amino NH_2 de una cadena lateral de aminoácido, tal como lisina, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en NHR y NRR' .

En una realización, un grupo carboxi $COOH$ de un aminoácido de cadena lateral, tal como ácido aspártico, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en $COOR$, $CONH_2$, $CONHR$ y $CONRR'$.

45 En una realización, la cadena lateral de aminoácido está químicamente protegida, cuando sea adecuado. El grupo protector de cadena lateral puede ser un grupo como se expone más adelante en relación al grupo R^L . Los inventores de la presente invención han establecido que las secuencias de aminoácido protegidos pueden escindirse mediante enzimas. Por ejemplo, se ha establecido que una secuencia dipeptídica que comprende un residuo Lys de cadena lateral protegido con Boc puede escindirse con catepsina.

50 Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos se conocen bien en la técnica y se describen en el Novabiochem Catalog. Se exponen estrategias adicionales de grupo protector en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene y Wuts.

55 A continuación, se muestran grupos protectores posibles de cadena lateral para aquellos aminoácidos que tienen una funcionalidad reactiva de cadena lateral:

Arg: Z, Mtr, Tos;
Asn: Trt, Xan;
60 Asp: Bzl, t-Bu;
Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
Glu: Bzl, t-Bu;
Gln: Trt, Xan;
His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
70 Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;
Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

Thr: Bz;
 Trp: Boc;
 Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

5 En una realización, la protección de la cadena lateral se selecciona para que sea ortogonal con respecto a un grupo proporcionado como, o como parte de, un grupo de terminación, cuando esté presente. Por lo tanto, la eliminación del grupo protector de cadena lateral no elimina el grupo de terminación, o cualquier funcionalidad del grupo protector que sea parte del grupo de terminación.

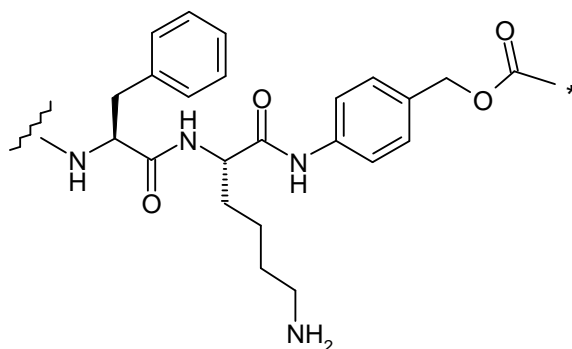
10 En otras realizaciones de la invención, los aminoácidos seleccionados son aquellos que no tienen ninguna funcionalidad de cadena lateral reactiva. Por ejemplo, los aminoácidos pueden seleccionarse entre: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro y Val.

15 En una realización, el dipéptido se usa junto con un enlazador de auto-destrucción. El enlazador de auto-destrucción puede estar conectado a $-X_2-$.

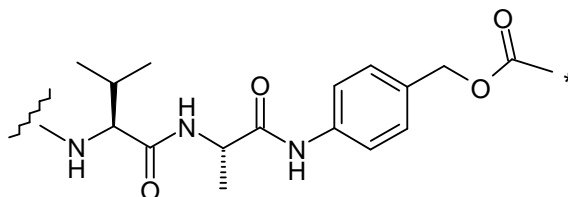
20 Cuando un enlazador de auto-destrucción está presente, $-X_2-$ está conectado directamente al enlazador de auto-destrucción. Preferentemente, el grupo $-X_2-CO-$ está conectado a Y, en el que Y es NH, formando de esta manera al grupo $-X_2-CO-NH-$.

25 $-NH-X_1-$ está conectado directamente a A. A puede comprender la funcionalidad $-CO-$ para formar de esta manera una unión amida con $-X_1-$.

En una realización, L^1 y L^2 junto con $-OC(=O)-$ comprenden el grupo $NH-X_1-X_2-CO-PABC-$. El grupo PABC está conectado directamente a la posición N10. Preferentemente, el enlazador de auto-destrucción y el dipéptido forman juntos el grupo $-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-$, que se ilustra a continuación:

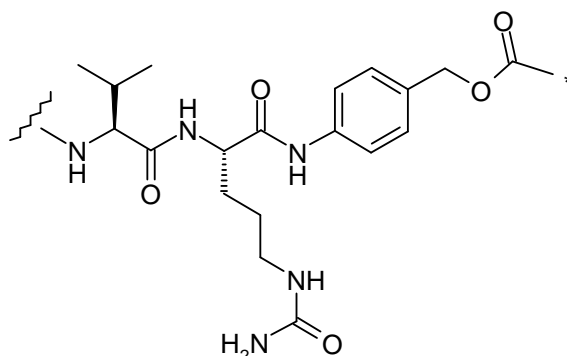


30 en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante del enlazador L^1 o el punto de unión a A. Preferentemente, la línea ondulada indica el punto de unión a A. La cadena lateral del aminoácido Lys puede estar protegida, por ejemplo, con Boc, Fmoc o Alloc, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, el enlazador de auto-destrucción y el dipéptido forman juntos el grupo $-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-$, que se ilustra a continuación:



35 en el que el asterisco y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

Como alternativa, el enlazador de auto-destrucción y el dipéptido forman juntos el grupo $-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-$, que se ilustra a continuación:



en el que el asterisco y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, puede preferirse que si el PBD/grupo farmacológico contiene un enlace imina sin proteger, por ejemplo si el grupo B está presente, entonces el enlazador no contenga un grupo amino libre (H_2N). Por tanto, si el enlazador tiene la estructura $-A-L^1-L^2-$, entonces este no contendría preferentemente un grupo amino libre. Esta preferencia es particularmente pertinente cuando el enlazador contiene un dipéptido, por ejemplo como L^1 ; en esta realización, se preferiría que uno de los dos aminoácidos no se seleccione entre lisina.

10 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los inventores de la presente invención han descubierto que la combinación de un enlace de imina sin proteger en el grupo farmacológico y un grupo amino libre en el enlazador provocan la dimerización del este fármaco-enlazador que puede interferir con la conjugación de dicho grupo fármaco-enlazador a un anticuerpo. La reacción cruzada de estos grupos puede acelerarse en caso de que el grupo amino esté presente como un ion amonio (H_3N^+), tal como cuando se ha usado un ácido fuerte (por ejemplo, TFA) para desproteger el grupo amino libre.

15 En una realización, A es un enlace covalente. Por lo tanto, L^1 y el agente de unión a célula están conectados directamente. Por ejemplo, cuando L^1 comprende una secuencia de aminoácido contigua, el extremo N-terminal de esta secuencia puede conectar directamente al agente de unión a célula.

Por lo tanto, cuando A es un enlace covalente, la conexión entre el agente de unión a célula y L^1 puede seleccionarse entre:

25 -C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 30 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH-,
 -NHC(=O)NH-,
 -C(=O)NHC(=O)-,
 -S-,
 35 -S-S-,
 -CH₂C(=O)-, y
 =N-NH-.

40 Un grupo amino de L^1 que conecta al agente de unión a célula puede ser el extremo N-terminal de un aminoácido o puede obtenerse a partir de un grupo amino de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, una cadena lateral de aminoácido de lisina.

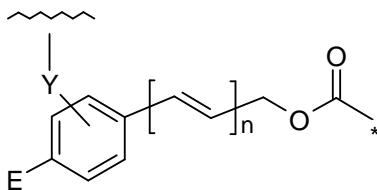
45 Un grupo carboxilo de L^1 que conecta el agente de unión a célula puede estar en el extremo C-terminal de un aminoácido o puede obtenerse a partir de un grupo carboxilo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral de aminoácido de ácido glutámico.

Un grupo hidroxilo de L^1 que conecta al agente de unión a célula puede obtenerse a partir de un grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral de aminoácido de serina.

50 Un grupo tiol de L^1 que conecta al agente de unión a célula puede obtenerse a partir de un grupo tiol de una cadena lateral de aminoácido, por ejemplo una cadena lateral de aminoácido de serina.

Los comentarios anteriores en relación a los grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol de L^1 también se aplican al agente de unión a célula.

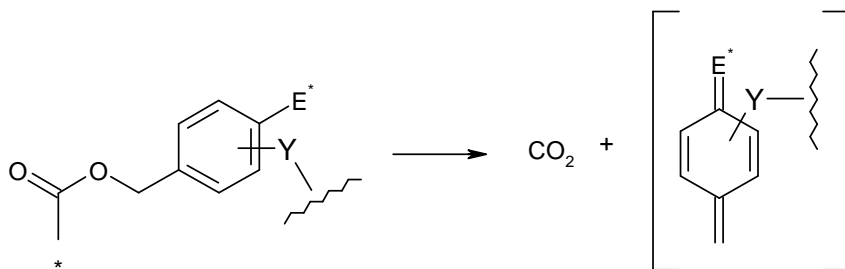
En una realización, L² junto con -OC(=O)- representa:



en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, la línea ondulada indica el punto de unión a L¹, n es de 0 a 3, Y es un enlace covalente o un grupo funcional, y E es un grupo activable, por ejemplo por acción enzimática o luz, para generar de esta manera una unidad de auto-destrucción. El anillo fenileno está opcionalmente sustituido adicionalmente con uno, dos o tres sustituyentes como se describen en el presente documento. En una realización, el grupo fenileno está opcionalmente sustituido adicionalmente con halo, NO₂, R u OR. Preferentemente n es 0 ó 1, lo más preferido 0.

E se selecciona para el grupo sea susceptible a activación, por ejemplo, por medio de luz o por la reacción de una enzima. E puede ser -NO₂ o ácido glucorónico. El primero puede ser susceptible a la acción de una nitroreductasa, el último a la acción de una β-glucoronidasa.

En esta realización, el enlazador de auto-destrucción permitirá la liberación del compuesto protegido cuando se active E, realizándose de la forma que se indica a continuación (para n = 0):



en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, E^{*} es la forma activada de E, e Y es como se ha descrito anteriormente. Estos grupos tienen la ventaja de separar el sitio de activación del compuesto que se está protegiendo. Como se ha descrito anteriormente, el grupo fenileno puede estar opcionalmente sustituido adicionalmente.

El grupo Y puede ser un enlace covalente con L¹.

El grupo Y puede ser un grupo funcional seleccionado entre:

- C(=O)-
- NH-
- O-
- C(=O)NH-
- C(=O)O-
- NHC(=O)-
- OC(=O)-
- OC(=O)O-
- NHC(=O)O-
- OC(=O)NH-
- NHC(=O)NH-
- NHC(=O)NH-
- C(=O)NHC(=O)-, y
- S-

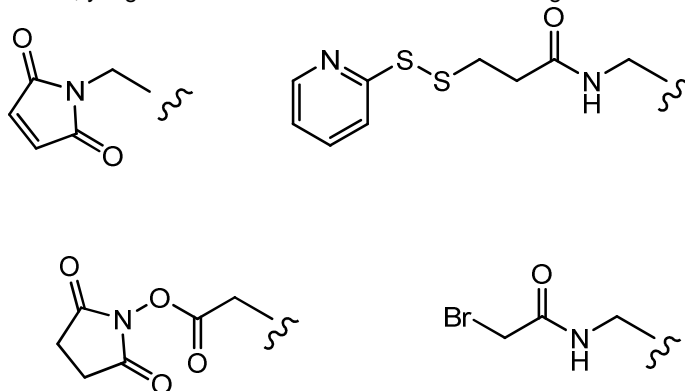
Cuando L¹ es un dipéptido, se prefiere que Y sea -NH- o -C(=O)-, para formar de esta manera un enlace de amida entre L¹ e Y. En esta realización, la secuencia dipeptídica no necesita ser un sustrato para una actividad enzimática.

En otra realización, A es un grupo espaciador. Por lo tanto, L¹ y el agente de unión a célula está conectados indirectamente.

L¹ y A pueden estar conectados mediante un enlace seleccionado entre:

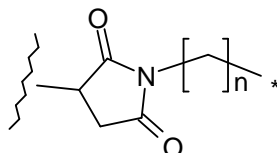
-C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 5 -OC(=O)O-,
 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH-, y
 -NHC(=O)NH-.

- 10 Preferentemente, el enlazador contiene un grupo funcional electrófilo para la reacción con un grupo funcional nucleófilo en el agente de unión a célula. Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos de amina en el extremo N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar cuando el anticuerpo es glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilo en grupos de enlazador y reactivos de enlazador, incluyendo: (i) grupos maleimida (ii) disulfuros activados, (iii) ésteres activos, tales como ésteres de NHS (N-hidroxisuccinimida), ésteres de HOBt (N-hidroxibenzotriazol), haloformiatos y haluros de ácido; (iv) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; y (v) aldehídos, cetonas, carboxilo, y algunos de los mismos se ilustran de la siguiente manera:



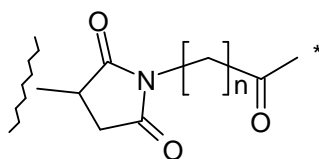
- 20 Determinadas realizaciones tienen disulfuros reducibles dentro de la cadena, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para su conjugación con reactivos de enlazador por tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotretitol). Por tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuo aminoácidos de cisteína no nativa). El documento US 7521541 enseña el diseño de anticuerpos por introducción de aminoácidos de cisteína reactivos.
- 25
- 30 En algunas realizaciones, un Enlazador tiene un grupo nucleófilo reactivo, que es reactivo con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos reactivos útiles en un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, aldehído, cetona u grupos carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un Enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un Enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidroxilo, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un Enlazador.

35 En una realización, el grupo A es:



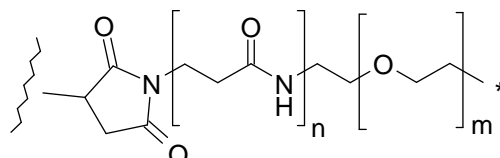
- 40 en el que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo A es:



en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

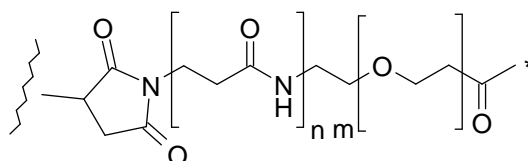
5 En una realización, el grupo A es:



en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, n es 0 ó 1, y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, y lo más preferido 4 u 8. En otra realización, m es de 10 a 30, y preferentemente de 20 a 30. Como alternativa, m es de 0 a 50. En esta realización, m es preferentemente 10-40 y n es 1.

10

En una realización, el grupo A es:



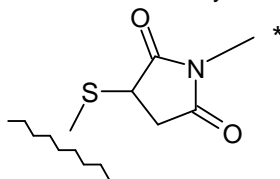
en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, n es 0 ó 1 y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, y lo más preferidos de 4 u 8. En otra realización, m es de 10 a 30, y preferentemente de 20 a 30. Como alternativa, m es de 0 a 50. En esta realización, m es preferentemente 10-40 y n es 1.

15

En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y A es a través de un residuo de tiol del agente de unión a célula y un grupo maleimida de A.

20

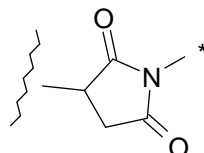
En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y A es:



en el que el asterisco indica el punto de unión a la porción restante de A y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante del agente de unión a célula. En esta realización, el átomo de S se obtiene típicamente a partir del agente de unión a célula.

25

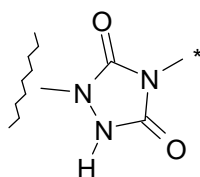
En cada una de las realizaciones anteriores, puede usarse una funcionalidad alternativa en lugar del grupo derivado de maleimida que se muestra a continuación:



30

en el que la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula como antes, y el asterisco indica el enlace a la porción restante del grupo A.

En una realización, el grupo derivado de maleimida está reemplazado por el grupo:

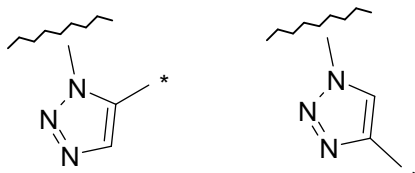


en el que la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, y el asterisco indica el enlace a la porción restante del grupo A.

5 En una realización, el grupo derivado de maleimida está reemplazado por un grupo, que opcionalmente junto con el agente de unión a célula, se selecciona entre:

- 10 -C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH-,
 15 -NHC(=O)NH-,
 -NHC(=O)NH,
 -C(=O)NHC(=O)-,
 -S-,
 -S-S-,
 20 -CH₂C(=O)-
 -C(=O)CH₂-,
 =N-NH- y
 -NH-N=.

25 En una realización, el grupo derivado de maleimida está reemplazado por un grupo, que opcionalmente junto con el agente de unión a célula, se selecciona entre:



30 en los que la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula o el enlace a la porción restante del grupo A, y el asterisco indica el otro punto de unión al agente de unión a célula o el enlace a la porción restante del grupo A.

Otros grupos adecuados para conectar L¹ al agente de unión a célula se describen en el documento WO 2005/082023.

35 El grupo R¹⁰ es derivable del grupo R^L. El grupo R^L puede convertirse en un grupo R¹⁰ por conexión de un agente de unión a célula a un grupo funcional de R^L. Pueden tomarse otras etapas para convertir R^L en R¹⁰. Estas etapas pueden incluir la eliminación de grupos protectores, cuando estén presentes, o a la introducción de un grupo funcional adecuado.

40 Q

En una realización, Q se selecciona entre O, S o N(H).

Preferentemente, Q es O.

45 R¹¹

En una realización, R¹¹ es H o R o, cuando Q es O, SO₃M, en el que M es un catión metálico.

50 En una realización, R¹¹ es H.

En una realización, R¹¹ es R.

En una realización, cuando Q es O, R¹¹ es SO₃M, en el que M es un catión metálico. El catión puede ser Na⁺.

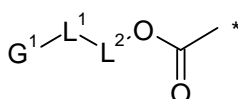
R^L

5 En una realización, R^L es un enlazador para la conexión a un agente de unión a célula.

En una realización, el enlazador se proporciona con un grupo funcional para formar una conexión a un agente de unión a célula. La presente solicitud se refiere particularmente a aquellos grupos R^L que tienen una unión carbamato en la posición N10. La descripción del grupo de enlazador en R¹⁰ anterior también es relevante para sus precursores inmediatos en el presente documento.

R^L es diferente de R^C, que no es adecuado para reacción con un agente de unión a célula. Sin embargo, en algunas realizaciones, R^C puede convertirse en un grupo R^L, por ejemplo mediante manipulación adecuada de los grupos protectores y otras funcionalidades que son, o forman parte de, R^C.

15 En una realización, R^L es un grupo:



20 en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, G¹ es un grupo funcional para formar una conexión a un agente de unión a célula, L¹ es un enlazador, L² es un enlace covalente o junto con -OC(=O)- forma un enlazador de auto-destrucción, y L¹ o L² es un enlazador escindible.

L¹ y L² son como se han definido anteriormente en relación a R¹⁰. Las referencias a la conexión con A pueden interpretarse en el presente documento en referencia a la conexión con G¹.

25 En una realización, cuando L¹ comprende un aminoácido, la cadena lateral de dicho aminoácido puede estar protegida. Puede usarse cualquier grupo protector adecuado. En una realización, los grupos protectores de cadena lateral pueden eliminarse con otros grupos protectores en el compuesto, cuando estén presentes. En otras realizaciones, los grupos protectores pueden ser ortogonales con respecto a otros grupos protectores en la molécula, cuando estén presentes.

30 Los grupos protectores adecuados para las cadenas laterales de aminoácidos incluyen los grupos que se describen en Novabiochem Catalog 2006/2007. También se describen grupos protectores para su uso en un enlazador lábil de catepsina en Dubowchik y col.

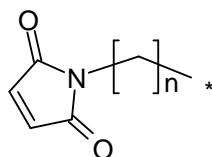
35 En ciertas realizaciones de la invención, el grupo L¹ incluye un residuo aminoácido Lys. La cadena lateral de este aminoácido puede estar protegida con un grupo protector Boc o Alloc. Se prefiere más un grupo protector Boc.

El grupo funcional G¹ forma un grupo de conexión A después de reacción un agente de unión a célula.

40 En una realización, el grupo funcional G¹ es o comprende un grupo amino, ácido carboxílico, hidroxilo, tiol o maleimida para reacción con un grupo adecuado en el agente de unión a célula. En una realización preferida, G¹ comprende un grupo maleimida.

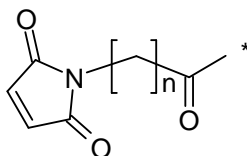
45 En una realización, el grupo G¹ es un grupo alquil maleimida. Este grupo es adecuado para reacción con grupos tiol, particularmente grupos tiol de cisteína, presentes en el agente de unión a célula, por ejemplo presentes en un anticuerpo.

En una realización, el grupo G¹ es:



50 en el que el asterisco indica el punto de unión a L¹ y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

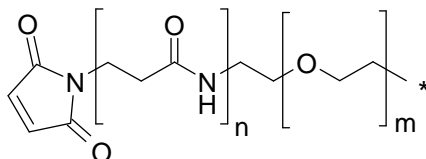
En una realización, el grupo G¹ es:



ES 2 430 567 T3

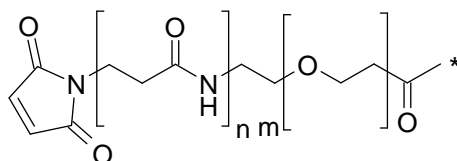
en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 y n es de 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo G^1 es:



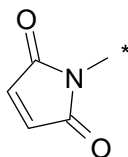
- 5 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , n es 0 ó 1, y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 2, preferentemente de 4 a 8 y lo más preferido 4 u 8. Como alternativa, m es de 0 a 50. En esta realización, m es preferentemente 10-40 y n es 1.

En una realización, el grupo G^1 es:



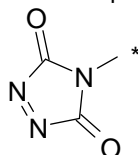
- 10 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , n es 0 ó 1, y m es de 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 8, preferentemente de 4 a 8, y lo más preferido 4 u 8. Como alternativa, m es de 0 a 50. En esta realización, m es preferentemente 10-40 y n es 1.

- 15 En cada una de las realizaciones anteriores, puede usarse una funcionalidad alternativa en lugar del grupo maleimida que se muestra a continuación:



en el que el asterisco indica el enlace a la porción restante del grupo G.

- 20 En una realización, el grupo derivado de maleimida está reemplazado por el grupo:



en el que el asterisco indica el enlace a la porción restante del grupo G.

En una realización, el grupo maleimida está reemplazado por un grupo seleccionado entre:

- 25
 -C(=O)OH,
 -OH,
 -NH₂,
 -SH,
 30 -C(=O)CH₂D, en el que D es Cl, Br o I,
 -CHO,
 -NHNH₂
 -C≡CH y
 -N₃ (azida).

- 35 En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es -NH₂, -NHMe, -COOH, -OH o -SH.

En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es -NH₂ o -NHMe. Cualquiera de los grupos puede estar en el extremo N-terminal de una secuencia aminoacídica de L^1 .

- 40 En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es -NH₂, y L^1 es una secuencia aminoacídica -X₁-X₂-, como se ha definido anteriormente en relación a R^{10} .

En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es COOH. Este grupo puede estar en el extremo C-terminal de una

secuencia aminoacídica de L^1 .

En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es OH.

5 En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es SH.

10 El grupo G^1 puede convertirse de un grupo funcional a otro. En una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es $-NH_2$. Este grupo puede convertirse en otro grupo G^1 que comprende un grupo maleimida. Por ejemplo, el grupo $-NH_2$ puede hacerse reaccionar con un ácido o ácido activado (por ejemplo, formas de N-succinimida) de estos grupos G^1 que comprende la maleimida mostrada anteriormente.

Por tanto, el grupo G^1 puede convertirse en un grupo funcional que sea más adecuado para reacción con un agente de unión a célula.

15 En otras realizaciones, R^L es un grupo que es un precursor para el enlazador que se proporciona con un grupo funcional.

20 Como se ha indicado anteriormente, en una realización, cuando L^1 está presente, G^1 es $-NH_2$, $-NHMe$, $-COOH$, $-OH$ o $-SH$. En una realización adicional, estos grupos se proporcionan en una forma químicamente protegida. Por tanto, la forma protegida químicamente es un precursor para el enlazador que se proporciona con un grupo funcional.

En una realización, G^1 es $-NH_2$ en una forma químicamente protegida. El grupo puede protegerse con un grupo protector carbamato. El grupo protector carbamato puede seleccionarse del grupo que consiste en:

25 Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Cbz y PNZ.

Preferentemente, cuando G^1 es $-NH_2$, está protegido con un grupo Alloc o Fmoc.

30 En una realización, cuando G^1 es $-NH_2$, está protegido con un grupo Fmoc.

En una realización, el grupo protector es igual que el grupo protector de carbamato del grupo de terminación.

35 En una realización, el grupo protector no es igual que el grupo protector de carbamato del grupo de terminación. En esta realización, se prefiere que el grupo protector pueda eliminarse en condiciones que no eliminen el grupo protector de carbamato del grupo de terminación.

40 El grupo protector químico puede eliminarse para proporcionar un grupo funcional para formar una conexión a un agente de unión a célula. Opcionalmente, este grupo funcional puede después convertirse en otro grupo funcional como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el grupo activo es una amina. Esta amina es preferentemente la amina N-terminal de un péptido, y puede estar en la amina N-terminal de los dipéptidos preferidos de la invención.

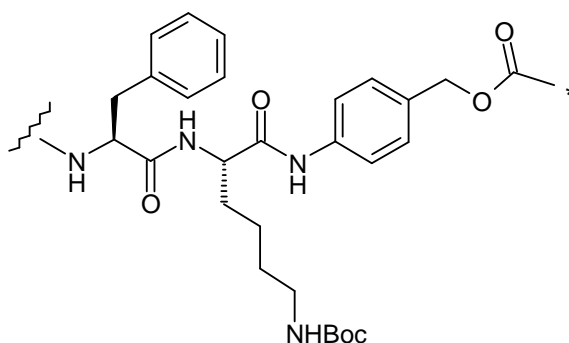
45 El grupo activo puede hacerse reaccionar para producir el grupo funcional que se pretende para formar una conexión a un agente de unión a célula.

50 En otras realizaciones, el enlazador es un precursor para el enlazador que tiene un grupo activo. En esta realización, el enlazador comprende el grupo activo, que está protegido mediante un grupo protector. El grupo protector puede eliminarse para proporcionar el enlazador que tiene un grupo activo. Cuando el grupo activo es una amina, el grupo protector puede ser un grupo protector de amina, tal como los que se describen en Green y Wuts.

El grupo protector es preferentemente ortogonal con respecto a otros grupos protectores, cuando estén presentes, en el grupo R^L .

55 En una realización, el grupo protector es ortogonal con respecto al grupo de terminación. Por lo tanto, el grupo protector del grupo activo puede eliminarse mientras se conserva el grupo de terminación. En otras realizaciones, el grupo protector y el grupo de terminación pueden eliminarse en las mismas condiciones que las usadas para eliminar el grupo de terminación.

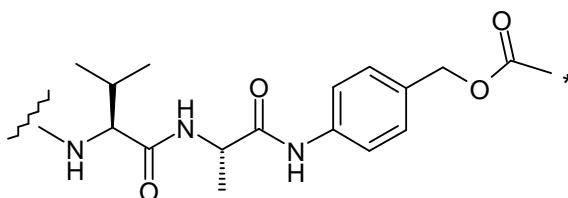
60 En una realización, R^L es:



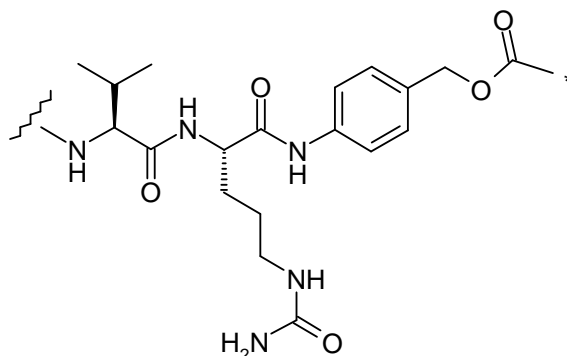
en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante del enlazador L¹ o el punto de unión a G¹. Preferentemente, la línea ondulada indica el punto de unión a G¹.

5

En una realización, R^L es:



en el que el asterisco y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

10 En una realización, R^L es:

en el que el asterisco y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

15 Otros grupos funcionales adecuados para su uso en la formación de una conexión entre L¹ y el agente de unión a célula se describen en el documento WO 2005/082023.20 Los enlazadores incluyen grupos peptídicos escindibles de proteasas que comprenden una o más unidades aminoácidas. Pueden prepararse reactivos enlazadores a péptido por procedimientos de síntesis en fase sólida o en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press) que se conocen bien en el campo de la química de péptidos, incluyendo química de t-BOC (Geiser y col. "Automation of solid-phase peptide synthesis" en *Macromolecular Sequencing y Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) y química de Fmoc/HBTU (Fields, G. y Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis using 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214), en un sintetizador automático, tal como el Rainin Symphony Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ), o Model 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

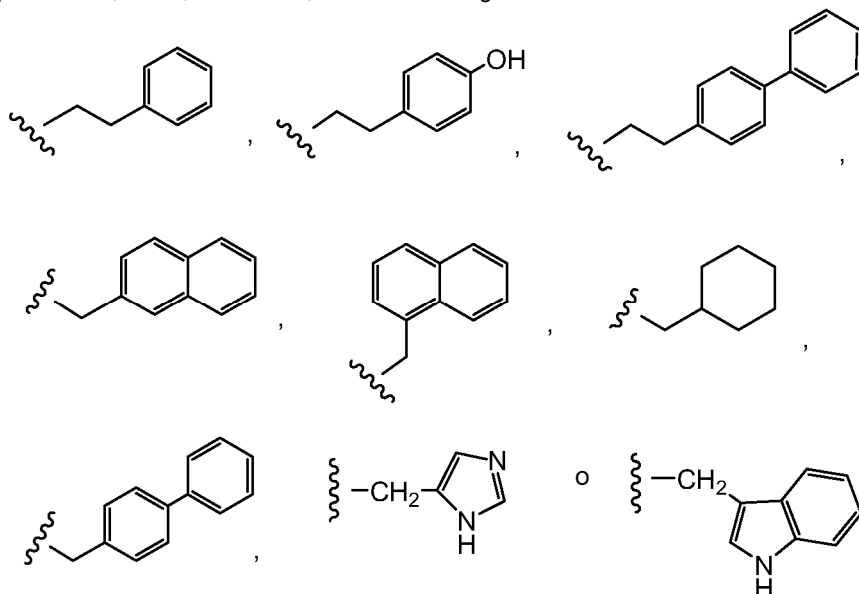
25 Los enlazadores de aminoácido de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos aminoácidos que comprenden un componente de enlazador aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos aminoácidos que no son de origen natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse y optimizarse componentes de enlazador aminoácido en su selectividad para escisión enzimática por enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una proteasa plasmína.

30 Los aminoácidos de cadena lateral incluyen aquellos que aparecen en la naturaleza, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no aparecen en la naturaleza, tales como citrulina. Las cadenas laterales de

35

aminoácido incluyen hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, así como las siguientes estructuras:

5



Cuando las cadenas laterales de aminoácido incluyen otras distintas de hidrógeno (glicina), el átomo de carbono al que la cadena lateral de aminoácido está unida es quiral. Cada átomo de carbono al que la cadena lateral de aminoácido está unida está independientemente en la configuración (*S*) o (*R*), o es una mezcla racémica. Los reactivos de enlazador a fármaco pueden por tanto ser enantioméricamente puros, racémicos o diastereoméricos.

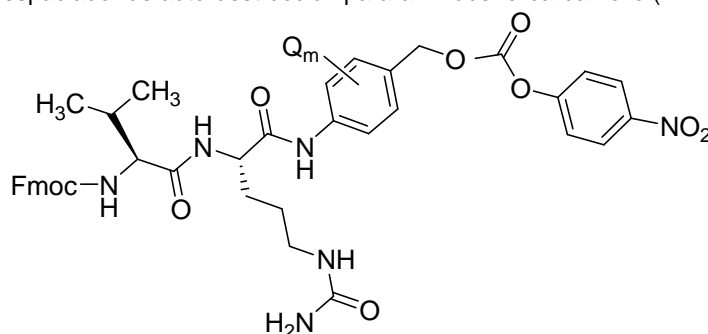
10

En realizaciones de ejemplo, las cadenas laterales de aminoácido se seleccionan entre aminoácidos naturales y no naturales, incluyendo alanina, ácido 2-amino-2-ciclohexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil γ -aminobutírico, ácido β,β -dimetil γ -aminobutírico, ornitina, y citrulina (Cit).

15

Un reactivo de enlazador dipeptídico valina-citrulina (val-cit o vc) de ejemplo, útil para la construcción de un intermedio del grupo farmacológico PBD-enlazador para conjugación a un agente de unión a célula, por ejemplo un anticuerpo, que tiene un espaciador de auto-destrucción para-aminobencilcarbamóilo (PAB), tiene la estructura:

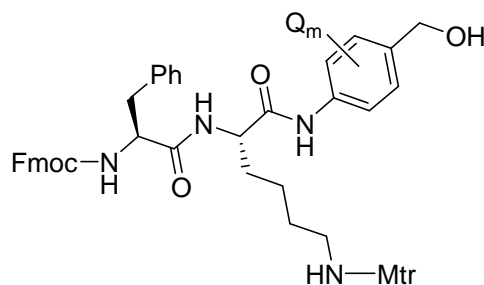
20



en la que Q es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $-\text{O}$ -(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$), $-\text{halógeno}$, $-\text{NO}_2$ o $-\text{CN}$; y m es un número entero que varía de 0-4.

Un reactivo enlazador dipeptídico phe-lys (Mtr) de ejemplo que tiene un grupo p-aminobencilo puede prepararse de acuerdo con Dubowchik, y col. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, y tiene la estructura:

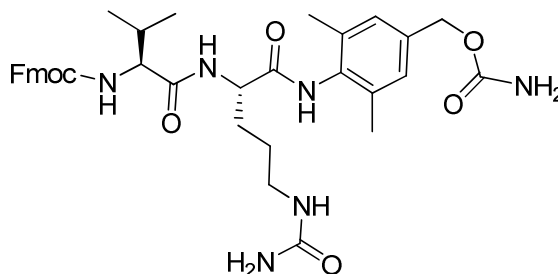
25



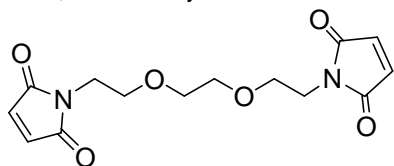
en la que Mtr es mono-4-metoxitritilo, Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -NO₂ o -CN; y m es un número entero que varía de 0-4.

5 El "enlazador de auto-destrucción" PAB (para-aminobenciloxycarbonilo), une el grupo farmacológico al anticuerpo en el conjugado de anticuerpo fármaco (Carl y col. (1981) J. Med. Chem. 24:479-480; Chakravarty y col.(1983) J. Med. Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; WO2004/032828). Otros ejemplos de espaciadores de auto-destrucción además de PAB incluyen, pero sin limitación: (i) compuestos aromáticos que son similares electrónicamente al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), tiazoles (US 7375078), unidades de PAB múltiples y alargadas (de Groot y col.(2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830); y orto o para-aminobencilacetales; y (ii) análogos de estiril PAB homologados (US 7223837). Pueden usarse espaciadores que experimenten ciclación después hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodríguez y col.(1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillo biciclo[2,2,1] y biciclo[2,2,2] adecuadamente sustituidos (Storm y col.(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, y col.(1990) J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la glicina (Kingsbury y col.(1984) J. Med. Chem. 27:1447) también son ejemplos de espaciadores de auto-destrucción útiles en ADC.

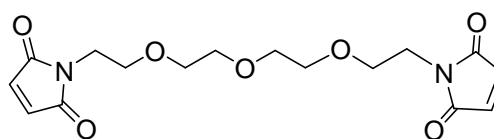
En una realización, un reactivo análogo de PAB dipeptídico de valina-citrulina tiene un grupo a 2,6-dimetilfenilo y tiene la estructura:



25 Los reactivos enlazadores útiles para los conjugados de anticuerpo fármaco de la invención incluyen, pero sin limitación: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) y reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietilenglicol (BM(PEO)₂) y 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol (BM(PEO)₃), que están disponibles en el mercado de Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, y otros proveedores de reactivos. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión del grupo tiol libre de un residuo de cisteína de un anticuerpo a un grupo, marcador o enlazador intermedio de fármaco que contiene tiol, de una manera secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo, grupo farmacológico PBD o intermedio de enlazador incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato y isotiocianato.



BM(PEO)₂



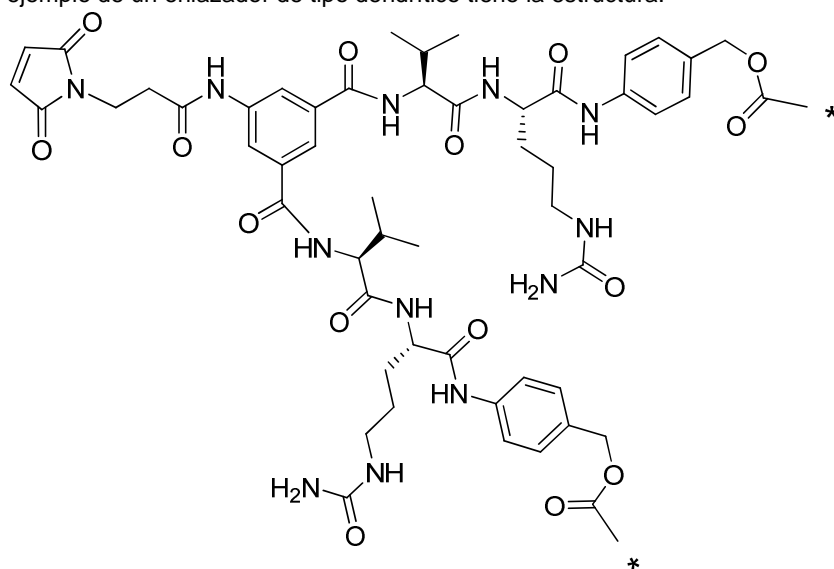
BM(PEO)₃

35 Otras realizaciones de reactivos enlazadores son: N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP, Carlsson y col.(1978) Biochem. J. 173:723-737), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como

glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). También pueden obtenerse reactivos de enlazador útiles mediante otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con procedimientos descritos en Toki y col.(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

El Enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para una unión covalente de más de un grupo farmacológico a través de un grupo enlazador ramificado multifuncional a un anticuerpo (US 2006/116422; US 2005/271615; de Groot y col.(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494; Amir y col.(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499; Shamis y col.(2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731; Sun y col.(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun y col.(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King y col.(2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la proporción molar del fármaco con respecto al anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo porta solo un grupo tiol de cisteína reactivo, una multitud de grupos farmacológicos pueden unirse a través de un enlazador dendrítico o ramificado.

Una realización de ejemplo de un enlazador de tipo dendrítico tiene la estructura:



en la que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10 de un grupo de PBD.

Agente de unión a célula

Son posibles un conjunto de tipos de agentes de unión a célula, incluyendo péptidos y no péptidos. Estos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas para transporte de nutrientes o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula. En la presente invención, el agente de unión a célula se selecciona entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Miller y col. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, New York). En general, un antígeno diana tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, pero sin limitación, células cancerosas o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina para ser de cualquier tipo (IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie, incluidos los orígenes humano, murino o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el fragmento de unión a antígeno o una región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de una cadena y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que pueden sintetizarse no contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler, y col., (1975) *Nature* 256:495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales pueden también aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson, y col. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks, y col., (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el grupo de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison, y col. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del viejo mundo o simio) y secuencias de la región constante humana.

En el presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios VL y VH, así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de la secuencia nativa humana) o una variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o una región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; y regulación por disminución de los receptores de superficie, tal como el receptor de células B y BCR.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de éstos pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Ejemplos de agentes de unión a célula incluyen los agentes descritos para usar en el documento WO 2007/085930.

El agente de unión a célula puede ser un polipéptido cíclico. El agente de unión a célula puede ser un anticuerpo. Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

Carga del fármaco

La carga de fármaco es el número promedio de fármacos PBD por anticuerpo. La carga de anticuerpo puede variar de 1 a 8 fármacos (F) por anticuerpo (Ab), es decir cuando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 grupos farmacológicos están unidos covalentemente al anticuerpo. Las composiciones de ADC incluyen grupos de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación se pueden caracterizar por medios convencionales, tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA, electroforesis y HPLC. La distribución cuantitativa de ADC en términos de p también se puede determinar. Se puede determinar mediante ELISA, el valor promedio de p en una preparación concreta de

ADC (Hamblett y col. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson y col. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). No obstante, la distribución de los valores p (fármaco) no se puede discernir por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de los ELISA. Asimismo, el ensayo ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina donde se unen los grupos de fármaco al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o de la cadena ligera, o los residuos aminoacídicos concretos. En algunos casos, se puede conseguir la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un valor cierto a partir de ADC con otras cargas de fármaco por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos de cisteína tiol o puede tener solo uno o varios grupos tiol reactivos suficientemente a través de los cuales se puede unir un enlazador. Cargas mayores de fármaco, por ejemplo $p > 5$, pueden producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

Normalmente, menos del máximo teórico de los grupos farmacológicos está conjugado con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el intermedio enlazador del fármaco (D-L) o reactivo enlazador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con amina. Asimismo, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con tiol. En general, los anticuerpos no contienen muchos, si contienen alguno, grupos tiol libres de cisteína y reactivos que pueden estar unidos a un grupo farmacológico. La mayoría de los grupos tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, en condiciones de reducción parcial o total. La carga (proporción fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varios modos, incluidos: (i) limitar el exceso molar del intermedio fármaco-enlazador (D-L) o el reactivo enlazador respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de la reacción de conjugación o la temperatura; y (iii) condiciones reductoras parciales o limitadas para la modificación de la cisteína tiol.

Los aminoácidos de cisteína se pueden diseñar en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman puentes disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, y col., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan y col (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249). Los tioles de cisteína diseñada pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los reactivos enlazadores del fármaco de la presente invención que tienen grupos electrófilos reactivos con tiol, tal como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos modificados con cisteína y los grupos del fármaco PBD. Por tanto, la localización del grupo farmacológico puede diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco se puede controlar, ya que los grupos tiol de cisteína diseñada normalmente reaccionan con reactivos enlazadores reactivos con tiol o reactivos enlazadores de fármaco con un rendimiento elevado. El diseño de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína mediante sustitución en un único sitio en las cadenas pesada o ligera proporciona dos cisteínas nuevas en el anticuerpo simétrico. Se puede conseguir una carga de fármaco de casi 2 y la casi homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermedio enlazador con fármaco, o reactivo enlazador seguido del reactivo del grupo farmacológico, el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de grupos farmacológicos unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3 etc. Los métodos de cromatografía líquida, tales como de fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrófoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por valor de carga de fármaco. Las preparaciones de ADC con un valor único de carga de fármaco (p) se pueden aislar. No obstante, estos ADC de valor de carga único pueden ser mezclas heterogéneas porque los grupos farmacológicos pueden estar unidos, mediante el enlazador, en diferentes sitios sobre el anticuerpo.

Por tanto, las composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco en los que el anticuerpo tiene uno o más grupos de fármaco de PBD y en las que los grupos farmacológicos pueden estar unidos al anticuerpo en varios residuos de aminoácidos.

En una realización, el número medio de grupos monoméricos o diméricos de pirrolobenzodiazepina por agente de unión a célula está en el intervalo de 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo se selecciona de 1 a 8, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4 y de 4 a 8.

En algunas realizaciones, hay un grupo dimérico de pirrolobenzodiazepina por agente de unión a célula.

Péptidos

En una realización, el agente de unión a célula es un péptido cíclico que comprende 4-20, preferentemente 6-20, residuos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión a célula esté unido a un compuesto dimérico de pirrolobenzodiazepina.

En una realización, el agente de unión a célula comprende un péptido que se une a integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede

ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ sobre XYS.

En una realización, el agente de unión a célula comprende el polipéptido A20FMDV-Cys . El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Como alternativa se puede usar una variante de la secuencia A20FMDV-Cys en la que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos están sustituidos por otro residuo de aminoácido.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; anticuerpo quimérico; anticuerpo humanizado; anticuerpo completamente humano o un anticuerpo monocatenario. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de uno de estos anticuerpos que tienen actividad biológica. Ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

En estas realizaciones, cada anticuerpo puede estar unido a uno o varios grupos diméricos de pirrolobenzodiacepina. Las proporciones preferidas entre la pirrolobenzodiacepina y el agente de unión a célula se proporcionan anteriormente.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo de dominio (DAB).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos para usar en la presente invención incluyen los anticuerpos descritos en el documento WO 2005/082023. Particularmente preferidos son los anticuerpos para antígenos asociados a tumores. Ejemplos de los antígenos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, los antígenos asociados a tumores indicados en el documento WO 2005/082023. Véase, por ejemplo, las páginas 41-55.

Los conjugados de la invención están modificados para dirigirse a células tumorales diana a través de sus antígenos de la superficie celular. Normalmente, los antígenos son antígenos de la superficie celular normales que se sobreexpresan o expresan en momentos anormales. Idealmente, el antígeno diana solo se expresa en células proliferativas (preferentemente células tumorales), no obstante, esto rara vez se observa en la práctica. Como resultado, los antígenos diana normalmente se seleccionan en base a la expresión diferencial entre tejido proliferativo y sano.

Se han producido anticuerpos frente a antígenos relacionados con tumores específicos de la diana, que incluyen:

Cripto, CD30, CD19, CD33, Glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD22 (Siglec2), CD33 (Siglec3), CD79, CD138, PSCA, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), BCMA, CD20, CD70, E-selectina, EphB2, Melanotransferina, Muc16 y TMEFF2.

En la técnica se conocen antígenos asociados con tumores (AAT) y se pueden preparar para usar en la generación de anticuerpos usando procedimientos e información conocidos en la técnica. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o, de otro modo, asociados con tumores que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipos concretos de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados con tumores se expresan de forma más abundante sobre la superficie de las células cancerosas en comparación con sobre la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antigénicos de superficie celular asociados con tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a células cancerosas para la destrucción mediante terapias basadas en anticuerpos.

Ejemplos de AAT incluyen, pero sin limitación, AAT (1)-(36) que se indican a continuación. Por comodidad, la información en relación de estos antígeno, todos ellos conocidos en la técnica, se indica a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de registro en Genbank y referencia(s) primarias, siguiendo consensos de identificación de ácido nucleico y de proteínas del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI). Las secuencias de ácido nucleico y de proteínas correspondientes a los AAT (1)-(36) están disponibles en las bases de datos públicas, tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores a los que están dirigidos los anticuerpos incluyen variantes de secuencias de aminoácidos e isoformas que poseen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades biológicas o características como un ATT que tiene una secuencia encontrada en las referencias citadas. Por ejemplo, un AAT que tiene una secuencia variante generalmente puede unirse a específicamente un anticuerpo que se une específicamente al ATT con la correspondiente secuencia indicada. Las secuencias y divulgación en la referencia citada específicamente en el presente documento se incorporan expresamente por referencia.

ANTÍGENOS ASOCIADOS CON TUMORES (1)-(36):

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB, N° de registro en Genbank NM_001203) ten Dijke, P., y col. *Science* 264 (5155):101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997)); documento

- WO2004/063362 (Reivindicación 22); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (Páginas 38-39); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003/055443 (Página 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; Página 528-530); documento WO2003/029421 (Reivindicación 6); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig 112); documento WO2002/98358 (Reivindicación 1; Página 183); documento WO2002/54940 (Página 100-101); documento WO2002/59377 (Página 349-350); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 376); documento WO2001/48204 (Ejemplo; Fig 4); NP_001194 receptor de proteína morfogenética ósea de tipo IB /pid=NP_001194.1. Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5, nº de registro en Genbank NM_003486) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., y col. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/99074 (Reivindicación 19; Página 127-129); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Página 93-95); documento WO2000/14228 (Reivindicación 5; Página 133-136); documento US2003/224454 (Fig 3); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 150); NP_003477 familia del transportador de solutos 7 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens; Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1
- (3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata, nº de registro en Genbank NM_012449); *Cancer Res.* 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., y col. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528; documento WO2004/065577 (Reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Fig 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/157089 (Ejemplo 5); documento US2003/185830 (Ejemplo 5); documento US2003/064397 (Fig 2); documento WO2002/89747 (Ejemplo 5; Página 618-619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig 2A); NP_036581 seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata; Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1
- (4) 0772P (CA125, MUC16, nº de registro en Genbank AF361486); *J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375 (2001); documento WO2004/045553 (Reivindicación 14); documento WO2002/92836 (Reivindicación 6; Fig 12); documento WO2002/83866 (Reivindicación 15; Página 116-121); documento US2003/124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina, nº de registro en Genbank NM_005823) Yamaguchi, N., y col. *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995); documento WO2003/101283 (Reivindicación 14); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 287-288); documento WO2002/101075 (Reivindicación 4; Página 308-309); documento WO2002/71928 (Página 320-321); documento WO94/10312 (Página 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II, nº de registro en Genbank NM_006424) *J. Biol. Chem.* 277 (22):19665-19672 (2002), *Genomics* 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582; documento WO2004/022778 (Reivindicación 2); documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 326); documento EP0875569 (Reivindicación 1; Página 17-19); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2001/75177 (Reivindicación 24; Página 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, nº de registro en Genbank AB040878); Nagase T., y col. (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150; documento WO2004/000997 (Reivindicación 1); documento WO2003/003984 (Reivindicación 1); documento WO2002/06339 (Reivindicación 1; Página 50); documento WO2001/88133 (Reivindicación 1; Página 41-43, 48-58); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Registro: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, gen RIKEN ADNc 2700050C12, nº de registro en Genbank AY358628); Ross y col. (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553; documento US2003/129192 (Reivindicación 2); documento US2004/044180 (Reivindicación 12); documento US2004/044179 (Reivindicación 11); documento US2003/096961 (Reivindicación 11); documento

US2003/232056 (Ejemplo 5); documento WO2003/105758 (Reivindicación 12); documento US2003/206918 (Ejemplo 5); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

5 (9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B, N° de registro en Genbank AY275463); Nakamuta M., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., y col. *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., y col. *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., y col. *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., y col. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., y col. *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., y col. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., y col. *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., y col. *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., y col. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., y col. *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., y col., *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., y col. *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., y col. *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., y col. *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., y col. *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., y col. *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., y col. (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004/045516 (Reivindicación 1); documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/040000 (Reivindicación 151); documento WO2003/087768 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/61087 (Fig 1); documento WO2003/016494 (Fig 6); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO2001/98351 (Reivindicación 1; Página 124-125); documento EP0522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO2001/77172 (Reivindicación 1; Página 297-299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004/001004

25 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, n° de registro en Genbank NM_017763); documento WO2003/104275 (Reivindicación 1); documento WO2004/046342 (Ejemplo 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/083074 (Reivindicación 14; Página 61); documento WO2003/018621 (Reivindicación 1); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig 93); documento WO2001/66689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1

30 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociada con el cáncer de próstata, proteína 1 asociada con el cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana, n° de registro en Genbank AF455138); Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (Reivindicación 1; Fig 1); documento WO2002/72596 (Reivindicación 13; Página 54-55); documento WO2001/72962 (Reivindicación 1; Fig 4B); documento WO2003/104270 (Reivindicación 11); documento WO2003/104270 (Reivindicación 16); documento US2004/005598 (Reivindicación 22); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/060612 (Reivindicación 12; Fig 10); documento WO2002/26822 (Reivindicación 23; Fig 2); documento WO2002/16429 (Reivindicación 12; Fig 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

35 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, n° de registro en Genbank NM_017636); Xu, X.Z., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003); documento US2003/143557 (Reivindicación 4); documento WO2000/40614 (Reivindicación 14; Página 100-103); documento WO2002/10382 (Reivindicación 1; Fig 9A); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 391); documento US2003/219806 (Reivindicación 4); documento WO2001/62794 (Reivindicación 14; Fig 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1

40 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de registro en Genbank NP_003203 o NM_003212); Ciccodicola, A., y col. *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555-565 (1991); documento US2003/224411 (Reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (Reivindicación 12); documento WO2002/88170 (Reivindicación 2; Página 52-53); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig 58); documento WO2002/16413 (Reivindicación 1; Página 94-95, 105); documento WO2002/22808 (Reivindicación 2; Fig 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Fig 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1

45 (14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 n° de registro M26004); Fujisaku y col. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., y col. *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., y col. *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., y col. (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento US2004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2004/045520

(Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Fig 9.1-9.9); documento WO2004/020595 (Reivindicación 1); Registro: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociado con inmunoglobulina), B29, nº de registro en Genbank NM_000626 o 11038674); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller y col. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2, Fig 140); documento WO2003/087768, documento US2004/101874 (Reivindicación 1, Página 102); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento US2002/150573 (Reivindicación 5, Página 15); documento US5644033; documento WO2003/048202 (Reivindicación 1, Páginas 306 y 309); documentos WO 99/58658, US6534482 (Reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO2000/55351 (Reivindicación 11, Páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, nº de registro en Genbank NM_030764, AY358130); *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., y col. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); documento WO2003/097803 (Reivindicación 12); documento WO2003/089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1

(17) HER2 (ErbB2, nº de registro en Genbank M11730); Coussens L., y col. *Science* (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., y col. *Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., y col. *J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., y col. *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., y col. *Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., y col. (1993) *Genomics* 15, 426-429; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Fig 11); documento WO2004/009622; documento WO2003/081210; documento WO2003/089904 (Reivindicación 9); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento US2003/118592; documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2003/055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); documento WO2003/025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); documento WO2002/22636 (Ejemplo 13; Página 95-107); documento WO2002/12341 (Reivindicación 68; Fig 7); documento WO2002/13847 (Página 71-74); documento WO2002/14503 (Página 114-117); documento WO2001/53463 (Reivindicación 2; Página 41-46); documento WO2001/41787 (Página 15); documento WO2000/44899 (Reivindicación 52; Fig 7); documento WO2000/20579 (Reivindicación 3; Fig 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Página 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig 4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1

(18) NCA (CEACAM6, nº de registro Genbank M18728); Barnett T., y col. *Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 2002; documento WO2004/063709; documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/044178 (Ejemplo 4); documento WO2004/031238; documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Página 427); documento WO2002/60317 (Reivindicación 2); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728

(19) MDP (DPEP1, Nº de registro en Genbank BC017023); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):16899-16903 (2002); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Página 85-87); documento JP05003790 (Fig 6-8); documento WO99/46284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, Nº de registro en Genbank AF184971); Clark H.F., y col. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., y col. *Nature* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., y col. *Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., y col. *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., y col. *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., y col. (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., y col. (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/005320 (Ejemplo 5); documento WO2003/029262 (Página 74-75); documento WO2003/002717 (Reivindicación 2; Página 63); documento WO2002/22153 (Página 45-47); documento US2002/042366 (Página 20-21); documento WO2001/46261 (Página 57-59); documento WO2001/46232 (Página 63-65); documento WO98/37193 (Reivindicación 1; Página 55-59); Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, Nº de registro en Genbank AF229053); Gary S.C., y col. *Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H.F., y col. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; documento US2003/186372 (Reivindicación 11); documento US2003/186373 (Reivindicación 11); documento US2003/119131 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003/119122 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003/119126 (Reivindicación 1); documento US2003/119121

(Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003/119129 (Reivindicación 1); documento US2003/119130 (Reivindicación 1); documento US2003/119128 (Reivindicación 1; Fig 52); documento US2003/119125 (Reivindicación 1); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/02634 (Reivindicación 1)

5
 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N° de registro Genbank NM_004442); Chan, J. y Watt, V.M., *Oncogene* 6 (6), 1057-1061 (1991) *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000); documento WO2003042661 (Reivindicación 12); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento
 10 WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Página 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004443.2; NM_004442_1

15
 (23) ASLG659 (B7h, N° de registro Genbank AX092328); documento US2004/0101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); documento WO2004000221 (Fig 3); documento US2003/165504 (Reivindicación 1); documento US2003/124140 (Ejemplo 2); documento US2003/065143 (Fig 60); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 299); documento US2003/091580 (Ejemplo 2); documento WO2002/10187 (Reivindicación 6; Fig 10); documento WO2001/94641 (Reivindicación 12; Fig 7b); documento WO2002/02624 (Reivindicación 13; Fig 1A-1B); documento US2002/034749 (Reivindicación
 20 54; Página 45-46); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; Página 320-321, Reivindicación 34; Página 321-322); documento WO2002/71928 (Página 468-469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig 1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; Página 205-207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (Página 233-234, 452-453); documento WO 01/16318

25
 (24) PSCA (precursor del antígeno de células madre prostáticas, n° de registro en Genbank AJ297436); Reiter R.E., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., y col. *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; WO2004/022709; EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/018553 (Reivindicación 17); documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento
 30 WO2002/81646 (Reivindicación 1; Página 164); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 288); documento WO2001/40309 (Ejemplo 1; Fig 17); documento US2001/055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); documento WO2000/32752 (Reivindicación 18; Fig 1); documento WO98/51805 (Reivindicación 17; Página 97); documento WO98/51824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO98/40403 (Reivindicación 2; Fig 1B); Registro: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1

35
 (25) GEDA (n° de registro en Genbank AY260763); Proteína de tipo pareja de fusión de HMGIC de lipoma); AAP14954 /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens (humano); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/000842 (Reivindicación 1); documento WO2003/023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003/194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1
 40

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLyS 3, BR3, N° de registro en Genbank AF116456); receptor BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., y col. *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (Ejemplo; Página 32-33); WO2003/014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); WO2003/035846 (Reivindicación 70; Página 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 (Reivindicación 3; Página 133); WO2002/24909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600
 45

(27) CD22 (receptor CD22 de células B, isoforma B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, N° de registro en Genbank AK026467); Wilson y col. (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146; documento WO2003/072036 (Reivindicación 1; Fig 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1
 50

(28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interacciona covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de Ig M, transducir una señal implicada en la diferenciación de las células B), pl: 4,84, PM: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, N° de registro en Genbank NP_001774.10); documento WO2003/088808, documento US2003/0228319; documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento US2002/150573 (Reivindicación 4, Páginas 13-14); documento WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig 16); documento WO92/07574 (Fig 1); documento US5644033; Ha y col. (1992) *J. Immunol.* 148(5):1526-1531; Müller y col. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1621-1625; Hashimoto y col. (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295; Preud'homme y col. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146; Yu y col. (1992) *J. Immunol.* 148(2) 633-637; Sakaguchi y col. (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464
 55
 60

(29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que está activado por la quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y la defensa humoral, desempeña un papel en la infección por VIH-2 y, quizá, el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pl: 8.54 PM: 41959
 65

- TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, nº de registro en Genbank NP_001707.1); documento WO2004/040000; documento WO2004/015426; documento US2003/105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO2002/61087 (Fig 1); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20, Página 269); documento WO2001/72830 (Páginas 12-13); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, Páginas 152-153, Ejemplo 2, Páginas 254-256); documento WO99/28468 (Reivindicación 1, Página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO94/28931 (Páginas 56-58); documento WO92/17497 (Reivindicación 7, Fig 5); Dobner y col. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella y col. (1995) *Biochem. J.* 309:773-779
- 5
- (30) HLA-DOB (subunidad Beta de la molécula de clase II del MHC (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, PM: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3, Nº de registro en Genbank NP_002111.1); Tonnelle y col. (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847; Jonsson y col. (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413; Beck y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 228:433-441; Strausberg y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903; Serenius y col. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766; Beck y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 255:1-13; Naruse y col. (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519; WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara y col. (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68; Larhammar y col. (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
- 10
- (31) P2X5 (canal iónico 5 dependiente de ligando P2X del receptor purinérgico, un canal iónico dependiente de ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad idiopática del detrusor); 422 aa, pl: 7,63, PM: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, Nº de registro en Genbank NP_002552.2); Le y col. (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (Reivindicación 10); Touchman y col. (2000) *Genome Res.* 10:165-173; documento WO2002/22660 (reivindicación 20); documento WO2003/093444 (reivindicación 1); documento WO2003/087768 (reivindicación 1); documento WO2003/029277 (página 82)
- 15
- (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, PM: 40225, TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, Nº de registro en Genbank NP_001773.1); documento WO2004/042346 (Reivindicación 65); documento WO2003/026493 (Páginas 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (Páginas 105-106); Von Hoegen y col. (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903.
- 20
- (33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de células B, la pérdida de función está asociada con un incremento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6,20, PM: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12, Nº de registro en Genbank NP_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (Reivindicación 11, Páginas 39-42); Miura y col. (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura y col. (1998) *Blood* 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (Reivindicación 8, Páginas 57-61); documento WO2000/12130 (Páginas 24-26)
- 25
- (34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios ITAM y similar a Ig de tipo C2, pueden tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pl: 5,28, PM: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22, Nº de registro Genbank NP_443170.1); WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis y col. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (Reivindicación 8); documento EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/089624 (Reivindicación 7)
- 30
- (35) IRTA2 (receptor 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado con la translocación, un inmunoreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de las células B y la linfomagénesis; en algunas neoplasias de células B se produce alteración de la regulación del gen mediante translocación); 977 aa, pl: 6,88, PM: 106468, TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21, Nº de registro en Genbank Humano:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; WO2003/024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama y col. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127; documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2)
- 35
- (36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia de EGF/heredulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Registro en NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Nº de registro en Genbank AF179274; AY358907, ADC85723, CQ782436; documento WO2004/074320; JP2004113151; documento WO2003/042661; documento WO2003/009814; documento EP1295944 (páginas 69-70); documento WO2002/30268 (página 329); documento WO2001/90304; documento US2004/249130; documento US2004/022727; documento WO2004/063355; documento US2004/197325; documento US2003/232350; documento US2004/005563; documento US2003/124579;
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Horie y col. (2000) *Genomics* 67:146-152; Uchida y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; Liang y col. (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12; Glynne-Jones y col. (2001) *Int J Cancer.* Oct 15; 94(2):178-84.

5 El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia del péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis y col. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen las proteínas de fusión con secuencias de ABP como se describe en: (i) Dennis y col. (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización, el anticuerpo se ha producido destinado al antígeno relacionado con tumor $\alpha_v\beta_6$.

15 El agente de unión a célula está conectado al enlazador. En una realización, el agente de unión a célula está conectado con A, cuando está presente, del enlazador.

En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y el enlazador es a través del enlace tioéter.

20 En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y el enlazador es a través del enlace disulfuro.

En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y el enlazador es a través del enlace amida.

25 En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y el enlazador es a través del enlace éster.

En una realización, la conexión entre el agente de unión a célula y el enlazador se forma entre un grupo tiol de un residuo de cisteína del agente de unión a célula y un grupo maleimida del enlazador.

30 Los residuos de cisteína del agente de unión a célula pueden estar disponibles para la reacción con el grupo funcional de R^L para formar una conexión. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando el agente de unión a célula es un anticuerpo, los grupos tiol del anticuerpo pueden participar en los puentes disulfuro intercatenarios. Estos enlaces intercatenarios pueden convertirse en grupos tiol libres mediante, por ejemplo, tratamiento del anticuerpo con DTT antes de la reacción con el grupo funcional de R^L .

35 El agente de unión a célula se puede marcar para, por ejemplo, ayudar a la detección o purificación del agente, antes de la incorporación como conjugado o como parte del conjugado. El marcador puede ser un marcador de biotina. En otra realización, el agente de unión a célula puede marcarse con un radioisótopo.

R y R'

40 En una realización, R se selecciona independientemente entre grupos alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido.

grupos heterociclilo C_{3-20} y grupos C_{5-20} . Estos grupos se definen cada uno en la sección de sustituyentes posterior.

45 En una realización, R es independientemente alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido.

En una realización, R es independientemente heterociclilo C_{3-20} opcionalmente sustituido.

50 En una realización, R es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido.

En una realización, R es independientemente alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido.

55 Se describen anteriormente en relación a R^2 diversas realizaciones relacionadas con grupos alquilo y arilo preferidos y la identidad y número de sustituyentes opcionales. Las preferencias establecidas para R^2 según se aplican a R pueden aplicarse, cuando sea adecuado, a todos los grupos R , por ejemplo, cuando R^6 , R^7 , R^8 o R^9 son R .

Las preferencias para R también se aplican a R' .

60 En algunas realizaciones de la invención, se proporciona un compuesto que tiene un grupo sustituyente -NRR'. En una realización, R y R' , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4, 5, 6 ó 7 miembros. El anillo puede contener un heteroátomo adicional, por ejemplo N, O o S.

65 En una realización, el anillo heterocíclico está sustituido en sí mismo con un grupo R . Cuando un heteroátomo N adicional está presente, el sustituyente puede estar en el heteroátomo N.

R''

5 R'' es un grupo alquileo C₃₋₁₂, pudiendo estar dicha cadena interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, estando dichos anillos opcionalmente sustituidos.

En una realización, R'' es un grupo alquileo C₃₋₁₂, pudiendo estar dicha cadena interrumpida por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina.

10 En una realización, el grupo alquileo está opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S, y NMe y/o anillos aromáticos, estando dichos anillos opcionalmente sustituidos.

15 En una realización, el anillo aromático es un grupo arileno C₅₋₂₀, en el que el arileno se refiere a un grupo divalente obtenido por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos en el anillo aromático de un compuesto aromático, teniendo dicho grupo de 5 a 20 átomos en el anillo.

20 En una realización, R'' es un grupo alquileo C₃₋₁₂, pudiendo estar dicha cadena interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos con NH₂.

En una realización, R'' es un grupo alquileo C₃₋₁₂.

En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C₃, C₅, C₇, C₉ y C₁₁.

25 En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C₃, C₅ y C₇.

En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C₃ y C₅.

30 En una realización, R'' es un grupo alquileo C₃.

En una realización, R'' es un grupo alquileo C₅.

35 Los grupos alquileo indicados anteriormente pueden estar opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, estando dichos anillos opcionalmente sustituidos.

Los grupos alquileo indicados anteriormente pueden estar opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina.

40 Los grupos alquileo indicados anteriormente pueden ser grupos alquileo alifáticos lineales sin sustituir.

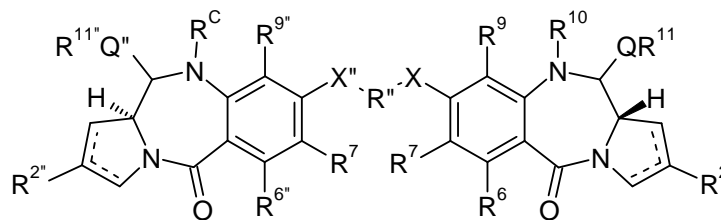
X

45 En una realización, X se selecciona entre O, S o N(H).

Preferentemente, X es O.

Conjugados

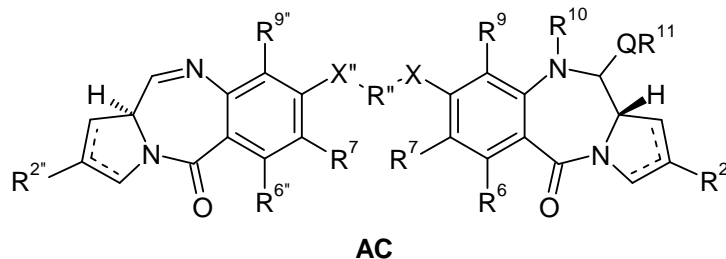
50 En una realización, el conjugado es un dímero con el compuesto que tiene la estructura que se muestra a continuación:



AB

55 en la que R², R⁶, R⁷, R⁹, X'', Q'' y R¹¹ son como se han definido de acuerdo con R², R⁶, R⁷, R⁹, X y R¹¹ respectivamente, y R^C es un grupo de terminación. En esta realización, cada grupo R¹⁰ es un enlazador conectado a un agente de unión a célula, seleccionado entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico.

En una realización, el conjugado es un dímero con el compuesto, que tiene la estructura que se muestra a continuación:



AC

en la que $R^{2'}$, $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, X'' y $R^{11'}$ son como se han definido de acuerdo con R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , X , y R^{11} respectivamente.

Compuestos monoméricos

R^C , Grupo de Terminación

El conjugado del primer aspecto de la invención puede tener un grupo de terminación R^C en la posición N10.

El grupo R^C puede eliminarse de la posición N10 del grupo PBD para dejar un enlace imina N10-C11, una carbinolamina, una carbinolamina sustituida, en la que QR^{11} es OSO_3M , un aducto de bisulfito, una tiocarbinolamina, una tiocarbinolamina sustituida o una carbinolamina sustituida.

En una realización, R^C puede ser un grupo protector que puede eliminarse para dejar un enlace imina N10-C11, una carbinolamina, una carbinolamina sustituida, o, cuando QR^{11} es OSO_3M , un aducto de bisulfito. En una realización, R^C es un grupo protector que puede eliminarse para dejar un enlace imina N10-C11.

Se pretende que el grupo R^C puede eliminarse en las mismas condiciones que las que se necesitan para eliminar el grupo R^{10} , por ejemplo para producir un enlace imina N10-C11, una carbinolamina y así sucesivamente. El grupo de terminación actúa como un grupo protector para la funcionalidad pretendida en la posición N10. Se pretende que el grupo de terminación no sea reactivo hacia un agente de unión a célula. R^C no es lo mismo que R^L .

Los compuestos que tienen un grupo de terminación se pueden utilizar como intermedios en la síntesis de dímeros que tengan un monómero de imina. Como alternativa, pueden usarse compuestos que tienen un grupo de terminación como conjugados, en los que el grupo de terminación se elimina en la localización diana para producir una imina, una carbinolamina, una carbinolamina sustituida y así sucesivamente. Por lo tanto, en esta realización, el grupo de terminación puede denominarse como un grupo protector de nitrógeno eliminable terapéuticamente, como se define en la solicitud anterior de los inventores WO 00/12507.

En una realización, el grupo R^C puede eliminarse en las condiciones que escinden el enlazador R^L del grupo R^{10} . Por lo tanto, en una realización, el grupo de terminación puede escindirse mediante la acción de una enzima.

En una realización alternativa, el grupo de terminación puede eliminarse antes de la conexión al enlazador R^L al agente de unión a célula. En esta realización, el grupo de terminación puede eliminarse en condiciones que no escinden el enlazador R^L .

Cuando un compuesto incluye un grupo funcional G^1 para formar una conexión al agente de unión a célula, el grupo de terminación puede eliminarse antes de la adición o desenmascarado de G^1 .

El grupo de terminación puede usarse como parte de una estrategia de grupo protector para asegurar que sólo una de las unidades monoméricas en un dímero esté conectada a un agente de unión a célula.

El grupo de terminación puede usarse como una máscara para un enlace imina N10-C11. El grupo de terminación puede eliminarse en un momento tal que la funcionalidad imina se necesite en el compuesto. El grupo de terminación también es una máscara para una carbinolamina, una carbinolamina sustituida y un aducto de bisulfito, como se ha descrito anteriormente.

R^C puede ser un grupo protector de N10, tal como los grupos descritos en la solicitud anterior de los inventores, WO 00/12507. En una realización, R^C es un grupo protector de nitrógeno eliminable terapéuticamente, como se define en la solicitud anterior de los inventores, WO 00/12507.

En una realización, R^C es un grupo protector de carbamato.

En una realización, el grupo protector de carbamato se selecciona entre:

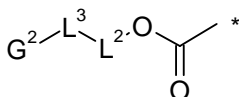
Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz y PNZ.

Opcionalmente, el grupo protector de carbamato se selecciona adicionalmente entre Moc.

- 5 En una realización, R^C es un grupo de enlazador L^1 que carece del grupo funcional para la conexión al agente de unión a célula.

La presente solicitud se refiere particularmente a aquellos grupos R^C que son carbamatos.

- 10 En una realización, R^C es un grupo:



- 15 en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, G^2 es un grupo de terminación, L^3 es un enlace covalente o es un enlazador escindible L^1 , L^2 es un enlace covalente o junto con $OC(=O)$ forma un enlazador de auto-destrucción.

Cuando L^3 y L^2 son ambos enlaces covalente, G^2 y $OC(=O)$ forman juntos un grupo protector de carbamato como se ha definido anteriormente.

- 20 L^1 es como se ha definido anteriormente en relación a R^{10} .

L^2 es como se ha definido anteriormente en relación a R^{10} .

- 25 Diversos grupos de terminación se describen a continuación, incluyendo los basados en grupos protectores bien conocidos.

En una realización L^3 es un enlazador escindible L^1 , y L^2 , junto con $OC(=O)$, forma un enlazador de auto-destrucción. En esta realización, G^2 es Ac (acetilo) o Moc, o un grupo protector de carbamato seleccionado entre:

- 30 Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz y PNZ.

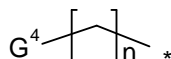
Opcionalmente, el grupo protector de carbamato se selecciona adicionalmente entre Moc.

- 35 En otra realización, G^2 es un grupo acilo $-C(=O)G^3$, en el que G^3 se selecciona entre alquilo (incluyendo cicloalquilo, alqueno y alquino), heteroalquilo, heterociclilo y arilo (incluyendo heteroarilo y carboarilo). Estos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos. El grupo acilo junto con un grupo amino de L^3 o L^2 , cuando sea adecuado, pueden formar un enlace de amida. El grupo acilo junto con un grupo hidroxilo de L^3 o L^2 , cuando sea adecuado, puede formar un enlace de éster.

- 40 En una realización, G^3 es heteroalquilo. El grupo heteroalquilo puede comprender polietilenglicol. El grupo heteroalquilo puede tener un heteroátomo, tal como O o N, adyacente al grupo acilo, formando de esta manera un grupo carbamato o carbonato, cuando sea adecuado, con un heteroátomo presente en el grupo L^3 o L^2 , cuando sea adecuado.

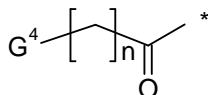
- 45 En una realización, G^3 se selecciona entre NH_2 , NHR y NRR' . Preferentemente, G^3 es NRR' .

En una realización G^2 es el grupo:



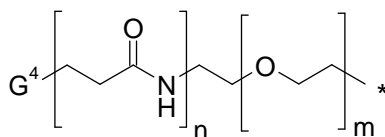
- 50 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^3 , n es de 0 a 6 y G^4 se selecciona entre OH, OR, SH, SR, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONRR'$, NH_2 , NHR , NRR' , NO_2 y halo. Los grupos OH, SH, NH_2 y NHR están protegidos. En una realización, n es de 1 a 6 y preferentemente n es 5. En una realización, G^4 es OR, SR, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONRR'$ y NRR' . En una realización, G^4 es OR, SR, y NRR' . Preferentemente G^4 se selecciona entre OR y NRR' , lo más preferido G^4 es OR. Más preferentemente G^4 es OMe.

- 55 En una realización, el grupo G^2 es:



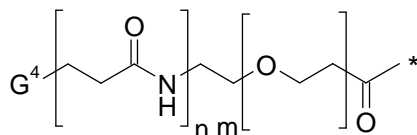
en el que el asterisco indica el punto de unión a L³, y n y G⁴ son como se han definido anteriormente.

En una realización, el grupo G² es:

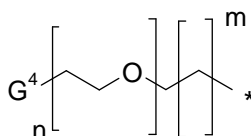


- 5 en el que el asterisco indica el punto de unión a L³, n es 0 ó 1, m es de 0 a 50, y G⁴ se selecciona entre OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', NH₂, NHR, NRR', NO₂ y halo. En una realización preferida, n es 1 y m es de 0 a 10, de 1 a 2, preferentemente de 4 a 8, y lo más preferido 4 u 8. En otra realización, n es 1 y m es de 10 a 50, preferentemente de 20 a 40. Los grupos OH, SH, NH₂ y NHR están protegidos. En una realización, G⁴ es OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR' y NRR'. En una realización, G⁴ es OR, SR, y NRR'. Preferentemente G⁴ se selecciona entre OR y NRR', lo más preferido G⁴ es OR. Preferentemente G⁴ es OMe.

En una realización, el grupo G² es:

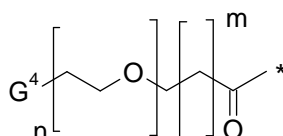


- 15 en el que el asterisco indica el punto de unión a L³ y n, m y G⁴ son como se han definido anteriormente.
- En una realización, el grupo G² es:



- 20 en el que n es 1-20, m es 0-6 y G⁴ se selecciona entre OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', NH₂, NHR, NRR', NO₂ y halo. En una realización, n es 1-10. En otra realización, n es de 10 a 50, preferentemente de 20 a 40. En una realización, n es 1. En una realización, m es 1. Los grupos OH, SH, NH₂ y NHR están protegidos. En una realización, G⁴ es OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR' y NRR'. En una realización, G⁴ es OR, SR, y NRR'. Preferentemente G⁴ se selecciona entre OR y NRR', lo más preferido G⁴ es OR. Preferentemente G⁴ es OMe.

En una realización, el grupo G² es:



en el que el asterisco indica el punto de unión a L³ y n, m y G⁴ son como se han definido anteriormente.

- 30 En cada una de las realizaciones anteriores G⁴ puede ser OH, SH, NH₂ y NHR. Preferentemente, estos grupos están protegidos.

En una realización, OH está protegido con Bzl, TBDMS o TBDPS.

- 35 En una realización, SH está protegido con AcM, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me o Trt.

En una realización, NH₂ o NHR están protegidos con Boc, Moc, Z-Cl, Fmoc, Z o Alloc.

En una realización, el grupo G² está presente junto con un grupo L³, siendo dicho grupo un dipéptido.

- 40 No se pretende que el grupo de terminación se conecte al agente de unión a célula. Por lo tanto, el otro monómero presente en el dímero sirve como el punto de conexión al agente de unión a célula mediante un enlazador. Por consiguiente, se prefiere que la funcionalidad presente en el grupo de terminación no esté disponible para la reacción con un agente de unión a célula. Por lo tanto, prefieren evitarse grupos funcionales reactivos, tales como OH, SH, NH₂, COOH. Sin embargo, dicha funcionalidad puede estar presente en el grupo de terminación si se protege, como se ha descrito anteriormente.

45

En la preparación de los compuestos de la invención, el grupo de terminación puede usarse para preparar un enlazador R^L.

5 Una realización de ejemplo de un compuesto conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) comprende un anticuerpo (Ab), y un grupo farmacológico PBD (PBD) en el que el anticuerpo está unido mediante un grupo enlazador (L) a PBD; teniendo la composición la fórmula:



10 en la que p es un número entero de 1 a aproximadamente 8, y representa la carga de fármaco. Si Ab es un anticuerpo manipulado con cisteína, el número de grupos farmacológicos que pueden conjugarse mediante un grupo enlazador reactivo de tiol a una molécula de anticuerpo está limitado por el número de residuos de cisteína que se introducen mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Por tanto, los ADC de ejemplo comprenden anticuerpos que tienen 1, 2, 3 ó 4 aminoácidos de cisteína manipulados.

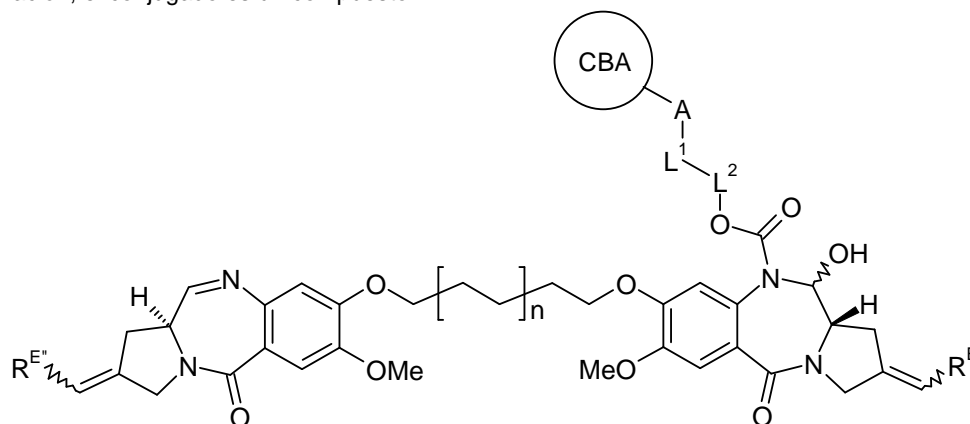
Compuestos Preferidos

15 En una realización, el conjugado es un dímero en el que cada uno de los monómeros tiene un grupo metileno C2, es decir, cada R² es =CH₂. Se prefiere que el agente de unión a célula sea un anticuerpo.

20 En otra realización, el conjugado es un dímero en el que cada uno de los monómeros tiene un grupo arilo C2, es decir, cada R² es arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido. Se prefiere que el agente de unión a célula sea un anticuerpo.

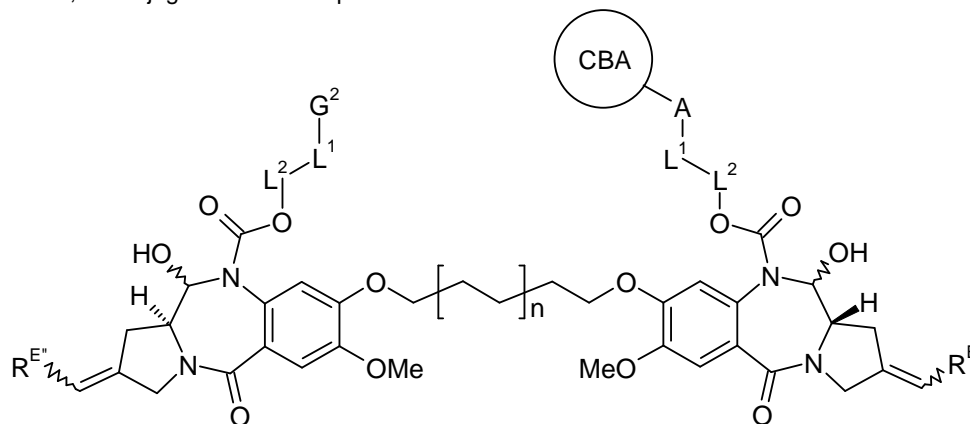
Alquileo C2

En una realización, el conjugado es un compuesto:



25 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, y n es 0 ó 1. L¹ y L² son como se han definido anteriormente, y cada uno de R^E y R^{E'} se selecciona independientemente entre H o R^D.

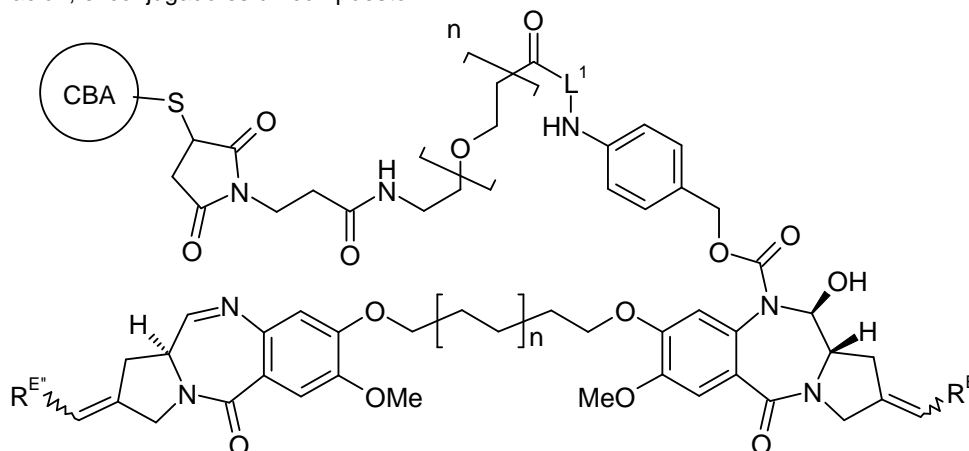
En una realización, el conjugado es un compuesto:



30 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, y n es 0 ó 1. L¹, L² y G² son como se han definido anteriormente, y cada uno de R^E y R^{E'} se selecciona independientemente entre H o R^D.

En una realización, el conjugado es un compuesto:

En una realización, el conjugado es un compuesto:



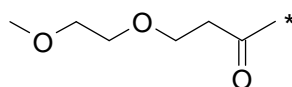
5 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, y n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, y cada uno de R^E y $R^{E''}$ se selecciona independientemente entre H o R^D .

Para cada uno de los compuestos anteriores, las siguientes preferencias pueden aplicarse, cuando sea adecuado:

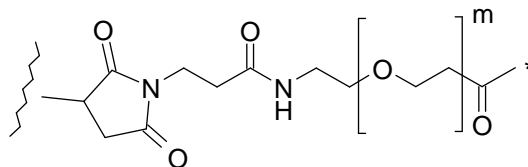
- 10 n es 0;
 n es 1;
 R^E es H;
 R^E es R^D , en el que R^D es alquilo opcionalmente sustituido;
 R^E es R^D , en el que R^D es metilo;
15 CBA es un anticuerpo;
CBA es un péptido cíclico;
 L^1 es o comprende un dipéptido;
 L^1 es (H₂N)-Val-Ala-(CO) o (H₂N)-Phe-Lys-(CO), en el que (H₂N) y (CO) indican los terminales N y C
respectivos;
20 L^2 es *p*-aminobencileno;
 G^2 se selecciona entre Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz y PNZ.

Las siguientes preferencias también pueden aplicarse, además de las preferencias anteriores:

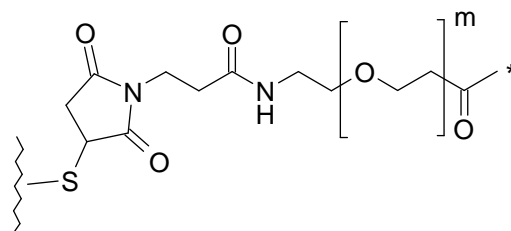
G^2 es:



25 en el que el asterisco indica el punto de unión al extremo N-terminal de L^1 ;
A es:

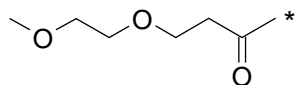


30 en el que el asterisco indica el punto de unión al extremo N-terminal de L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula y m es 4 u 8;
A es

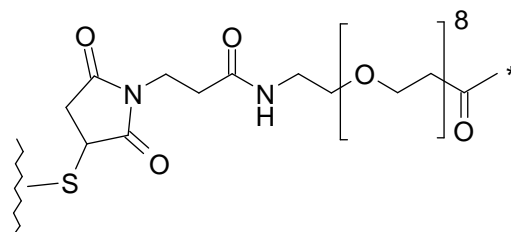


en el que el asterisco indica el punto de unión al extremo N-terminal de L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, y m es 4 u 8.

En una realización particularmente preferida, n es 1; R^E es H; CBA es un anticuerpo; L^1 es (H₂N)-Val-Ala-(CO) o (H₂N)-Phe-Lys-(CO), en los que (H₂N) y (CO) indican los extremos terminales N y C respectivos; L^2 es *p*-aminobencileno; G^2 es:



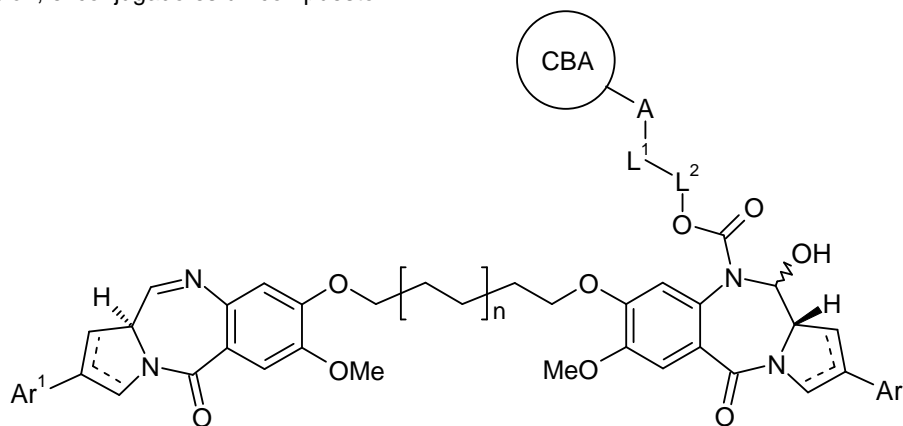
5 en el que el asterisco indica el punto de unión al extremo N-terminal de L^1 ; y A es



en el que el asterisco indica el punto de unión al extremo N-terminal de L^1 , y la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula.

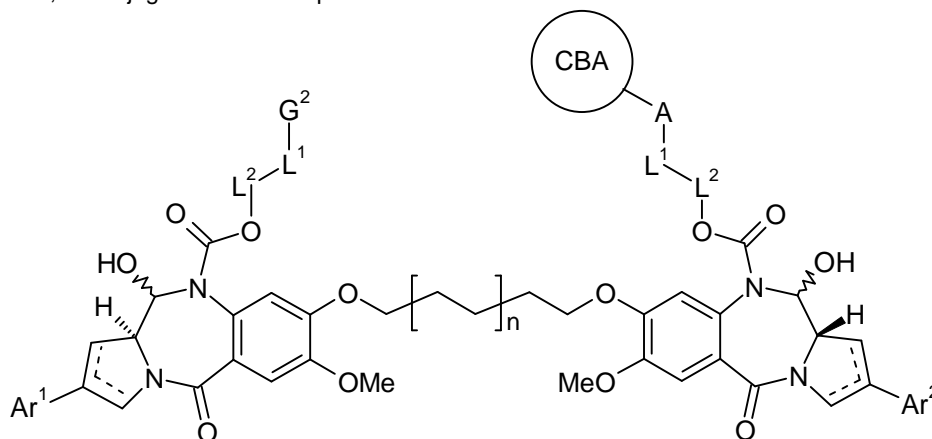
10 Arilo C2

En una realización, el conjugado es un compuesto:



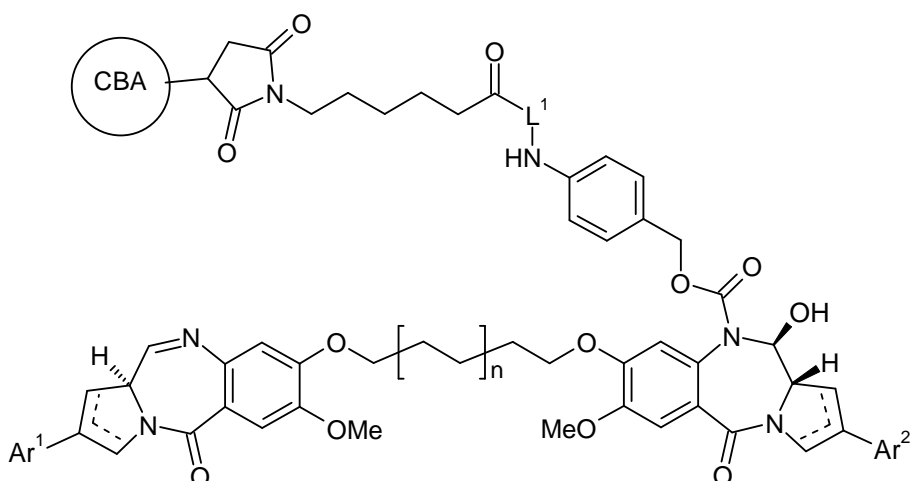
15 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 y L^2 son como se han definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido, y n es 0 ó 1. Ar^1 y Ar^2 pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



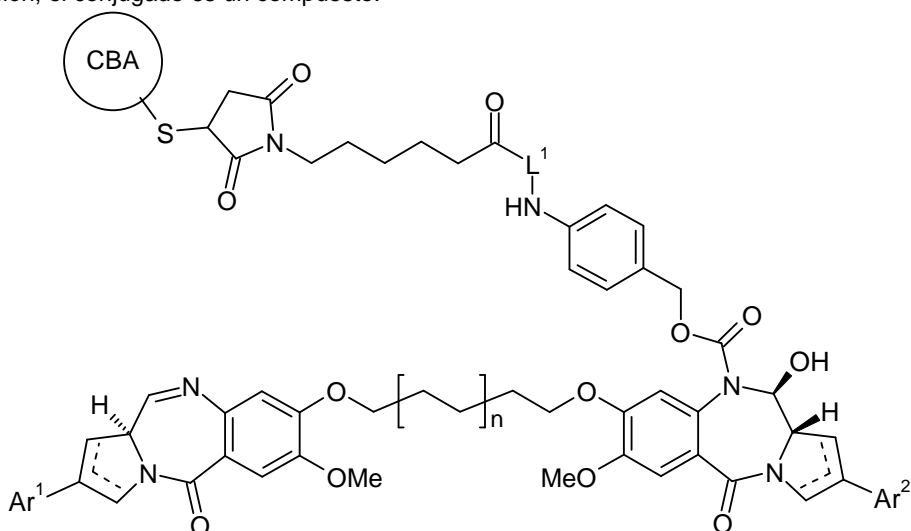
20 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 , L^2 y G^2 son como se han definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



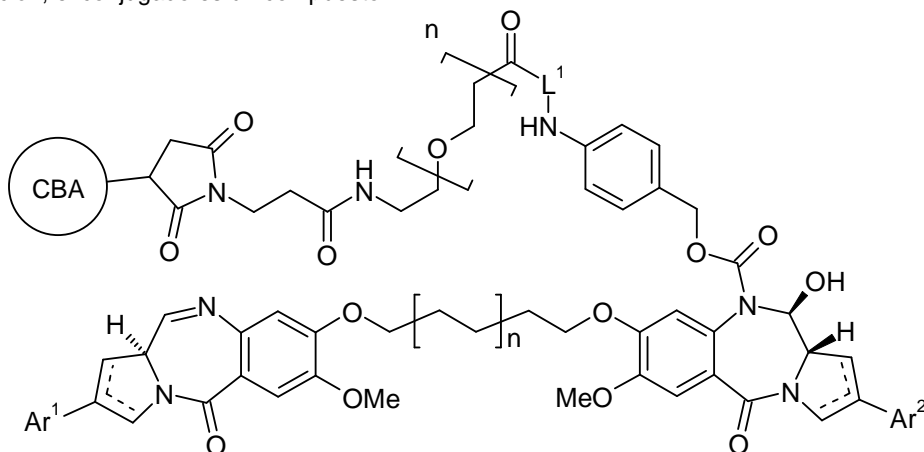
en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

- 5 En una realización, el conjugado es un compuesto:



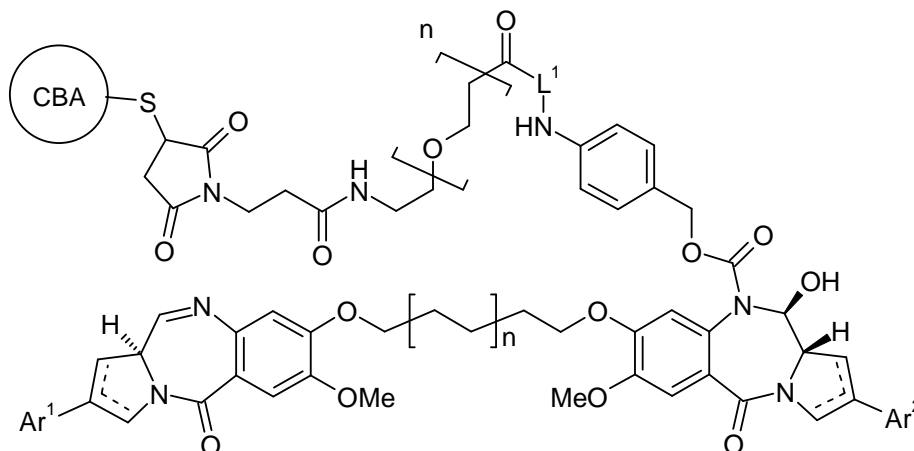
en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

- 10 En una realización, el conjugado es un compuesto:



en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, y n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



5 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico y n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

10 En una realización, Ar^1 y Ar^2 en cada una de las realizaciones anteriores, se selecciona cada uno independientemente entre fenilo, furanilo, tiofenilo y piridilo opcionalmente sustituidos.

En una realización, Ar^1 y Ar^2 en cada una de las realizaciones anteriores es fenilo opcionalmente sustituido.

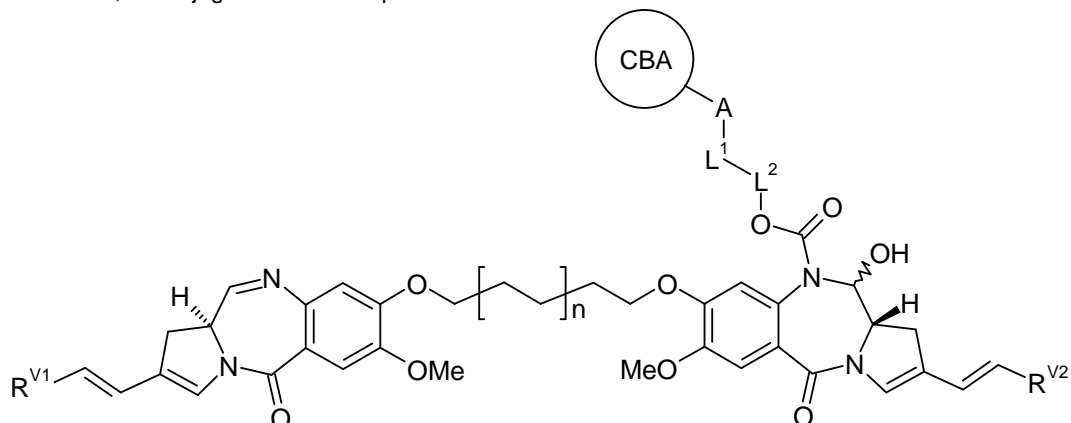
15 En una realización, Ar^1 y Ar^2 en cada una de las realizaciones anteriores es tiofen-2-ilo o tiofen-3-ilo opcionalmente sustituidos.

En una realización, Ar^1 y Ar^2 en cada una de las realizaciones anteriores es quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituidos.

20 El grupo quinolinilo o isoquinolinilo puede estar enlazado al núcleo de PBD a través de cualquier posición del anillo disponible. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-5-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo y quinolin-8-ilo. De estos, pueden preferirse quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo. El isoquinolinilo puede ser isoquinolin-1-ilo, isoquinolin-3-ilo, isoquinolin-4-ilo, isoquinolin-5-ilo, isoquinolin-6-ilo, isoquinolin-7-ilo e isoquinolin-8-ilo. De estos, pueden preferirse isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo.

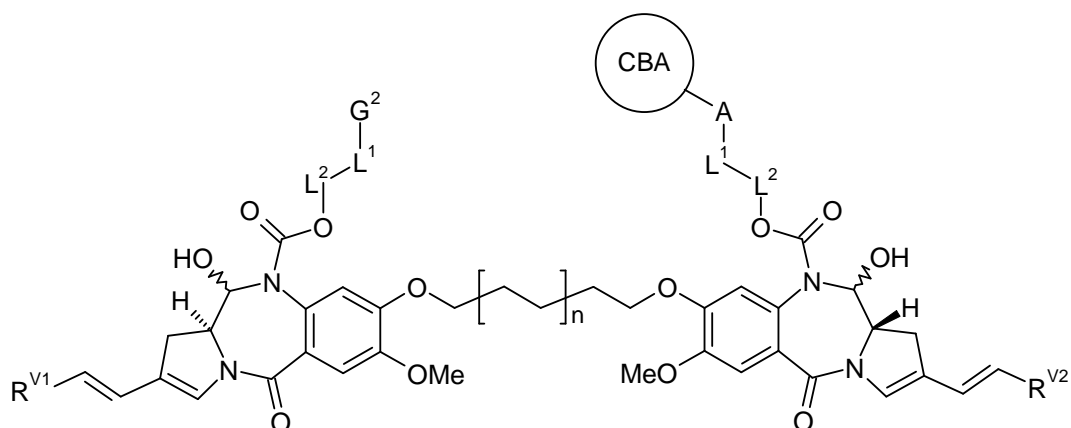
25 Vinilo C2

En una realización, el conjugado es un compuesto:



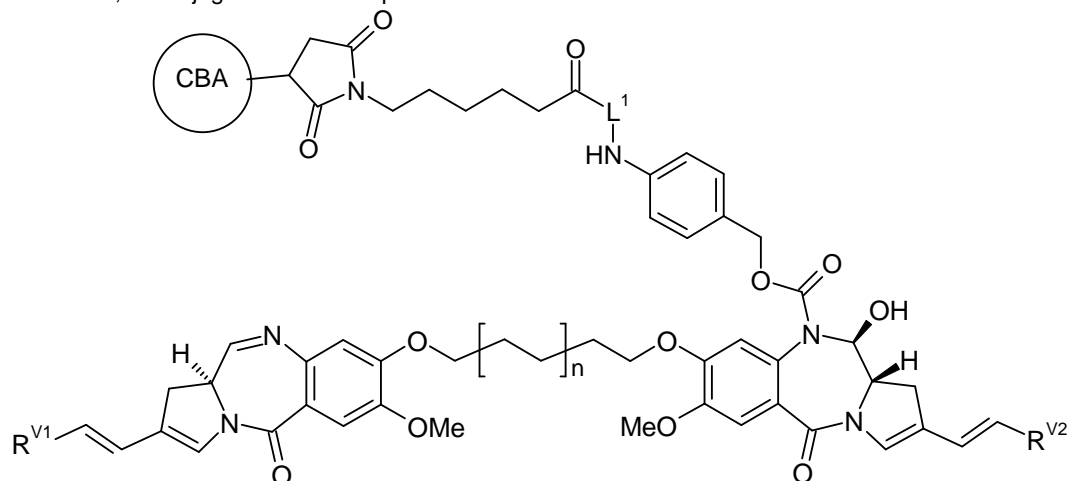
30 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 y L^2 son como se han definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



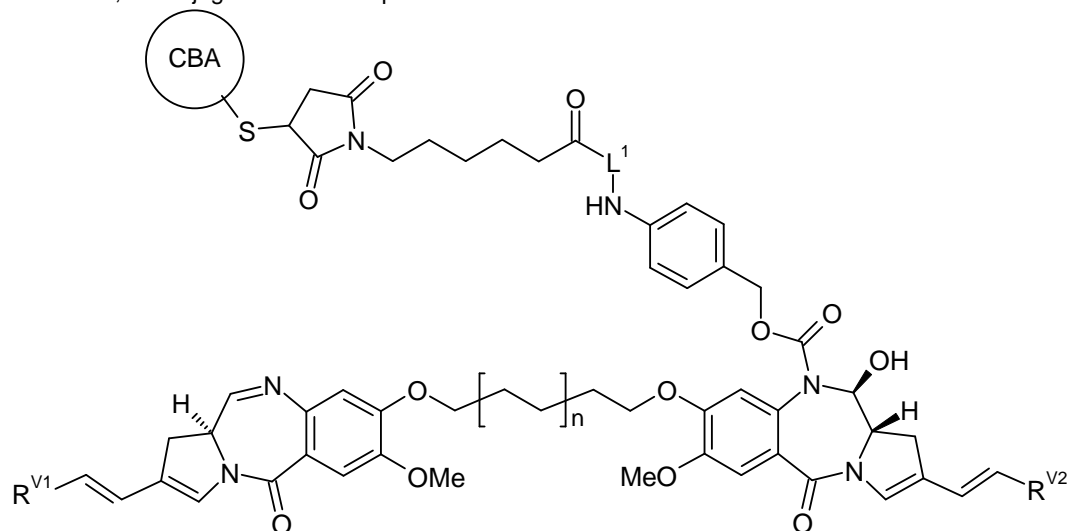
5 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 , L^2 y G^2 son como se han definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



10 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 es como se ha definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

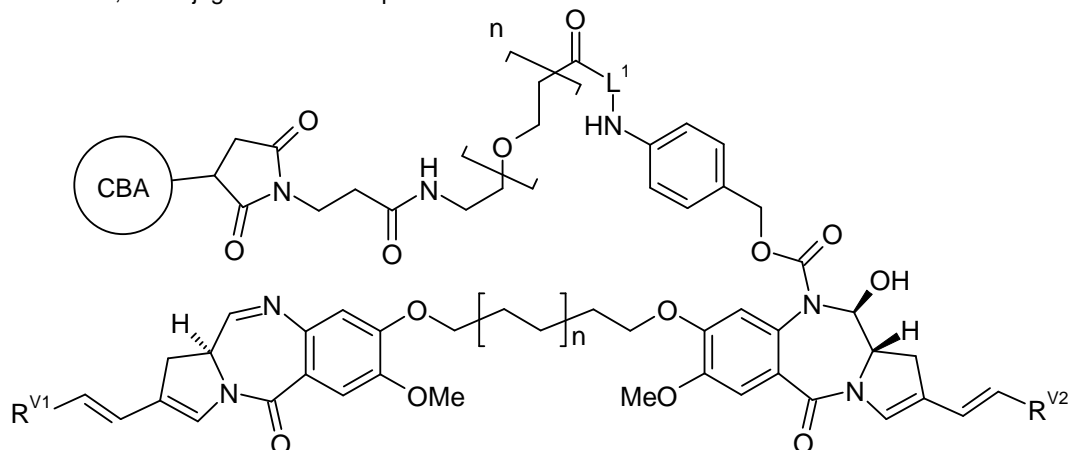
En una realización, el conjugado es un compuesto:



15 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, L^1 es como se ha definido

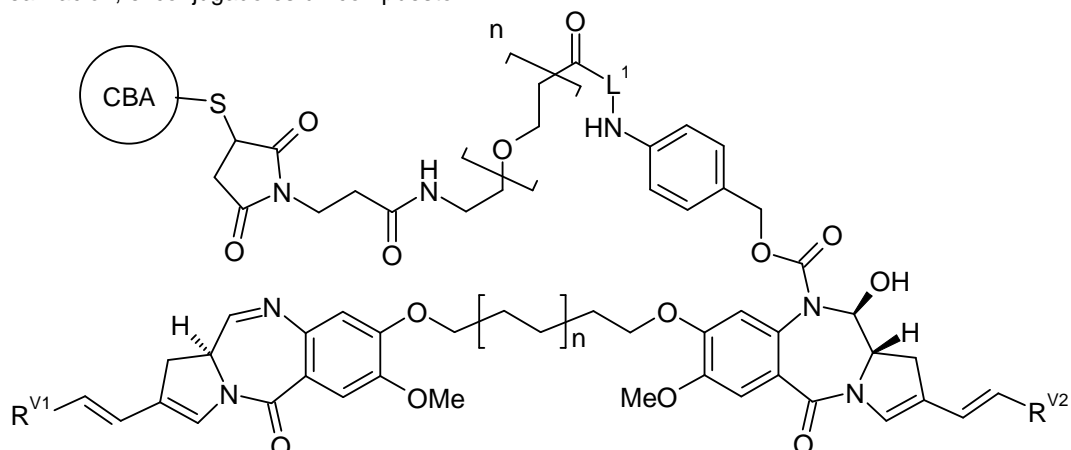
anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

5 En una realización, el conjugado es un compuesto:



10 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico, y n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el conjugado es un compuesto:



15 en el que CBA es un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo o un péptido cíclico y n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1, R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

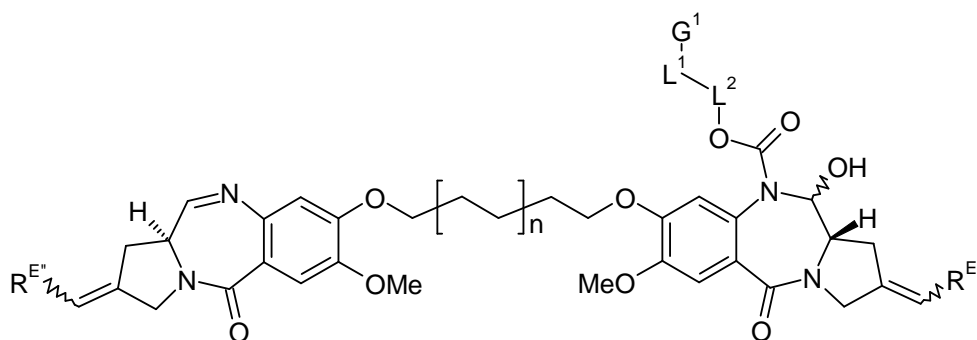
20 En algunas de las realizaciones anteriores, R^{V1} y R^{V2} pueden seleccionarse independientemente entre H, fenilo y 4-fluorofenilo.

Intermedios Preferidos

25 La presente invención también proporciona intermedios para su uso en la preparación de los compuestos conjugados que se describen en el presente documento.

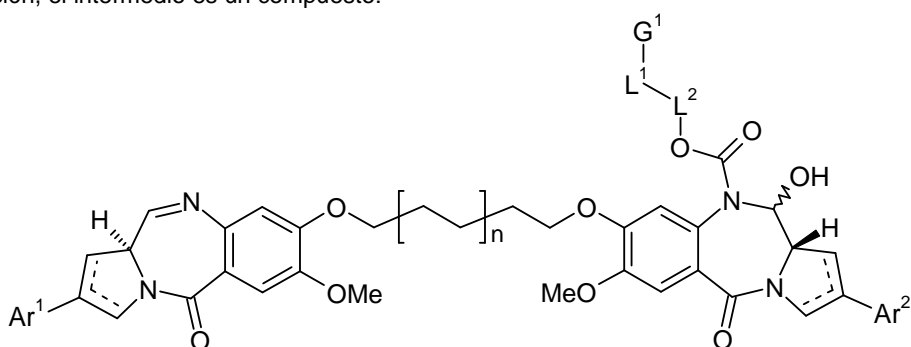
Se describen a continuación intermedios preferidos y se corresponden estrechamente con los conjugados preferidos descritos anteriormente.

30 En una realización, el intermedio es un compuesto:



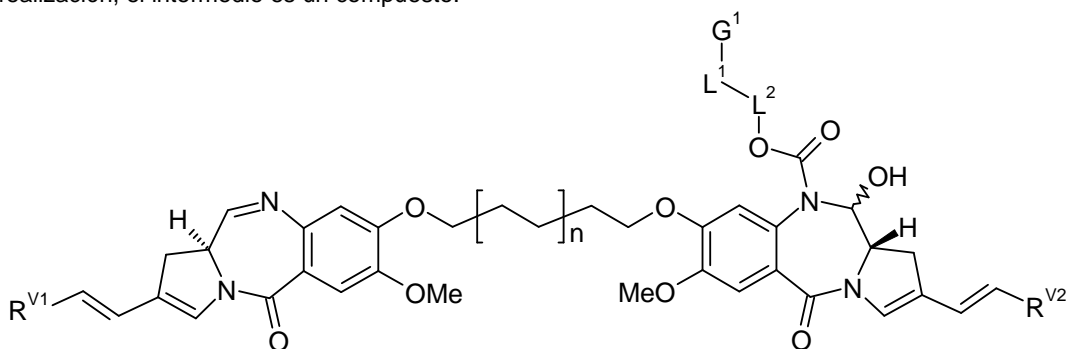
en el que n es 0 ó 1, G^1 , L^1 y L^2 son como se han definido anteriormente, y cada uno de R^E y $R^{E'}$ se selecciona independientemente entre H o R^D .

5 En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que G^1 , L^1 y L^2 son como se han definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido, y n es 0 ó 1. Ar^1 y Ar^2 pueden ser iguales o diferentes.

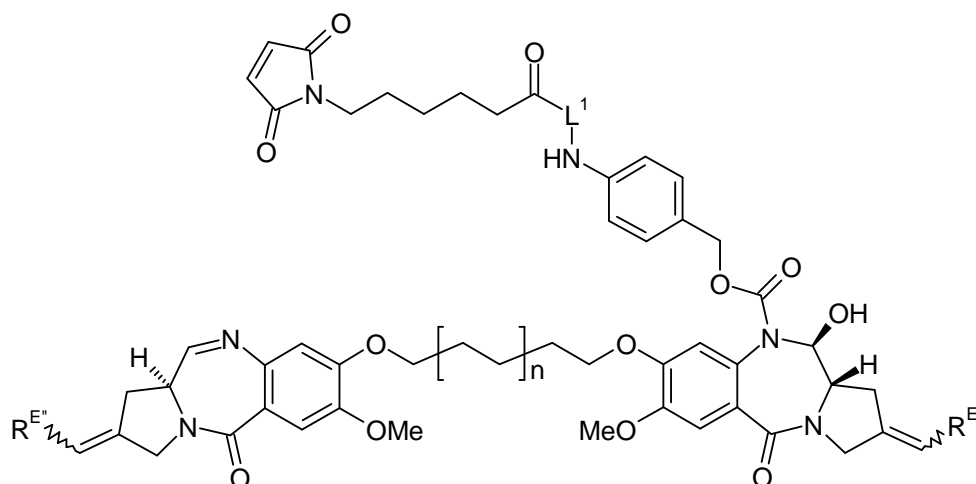
10 En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que G^1 , L^1 y L^2 son como se han definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} , y n es 0 ó 1. R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

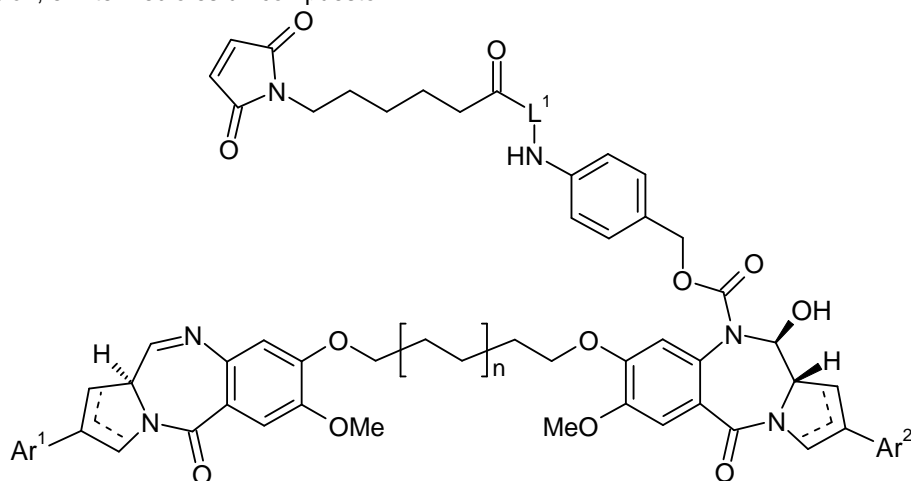
15

En una realización, el intermedio es un compuesto:



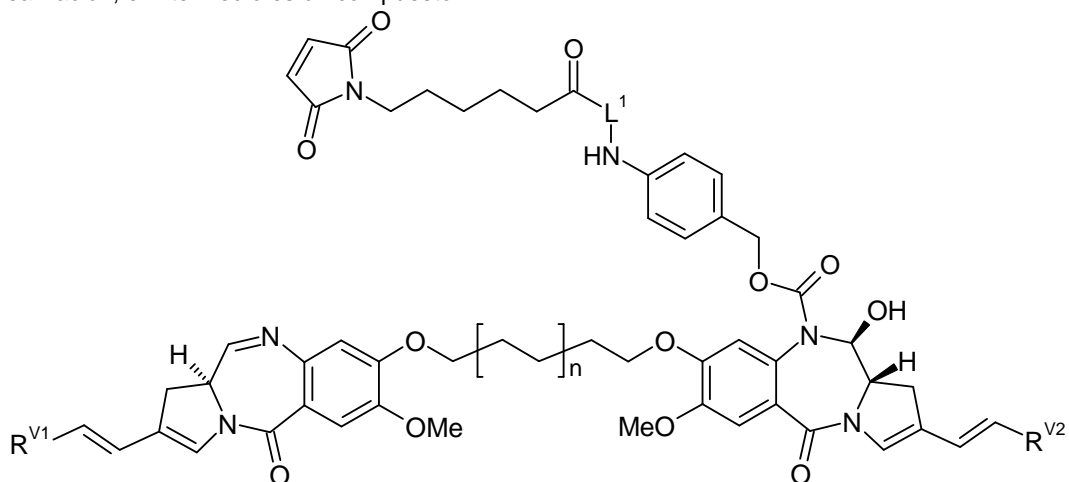
en el que n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente y cada uno de R^E y $R^{E'}$ se selecciona independientemente entre H o R^D .

- 5 En una realización, el intermedio es un compuesto:



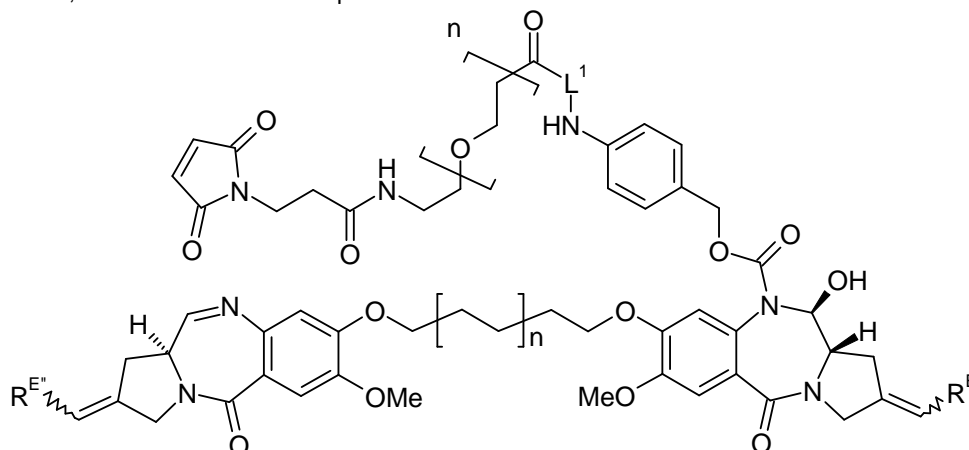
en el que L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido, y n es 0 ó 1.

- 10 En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que L^1 es como se ha definido anteriormente, y R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} y n es 0 ó 1. R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

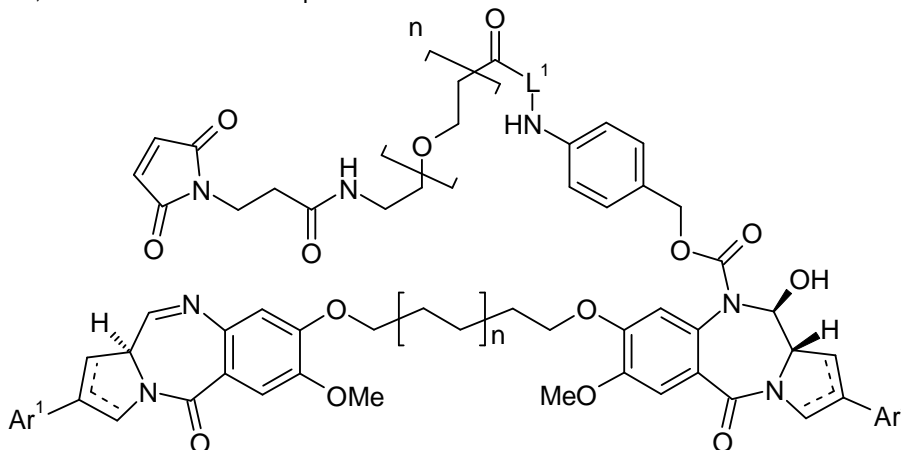
En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, y cada uno de R^E y $R^{E'}$ se selecciona independientemente entre H o R^D .

5

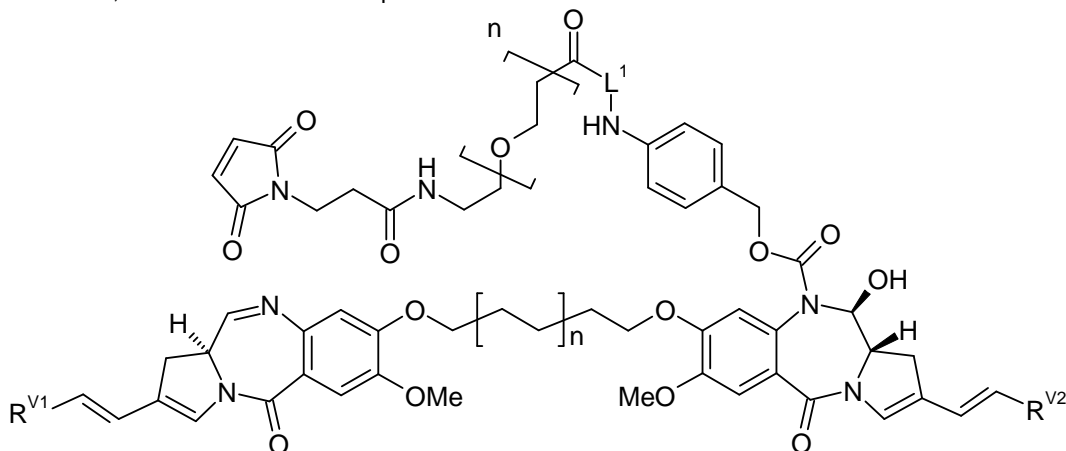
En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que n es 0 ó 1. L^1 es como se ha definido anteriormente, cada uno de Ar^1 y Ar^2 es independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido y n es 0 ó 1.

10

En una realización, el intermedio es un compuesto:



en el que L^1 es como se ha definido anteriormente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (pudiendo estar el fenilo opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C_{5-6} y n es 0 ó 1. R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

15

Sustituyentes

La expresión "opcionalmente sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que puede estar sin sustituir o que puede estar sustituido.

5 A menos que se especifique otra cosa, el término "sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que porta uno o más sustituyentes. El término "sustituyente" se usa en el presente documento en el sentido convencional y se refiere a un grupo químico que está unido covalentemente a, o si fuera adecuado, condensado a, un grupo precursor. Se conocen bien una amplia variedad de sustituyentes y también se conocen bien procedimientos para su formación e introducción en una diversidad de grupos precursores.

10 En una realización preferida, los sustituyentes descritos en el presente documento (que incluyen sustituyentes opcionalmente) se limitan a aquellos grupos que no son reactivos con un agente de unión a célula. El enlazador al agente de unión a célula en el presente caso se forma a partir de la posición N10 del compuesto PBD a través de un grupo de enlazador (que comprende, por ejemplo, L¹, L² y A) al agente de unión a célula. Los grupos funcionales reactivos localizados en otras partes de la estructura de PBD pueden ser capaces de formar enlaces adicionales al agente de unión a célula (esto puede denominarse como reticulación). Estos enlaces adicionales pueden alterar el transporte y la actividad biológica del conjugado. Por lo tanto, en alguna realización, los sustituyentes adicionales se limitan a los que carecen de funcionalidad reactiva.

20 En una realización, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en R, OR, SR, NRR', NO₂, halo, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR y CONRR'.

En una realización, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en R, OR, SR, NRR', NO₂, CO₂R, COR, CONH₂, CONHR y CONRR'.

25 En una realización, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en R, OR, SR, NRR', NO₂ y halo.

En una realización, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en R, OR, SR, NRR' y NO₂.

30 Una cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente puede aplicarse a uno cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento. Como alternativa, los sustituyentes pueden seleccionarse entre uno cualquiera o más de los grupos enumerados a continuación.

A continuación se describen con mayor detalle ejemplos de sustituyentes.

35 Alquilo C₁₋₁₂: La expresión "C₁₋₁₂ alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, y que puede ser saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, totalmente insaturado). Por lo tanto, el término "alquilo" incluye las subclases alquenilo, alquínilo, cicloalquilo, etc., expuestas a continuación.

40 Los ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C₁), etilo (C₂), propilo (C₃), butilo (C₄), pentilo (C₅), hexilo (C₆) y heptilo (C₇).

45 Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C₁), etilo (C₂), n-propilo (C₃), n-butilo (C₄), n-pentilo (amil) (C₅), n-hexilo (C₆) y n-heptilo (C₇).

Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C₃), iso-butilo (C₄), sec-butilo (C₄), terc-butilo (C₄), iso-pentilo (C₅) y neo-pentilo (C₅).

50 Un grupo alquilo puede estar opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N(H) y S. Dichos grupos puede denominarse como "heteroalquilo".

55 Heteroalquilo C₂₋₂₀: La expresión "heteroalquilo C₂₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 2 a 12 átomos de carbono, uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N(H) y S, preferentemente O y S.

60 Los ejemplos de grupos heteroalquilo incluyen, pero sin limitación, los que comprenden una o más unidades de etilenglicol del tipo -(OCH₂CH₂)-. El terminal de un grupo heteroalquilo puede ser la forma primaria de un heteroátomo, por ejemplo -OH, -SH o -NH₂. En una realización preferida, el terminal es -CH₃.

Alquenilo C₂₋₁₂: La expresión "alquenilo C₂₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

65 Los ejemplos de grupos alquenilo insaturados incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 1-propenilo (-CH=CH-CH₃), 2-propenilo (alilo, -CH=CH-CH₂), isopropenilo (1-metilvinilo, -C(CH₃)=CH₂), butenilo (C₄), pentenilo

(C₅) y hexenilo (C₆).

Alquinilo C₂₋₁₂: La expresión "alquinilo C₂₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono.

5 Los ejemplos de grupos alquinilo insaturados incluyen, pero sin limitación, etinilo (-C≡CH) y 2-propinilo (propargilo, -CH₂-C≡CH).

10 Cicloalquilo C₃₋₁₂: La expresión "cicloalquilo C₃₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que también es un grupo ciclilo; es decir, un grupo monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo alicíclico de un compuesto hidrocarburo cíclico (carbocíclico), teniendo dicho grupo de 3 a 7 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 7 átomos en el anillo.

15 Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de:

compuestos de hidrocarburo monocíclico saturado: ciclopropano (C₃), ciclobutano (C₄), ciclopentano (C₅), ciclohexano (C₆), cicloheptano (C₇), metilciclopropano (C₄), dimetilciclopropano (C₅), metilciclobutano (C₅), dimetilciclobutano (C₆), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) y metilciclohexano (C₇);

20 compuestos de hidrocarburo monocíclico insaturado: ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), ciclohexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) y metilciclohexeno (C₇); y

compuestos de hidrocarburo policíclico saturado:

norcarano (C₇), norpinano (C₇), norbornano (C₇).

25 Heterociclilo C₃₋₂₀: La expresión "Heterociclilo C₃₋₂₀", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente obtenido mediante la eliminación un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un compuesto heterocíclico, teniendo dicho grupo de 3 a 20 átomos en el anillo, de los que de 1 a 10 son heteroátomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los que de 1 a 4 son heteroátomos en el anillo.

30 En este contexto, los sufijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) indican el número de átomos en el anillo, o intervalo de número de átomos en el anillo, tanto átomos de carbono como heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "heterociclilo C₅₋₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 5 ó 6 átomos en el anillo.

35 Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de:

N₁: aziridina (C₃), azetidina (C₄), pirrolidina (tetrahidropirrol) (C₅), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol) (C₅), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C₅), piperidina (C₆), dihidropiridina (C₆), tetrahidropiridina (C₆), azepina (C₇);

40 O₁: oxirano (C₃), oxetano (C₄), oxolano (tetrahidrofurano) (C₅), oxol (dihidrofurano) (C₅), oxano (tetrahidropirano) (C₆), dihidropirano (C₆), pirano (C₆), oxepina (C₇);

S₁: tiirano (C₃), tietano (C₄), tiolano (tetrahidrotiofeno) (C₅), tiano (tetrahidrotiopiran) (C₆), tiepano (C₇);

O₂: dioxolano (C₅), dioxano (C₆) y dioxepano (C₇);

O₃: trioxano (C₆);

45 N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (dihidropirazol) (C₅), piperazina (C₆); N₁O₁: tetrahidrooxazol (C₅), dihidrooxazol (C₅), tetrahidroisoxazol (C₅), dihidroisoxazol (C₅), morfolina (C₆), tetrahidrooxazina (C₆), dihidrooxazina (C₆), oxazina (C₆);

N₁S₁: tiazolina (C₅), tiazolidina (C₅), tiomorfolina (C₆);

N₂O₁: oxadiazina (C₆);

50 O₁S₁: oxatiol (C₅) y oxatiano (tioxano) (C₆); y,

N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

55 Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen los obtenidos a partir de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C₅), tales como arabinofuransosa, lixofuransosa, ribofuransosa y xilofuransosa, y piranosas (C₆), tales como alopiranososa, altropiranososa, glucopiranososa, mannopiranososa, gulopiranososa, idopiranososa, galactopiranososa, y talopiranososa.

60 Arilo C₅₋₂₀: La expresión "arilo C₅₋₂₀", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente obtenido mediante la eliminación un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo aromático de un compuesto aromático, teniendo dicho grupo de 3 a 20 átomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo.

65 En este contexto los sufijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, etc.) indican el número de átomos en el anillo, o intervalo del número de átomos en el anillo, tanto átomos de carbono como heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "arilo C₅₋₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo que tiene 5 ó 6 átomos en el anillo.

Los átomos en el anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en "grupos carboarilo".

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de benceno (es decir fenilo) (C₆), naftaleno (C₁₀), azuleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), naftaceno (C₁₈) y pireno (C₁₆).

Los ejemplos de grupos arilo que comprenden anillos condensados, siendo al menos uno de los mismos aromático, incluyen, pero sin limitación, grupos obtenidos a partir de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C₉), indeno (C₉), isoindeno (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (C₁₀), acenafteno (C₁₂), fluoreno (C₁₃), fenaleno (C₁₃), acefenantreno (C₁₅) y aceantreno (C₁₆).

Como alternativa, los átomos en el anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en "grupos heteroarilo". Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de:

N₁: pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆);

O₁: furano (oxol) (C₅);

S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

N₁O₁: oxazol (C₅), isoxazol (C₅), isoxazina (C₆);

N₂O₁: oxadiazol (furazano) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

N₂: imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C₆);

N₃: triazol (C₅), triazina (C₆); y

N₄: tetrazol (C₅).

Los ejemplos de heteroarilo que comprenden anillos condensados, incluyen, pero sin limitación:

C₉ (con 2 anillos condensados) obtenido a partir de benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indol (N₁), isoindol (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purina (N₄) (por ejemplo, adenina, guanina), benzoimidazol (N₂), indazol (N₂), benzoxazol (N₁O₁), benzoisoxazol (N₁O₁), benzodioxol (O₂), benzofurazano (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S);

C₁₀ (con 2 anillos condensados) obtenidos a partir de cromeno (O₁), isocromeno (O₁), cromano (O₁), isocromano (O₁), benzodioxano (O₂), quinolina (N₁), isoquinolina (N₁), quinolizina (N₁), benzoxazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), quinoxalina (N₂), quinazolina (N₂), cinnolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);

C₁₁ (con 2 anillos condensados) obtenidos a partir de benzodiazepina (N₂);

C₁₃ (con 3 anillos condensados) obtenidos a partir de carbazol (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofeno (S₁), carbolina (N₂), perimidina (N₂), piridoindol (N₂); y,

C₁₄ (con 3 anillos condensados) obtenidos a partir de acridina (N₁), xanteno (O₁), tioxanteno (S₁), oxantreno (O₂), fenoxatiina (O₁S₁), fenazina (N₂), fenoxazina (N₁O₁), fenotiazina (N₁S₁), tiantreno (S₂), fenantridina (N₁), fenantrolina (N₂), fenazina (N₂).

Los grupos anteriores, tanto solos o como parte de otros sustituyentes, pueden estar en sí mismos sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre ellos mismos y los sustituyentes adicionales que se enumeran a continuación.

Halo: -F, -Cl, -Br y -I.

Hidroxil: -OH.

Éter: -OR, en el que R es un sustituyente de éter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado como un grupo alcoxi C₁₋₇, descrito más adelante), un grupo heterocíclico C₃₋₂₀ (también denominado como un grupo heterociclioxi C₃₋₂₀), o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado como un grupo ariloxi C₅₋₂₀), preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇.

Alcoxi: -OR, en el que R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₇ incluyen, pero sin limitación, -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (sec-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi) y -O(tBu) (terc-butoxi).

Acetal: -CH(OR¹)(OR²), en el que R¹ y R² son independientemente sustituyentes acetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterocíclico C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇, o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R¹ y R², tomados junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos, y los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos acetal incluyen, pero sin limitación, -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂, y -CH(OMe)(OEt).

Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), en el que R¹ es un sustituyente de hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterocíclico C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos

hemiacetal incluyen, pero sin limitación, $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OMe})$ y $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OEt})$.

Cetal: $-\text{CR}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$, en el que R^1 y R^2 son como se ha definido para acetales, y R es un sustituyente de cetal distinto de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos cetal incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})_2$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OEt})_2$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})(\text{OEt})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})_2$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OEt})_2$ y $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})(\text{OEt})$.

Hemicetal: $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, en el que R^1 es como se ha definido para hemiacetales y R es un sustituyente hemicetal distinto de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$ y $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$.

Oxo (ceto, -ona): $=\text{O}$.

Tiona (tiocetona): $=\text{S}$.

Imino (imina): $=\text{NR}$, en el que R es un sustituyente de imino, por ejemplo, hidrógeno, grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $=\text{NH}$, $=\text{NMe}$, $=\text{NEt}$ y $=\text{NPh}$.

Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$.

Acilo (ceto): $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, en el que R es un sustituyente de acil, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como alquilacilo C_{1-7} o alcanoil C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también denominado como heterocicilacilo C_{3-20}), o un grupo arilo C_{5-20} (también denominado como arilacilo C_{5-20}), preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos acilo incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ (propionilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (t-butililo) y $-\text{C}(=\text{O})\text{Ph}$ (benzoilo, fenona).

Carboxi (ácido carboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): $-\text{C}(=\text{S})\text{SH}$.

Tiolo-carboxi (ácido tiolo-carboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{SH}$.

Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): $-\text{C}(=\text{S})\text{OH}$.

Ácido imídico: $-\text{C}(=\text{NH})\text{OH}$.

Ácido hidroxámico: $-\text{C}(=\text{NOH})\text{OH}$.

Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$, en el que R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ y $-\text{C}(=\text{O})\text{OPh}$. Aciloxi (éster inverso): $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$, en el que R es un sustituyente de aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos aciloxi incluyen, pero sin limitación, $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetoxi), $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$ y $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$.

Oxicarboxiloxi: $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$, en el que R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} y un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ y $-\text{OC}(=\text{O})\text{OPh}$.

Amino: $-\text{NR}^1\text{R}^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como alquilamino C_{1-7} o di-alquilamino C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} , o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R^1 y R^2 , tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los grupos amino pueden ser primarios ($-\text{NH}_2$), secundarios ($-\text{NHR}^1$) o terciarios ($-\text{NHR}^1\text{R}^2$) y e forma catiónica, pueden ser cuaternarios ($-\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$). Los ejemplos de grupos amino incluyen, pero sin limitación, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ y $-\text{NPh}$. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero sin limitación, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.

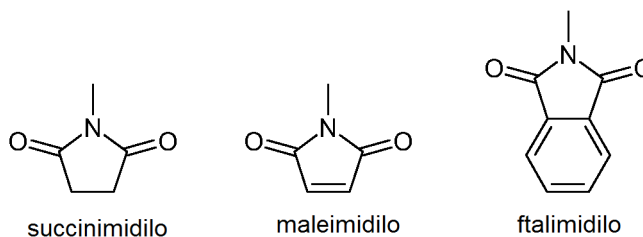
Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para los grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, así como grupos amido en los que R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo,

tiomorfolinocarbonilo y piperazinocarbonilo.

5 Tioamido (tiocarbamilo): $-C(=S)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, pero sin limitación, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ y $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

10 Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, en el que R^1 es un sustituyente de amida, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} y R^2 es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos acilamida incluyen, pero sin limitación, $-NHC(=O)CH_3$,

$-NHC(=O)CH_2CH_3$ y $-NHC(=O)Ph$. R^1 y R^2 pueden formar juntos una estructura cíclica, como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo y ftalimidilo:

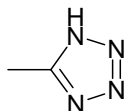


15 Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para grupos amino. Los ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, pero sin limitación, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ y $-OC(=O)NEt_2$.

20 Ureido: $-N(R^1)CONR^2R^3$, en el que R^2 y R^3 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para grupos amino y R^1 es un sustituyente de ureido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos ureido incluyen, pero sin limitación, $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$ y $-NMeCONEt_2$.

25 Guanidino: $-NH-C(=NH)NH_2$.

Tetrazolilo: un anillo aromático de cinco miembros que tiene cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono,



30 Imino: $=NR$, en el que R es un sustituyente de imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos imino incluyen, pero sin limitación, $=NH$, $=NMe$ y $=NEt$.

35 Amidina (amidino): $-C(=NR)NR_2$, en el que cada R es un susituyente de amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos amidina incluyen, pero sin limitación, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NH)NMe_2$ y $-C(=NMe)NMe_2$.

40 Nitro: $-NO_2$.

Nitroso: $-NO$.

Azido: $-N_3$.

45 Ciano (nitrilo, carbonitrilo): $-CN$.

Isociano: $-NC$.

Cianato: $-OCN$.

50 Isocianato: $-NCO$.

Tiociano (tiocianato): $-SCN$.

Isotiociano (isotiocianato): $-NCS$.

Sulfhidrilo (tiol, mercapto): $-SH$.

5 Tioéter (sulfuro): $-SR$, en el que R es un sustituyente tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como un grupo alquiltio C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos alquiltio C_{1-7} incluyen, pero sin limitación, $-SCH_3$ y $-SCH_2CH_3$,

10 Disulfuro: $-SS-R$, en el que R es un sustituyente disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado en el presente documento como disulfuro de alquilo C_{1-7}). Los ejemplos de grupos disulfuro de alquilo C_{1-7} incluyen, pero sin limitación, $-SSCH_3$ y $-SSCH_2CH_3$.

15 Sulfina (sulfino, sulfóxido): $-S(=O)R$, en el que R es un sustituyente de sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfina incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)CH_3$ y $-S(=O)CH_2CH_3$. Sulfona (sulfonilo): $-S(=O)_2R$, en el que R es un sustituyente de sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} , incluyendo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} fluorado o perfluorado. Los ejemplos de grupos sulfona incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)_2CH_3$ (metanosulfonilo, mesilo), $-S(=O)_2CF_3$ (triflilo),
20 $-S(=O)_2CH_2CH_3$ (esilo), $-S(=O)_2C_4F_9$ (nonaflilo), $-S(=O)_2CH_2CF_3$ (tresilo), $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (taurilo), $-S(=O)_2Ph$ (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-clorofenilsulfonilo (closilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalenosulfonato (napsilo) y 5-dimetilamino-naftalen-1-ilsulfonato (dansilo).

25 Ácido sulfínico (sulfino): $-S(=O)OH$, $-SO_2H$.

Ácido sulfónico (sulfo): $-S(=O)_2OH$, $-SO_3H$.

30 Sulfinato (éster de ácido sulfínico): $-S(=O)OR$; en el que R es un sustituyente sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfinato incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)OCH_3$ (metoxisulfino; sulfinato de metilo) y $-S(=O)OCH_2CH_3$ (etoxisulfino; sulfinato de etilo).

35 Sulfonato (éster del ácido sulfónico): $-S(=O)_2OR$, en el que R es un sustituyente de sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfonato incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)_2OCH_3$ (metoxisulfonilo; sulfonato de metilo) y $-S(=O)_2OCH_2CH_3$ (etoxisulfonilo; sulfonato de etilo).

40 Sulfiniloxi: $-OS(=O)R$, en el que R es un sustituyente sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen, pero sin limitación, $-OS(=O)CH_3$ y $-OS(=O)CH_2CH_3$.

45 Sulfoniloxi: $-OS(=O)_2R$, en el que R es un sustituyente de sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen, pero sin limitación, $-OS(=O)_2CH_3$ (mesilato) y $-OS(=O)_2CH_2CH_3$ (esilato).

50 Sulfato: $-OS(=O)_2OR$; en que R es un sustituyente de sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos sulfato incluyen, pero sin limitación, $-OS(=O)_2OCH_3$ y $-SO(=O)_2OCH_2CH_3$. Sulfamilo (sulfamoilo; amida del ácido sulfínico; sulfinamida): $-S(=O)NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamilo incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)NH_2$, $-S(=O)NH(CH_3)$, $-S(=O)N(CH_3)_2$, $-S(=O)NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)N(CH_2CH_3)_2$ y $-S(=O)NPh$.

55 Sulfonamido (sulfinamoilo; amida del ácido sulfónico; sulfonamida): $-S(=O)_2NR^1R^2$, en el que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se ha definido para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, pero sin limitación, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2NH(CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_3)_2$, $-S(=O)_2NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_2CH_3)_2$ y $-S(=O)_2NPh$.

60 Sulfamino: $-NR^1S(=O)_2OH$, en el que R^1 es un sustituyente de amino, como se ha definido para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamino incluyen, pero sin limitación, $-NHS(=O)_2OH$ y $-N(CH_3)S(=O)_2OH$.

65 Sulfonamino: $-NR^1S(=O)_2R$, donde R^1 es un sustituyente de amino, como se ha definido para grupos amino, y R es un sustituyente de sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfonamino incluyen, pero sin limitación, $-NHS(=O)_2CH_3$ y $-N(CH_3)S(=O)_2C_6H_5$.

Sulfinamino: $-NR^1S(=O)R$, en el que R^1 es un sustituyente de amino, como se ha definido para grupos amino y R es

un sustituyente de sulfenamino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfenamino incluyen, pero sin limitación, -NHS(=O)CH₃ y -N(CH₃)S(=O)C₆H₅.

- 5 Fosfino (fosfina): -PR₂, en el que R es un sustituyente de fosfino, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfino incluyen, pero sin limitación, -PH₂, -P(CH₃)₂, -P(CH₂CH₃)₂, -P(t-Bu)₂ y -P(Ph)₂.

Fosfo: -P(=O)₂.

- 10 Fosfinilo (óxido de fosfina): -P(=O)R₂, en el que R es un sustituyente de fosfinilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfinilo incluyen, pero sin limitación, -P(=O)(CH₃)₂, -P(=O)(CH₂CH₃)₂, -P(=O)(t-Bu)₂ y -P(=O)(Ph)₂.

- 15 Ácido fosfónico (fosfono): -P(=O)(OH)₂.

- Fosfonato (éster de fosfono): -P(=O)(OR)₂, en el que R es un sustituyente de fosfonato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfonato incluyen, pero sin limitación, -P(=O)(OCH₃)₂, -P(=O)(OCH₂CH₃)₂, -P(=O)(O-t-Bu)₂ y -P(=O)(OPh)₂.

- Ácido fosfórico (fosfonooxi): -OP(=O)(OH)₂.

- 25 Fosfato (éter fosfonooxi): -OP(=O)(OR)₂, en el que R es un sustituyente de fosfato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfato incluyen, pero sin limitación, -OP(=O)(OCH₃)₂, -OP(=O)(OCH₂CH₃)₂, -OP(=O)(O-t-Bu)₂ y -OP(=O)(OPh)₂.

- 30 Ácido fosforoso: -OP(OH)₂.

Fosfito: -OP(OR)₂, en el que R es un sustituyente de fosfito, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfito incluyen, pero sin limitación, -OP(OCH₃)₂, -OP(OCH₂CH₃)₂, -OP(O-t-Bu)₂ y -OP(OPh)₂.

- 35 Fosforamidita: -OP(OR¹)-NR²₂, en el que R¹ y R² son sustituyentes de fosforamidita, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇ (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosforamidita incluyen, pero sin limitación, -OP(OCH₂CH₃)-N(CH₃)₂, -OP(OCH₂CH₃)-N(i-Pr)₂ y -OP(OCH₂CH₂CN)-N(i-Pr)₂.

- 40 Fosforamidato: -OP(=O)(OR¹)-NR²₂, en el que R¹ y R² son sustituyentes de fosforamidato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C₁₋₇ (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇ o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosforamidato incluyen, pero sin limitación, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(CH₃)₂, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(i-Pr)₂ y -OP(=O)(OCH₂CH₂CN)-N(i-Pr)₂.

- 45 Alquileno

- Alquileno C₃₋₁₂: La expresión "alquileno C₃₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo bidentado obtenido mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno, ambos del mismo átomo de carbono, o uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes, de un compuesto hidrocarburo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se indique otra cosa), que puede ser alifático o alicíclico y que puede estar saturado, parcialmente insaturado o totalmente insaturado. Por lo tanto, el término "alquileno" incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, etc., que se describen a continuación.

- 55 Los ejemplos de grupos alquileno C₃₋₁₂ saturados lineales incluyen, pero sin limitación, -(CH₂)_n- en las que n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, -CH₂CH₂CH₂- (propileno), -CH₂CH₂CH₂CH₂- (butileno), -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (pentileno) y -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (heptileno).

- 60 Los ejemplos de grupos alquileno C₃₋₁₂ saturados ramificados incluyen, pero sin limitación, -CH(CH₃)CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH(CH₂CH₃)CH₂- y -CH₂CH(CH₂CH₃)CH₂-.

- 65 Los ejemplos de grupos alquileno C₃₋₁₂ parcialmente insaturados lineales (grupos alquenileno y alquinileno C₃₋₁₂) incluyen, pero sin limitación, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH- y -CH₂-C≡C-CH₂-.

Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ parcialmente insaturados ramificado (grupos alquenoileno y alquinieleno C₃₋₁₂) incluyen, pero sin limitación, -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- y -C≡C-CH(CH₃)-

- 5 Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ alicíclicos saturados (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen, pero sin limitación, ciclopentileno (por ejemplo, ciclopent-1,3-ileno) y ciclohexileno (por ejemplo, ciclohex-1,4-ileno).

Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ parcialmente insaturados alicíclicos (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen, pero sin limitación, ciclopentenileno (por ejemplo, 4-ciclopenten-1,3-ileno), ciclohexenileno (por ejemplo, 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

Incluye Otras Formas

15 A menos que se especifique otra cosa, se incluyen en lo anterior formas iónicas, sales, solvatos y protegidas bien conocidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia a ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (carboxilato) (-COO-), una sal o solvato del mismo, así como formas protegidas convencionales. De forma análoga, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-N⁺HR¹R²), una sal o solvato del grupos amino, por ejemplo, una sal clorhidrato, así como formas protegidas convencionales de un grupo amino. De forma análoga, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma aniónica (-O-), una sal o solvato del mismo, así como formas protegidas convencionales.

Sales

25 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Se describen ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge y col., *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1-19 (1977).

30 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que pueda ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO-), después una sal puede formarse con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metal alcalino, tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes, tales como Al³⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ion amonio (es decir NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Son ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados los que se obtienen a partir de: etilamina, dietilamina, diciclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

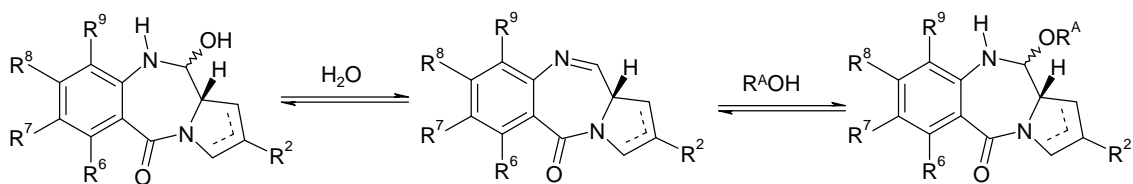
40 Si el compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional que pueda ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

45 Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetiloxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

Solvatos

55 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de un soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal de compuesto activo) y un disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente como hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

60 La invención incluye compuestos en los que el disolvente se añade a través del enlace de imina del grupo PBD, que se ilustra a continuación, en el que el disolvente es agua o un alcohol (R^AOH, donde R^A es C₁₋₄ alquil):



Estas formas pueden llamarse las formas éter de carbinolamina y carbinolamina del PBD (como se describe en la sección relacionada con R¹⁰ anterior). El balance de estos equilibrios depende de las condiciones en que los compuestos se encuentren, así como de la naturaleza del grupo en sí mismo.

5

Estos compuestos particulares pueden aislarse en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

Isómeros

10 Ciertos compuestos de la invención pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas particulares, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas syn y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, de silla, torcidas, cubiertas y de semisilla; y combinaciones de los mismos, en lo sucesivo denominadas en su conjunto como "isómeros" (o "formas isoméricas").

15

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse al compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre su compañero de imagen especular.

20

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen idéntica constitución química, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos de carbono o grupos en el espacio.

25 "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Pueden separarse mezclas de diastereómeros con procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

30 "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares que no pueden superponerse entre sí.

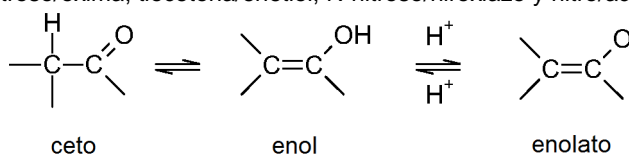
Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas generalmente en el presente documento se indican a continuación S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales, y por tanto existen en formas estereoisoméricas diferentes. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, incluyendo, pero sin limitación, diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de la luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula entorno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de giro del plano de la luz polariza por el compuesto, significando con (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero también puede denominarse como un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se llama comúnmente mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como una mezcla racémica o un racemato, que pueden aparecer cuando no hubo estereoselección o estereospecificidad en una reacción o procedimiento químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

45

Debe observarse que, excepto como se ha descrito anteriormente para formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, los isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir isómeros que se diferencian en las conexiones entre átomos en vez de únicamente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De forma análoga, una referencia a orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras muy bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas que entren dentro de dicha clase (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

60

La excepción anterior no se refiere a formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrados a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetirol, N-nitroso/hiroxiazol y nitro/aci-nitro.



5

El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere isómeros estructurales de energías diferentes que pueden intercambiarse mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómero protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante migración de un protón, tal como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de unión.

10

Debe observarse que se incluyen específicamente en el término "isómero", compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

15

Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero sin limitación, ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl y ^{125}I . Se incorporan diversos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C . Dichos compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios de cinética de reacción, técnicas de detección o formación de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión de un solo fotón (SPECT), incluyendo ensayos de distribución en tejido de fármaco o sustrato, o tratamientos radioactivos de pacientes. Los compuestos de la invención marcados con deuterio o sustituidos terapéuticamente pueden tener propiedades de DMPK mejoradas (metabolismo de fármaco y farmacocinéticas), en relación a la distribución, metabolismo y excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo mayor semi-vida *in vivo* o menos requisitos de dosificación. Un compuesto marcado con ^{18}F puede ser útil para estudios PET o SPECT. Pueden prepararse compuestos marcados isotópicamente de la presente invención y profármacos de los mismos realizando los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones que se describen más adelante mediante sustitución de un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente. Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, 2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos, o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que deuterio, en este contexto, se considera un sustituyente. La concentración de dicho isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de esta invención cualquier átomo que no se designe específicamente como un isótopo en particular pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo.

20

25

30

35

40

A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto en particular incluye todas estas formas tautoméricas, incluyendo (total o parcialmente) mezclas racémicas y otras mezclas de las mismas. Los procedimientos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de dichas formas tautoméricas se conocen en la técnica o pueden obtenerse fácilmente adaptando los procedimientos que se enseñan en el presente documento, o procedimientos conocidos, de una manera conocida.

45

Actividad biológica

50 Ensayos de proliferación celular *in vitro*

En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) se mide: exponiendo las células de mamífero que tienen proteínas receptoras, por ejemplo HER2, al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días y midiendo la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células se usan para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de la caspasa) de un ADC de la invención.

55

La potencia *in vitro* de los conjugados fármaco-anticuerpo se puede medir mediante un ensayo de proliferación celular. El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] está disponible comercialmente (Promega Corp., Madison, WI), método de ensayo homogéneo basado en la expresión recombinante de la luciferasa de *Coleoptera* (patentes de EE.UU. n.º 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de

60

células viables en cultivo en base a la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch y col. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; documento US 6602677). El ensayo CellTiter-Glo[®] se realiza en un formato de 96 pocillos, lo que lo hace favorable para la detección selectiva de alto rendimiento (HTS) (Cree y col. (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requieren etapas de lavado, eliminación del medio y múltiple pipeteo. El sistema detecta solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos tras la adición del reactivo y el mezclado. Las células se pueden tratar de forma continua con ADC o se pueden tratar y separar de los ADC. En general, las células tratadas brevemente, es decir 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato de "añadir-mezclar-medir" homogéneo tiene como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en cultivo. El ensayo CellTiter-Glo[®] genera una señal luminiscente de "tipo brillo" producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, en función del tipo de célula y del medio usado. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa (ULR). El sustrato, la luciferina de escarabajo, se descarboxila de forma oxidativa mediante la luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión concomitante de ATP en AMP y generación de fotones.

Eficacia in vivo

La eficacia *in vivo* de los conjugados fármaco-anticuerpo (ADC) de la invención se puede medir mediante estudios de xenoinjerto tumoral en ratones. Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de un ADC anti-HER2 de la invención se puede medir mediante un modelo en ratón de explante transgénico de alta expresión de HER2. Un aloinjerto se propaga desde el ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde o responde mal a la terapia con HERCEPTIN[®]. Los sujetos fueron tratados una vez con ADC a ciertos niveles de dosis (mg/kg) y exposición al fármaco de PBD (($\mu\text{g}/\text{m}^2$); y control con tampón placebo (vehículo) y se monitorizaron en dos semanas o más para medir el tiempo hasta la duplicación del tumor, el log de muerte celular y la disminución del tamaño del tumor.

Uso

Los conjugados de la invención se pueden usar para proporcionar un compuesto de PBD en una localización diana.

La localización diana es, preferentemente, una población de células proliferativas. El anticuerpo es un anticuerpo para un antígeno presente en una población de células proliferativas.

En una realización, el antígeno está ausente o presente a un nivel reducido en una población de células no proliferativas en comparación con la cantidad de antígeno presente en la población de células proliferativas, por ejemplo una población de células tumorales.

En la localización diana, el enlazador puede escindirse de modo que libere un compuesto de fórmula (D). Por tanto, el conjugado de la invención se pueden usar para proporcionar de forma selectiva un compuesto de fórmula (D) en la localización diana.

El enlazador se puede escindir mediante una enzima presente en la localización diana.

La localización diana puede estar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los compuestos del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención incluyen aquéllos con utilidad para actividad anticancerosa. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir unido covalentemente a través de un enlazador, a un grupo farmacológico de PBD, es decir la toxina. Cuando el fármaco no está conjugado a un anticuerpo, el fármaco de PBD tiene un efecto citotóxico. Por tanto, la actividad biológica del grupo farmacológico de PBD se modula mediante conjugación con un anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención liberan de forma selectiva una dosis eficaz de un agente citotóxico al tejido tumoral, de modo que se puede conseguir una selectividad mayor, es decir una dosis eficaz menor.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto conjugado como se ha descrito en el presente documento para uso en terapia.

En un aspecto adicional se proporcionan un compuesto conjugado como se describe en el presente documento para usar en el tratamiento de enfermedades proliferativas. Un segundo aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto conjugado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente si un conjugado candidato trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula concreta. Por ejemplo, en los ejemplos siguientes se describen ensayos que se pueden usar de forma conveniente para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto concreto.

El término “enfermedad proliferativa” se refiere a una proliferación celular indeseada o no controlada de células excesivas o anormales que no se desea, tales como un crecimiento neoplásico o hiperplásico, *in vitro* o *in vivo*

5 Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero sin limitación, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluidas, pero sin limitación, neoplasias y tumores (p. ej., histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma),
 10 cánceres (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer hepático, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (p. ej., de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Cánceres de interés concreto incluyen, pero sin limitación, leucemias y cánceres de ovarios.

Se puede tratar cualquier tipo de célula, incluyendo, pero sin limitación, de pulmón, gastrointestinal (incluidas, por ejemplo, intestinal, de colon), de mama (mamarias), de ovarios, de próstata, de hígado (hepáticas), de riñón (renal),
 15 de vejiga urinaria, de páncreas, de cerebro y de piel.

En una realización, el tratamiento es de un cáncer pancreático.

20 En una realización, el tratamiento es de un tumor que tiene la integrina $\alpha_v\beta_6$ sobre la superficie de la célula.

Se contempla que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención pueden usarse para tratar varias enfermedades o trastornos, caracterizados, por ejemplo, por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Ejemplos de afecciones de trastornos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos; leucemia, neoplasias malignas hematológicas y linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales,
 25 hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales, blastocoélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluidos trastornos autoinmunitarios. En general, la enfermedad o trastorno que se va a tratar es una enfermedad hiperproliferativa tal como cáncer. Ejemplos de cáncer que se va a tratar en el presente documento incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluido cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma pulmonar escamoso, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluido cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga urinaria, hematoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o de útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal,
 30 cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, así como cáncer de cabeza y cuello.

Enfermedades autoinmunitarias para las que se pueden usar compuestos de ADC en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípidos y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos hepáticos y gastrointestinales autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (p. ej., colitis ulcerosa y enfermedad de Chron), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis asociada con ANCA, incluida la vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliarteritis), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de mioclono opsoclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, habones, pénfigo vulgar, pénfigoide ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura posttransfusión y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades autoinmunitarias de la audición (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de la audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órgano y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitas dependiente de insulina (DMDI), enfermedad de Addison y enfermedad autoinmunitaria del tiroides (p. ej., enfermedad de Graves y tiroiditis)). Entre estas enfermedades, las más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada con ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMDI, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

60 **Métodos de tratamiento**

Los conjugados de la presente invención se pueden usar en un método de terapia. Aunque sin formar parte de la presente invención, es posible llevar a cabo un método de tratamiento que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conjugado de la invención. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser, al menos, mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y
 65

evolución en el tiempo de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo decisiones sobre la dosis, entra dentro de la responsabilidad de los profesionales generales y otros médicos.

- 5 Un compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero sin limitación, quimioterapia (administración de agentes activos, incluidos, por ejemplo, fármacos tales como quimioterapéuticos), cirugía y radioterapia.
- 10 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, con independencia del mecanismo de acción. Clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación: Agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides antimitóticos de origen vegetal, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de la quinasa. Agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en “terapia dirigida” y quimioterapia convencional.
- 15 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, N° CAS 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (N° CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), N° CAS 15663-27-1), carboplatino (N° CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo- 2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, N° CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.
- 25 Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELADCE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremofor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel con albúmina mediante ingeniería (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), cloramubucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo, tal como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluidas altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como cloramubucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (p.ej., caliceamicina, caliceamicina gamma1, caliceamicina omega1 (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) **33**:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de la cromoproteína endiina, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como deopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilonina; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sifozifran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2,

verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINA®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluye en la definición de “agente quimioterapéutico”: (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluidos, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FAGRUPON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolídeo y goserelina; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de las proteína quinasa tales como inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores de las lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersen (GENA SENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (p.ej., ANGIOZYME®) inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En la definición de “agentes quimioterapéuticos” también se incluyen anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa), y el conjugado anticuerpo-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

Los anticuerpos monoclonales con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos en combinación con los conjugados de la invención incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatuzumab mertansine, cantuzumab mertansine, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicin, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pectusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleuquina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab y visilizumab.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para usar de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del principio activo, es decir un compuesto conjugado, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otro material farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas pueden comprender un vehículo líquido, tal como agua, aceites de parafina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se puede incluir solución fisiológica salina, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o la inyección en el punto de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que carece de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica tienen la capacidad de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Según se requiera se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

65 **Formulaciones**

Aunque es posible usar (p. ej., administrar) el compuesto conjugado solo, a menudo es preferible presentarlo como una composición o formulación.

5 En una realización, la composición es una composición farmacéutica (p. ej., formulación, preparación, medicamento) que comprende un compuesto conjugado, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto conjugado, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero sin limitación, vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (p. ej., agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

15 En una realización, la composición comprende además otros agentes activos, por ejemplo otros agentes terapéuticos o profilácticos.

20 Los vehículos, diluyentes, excipientes etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales. Véase, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª Edición (eds. M. Ash y col. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

25 Es posible llevar a cabo un procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica que comprende mezclar al menos un conjugado o un compuesto de tipo conjugado radiomarcado con [¹¹C], como se define en el presente documento, junto con uno o más de los otros ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo vehículos, diluyentes, excipientes etc. Si se formula como unidades pequeñas (p. ej., comprimidos etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosis) del compuesto activo.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación etc., que son, dentro del ámbito del criterio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (p. ej., seres humanos) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una razonable proporción de beneficios/riesgos. Cada vehículo, diluyente, excipiente etc. debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

35 Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en el sector de la farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de llevar el compuesto activo en asociación con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha el compuesto activo con vehículos (p. ej., vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido etc.) y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

La formulación puede prepararse para proporcionar una liberación rápida o lenta; una liberación inmediata, retardada, programada o prolongada; o una combinación de los mismos.

45 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (p. ej., mediante inyección) incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, apirógenos, estériles (p. ej., soluciones, suspensiones) en los que el principio activo se disuelve, suspende o, por el contrario, se proporciona (p. ej., en un liposoma u otra micropartícula). Dichos líquidos pueden además contener otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor objetivo. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para usar en dichas formulaciones incluyen cloruro sódico, inyección, solución de Ringer o inyección de Ringer lactato. Normalmente, la concentración del principio activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a

50

55 aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

60 **Dosificación**

El experto en la técnica entenderá que las dosificaciones adecuadas del compuesto conjugado y las composiciones que comprenden el compuesto conjugado pueden variar de un paciente a otro. En general, la determinación de la dosificación óptima implicará el equilibrio del nivel del beneficio terapéutico contra cualquier riesgo o efecto secundario perjudicial. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores incluyendo, pero sin

limitación, la actividad del compuesto concreto, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección y la especie, el sexo, la edad, el peso, la afección, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente. La cantidad del compuesto y la vía de administración serán, en última instancia, a criterio del médico, veterinario o clínico, aunque, en general, la dosis se seleccionará para obtener concentraciones locales en el sitio de acción que ejerzan el efecto deseado sin producir muchos daños o efectos secundarios perjudiciales.

La administración se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente (p. ej., en dosis divididas a intervalos adecuados) a lo largo del ciclo de tratamiento. Los métodos de determinación del medio y la dosis de administración más eficaces son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para terapia, el objetivo de la terapia, la(s) célula(s) diana que se estén tratando y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples siendo los niveles y el patrón de dosis seleccionados por el médico, veterinario o clínico encargado del tratamiento.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 25 mg (más normalmente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. Cuando el compuesto activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco o similares, la cantidad administrada se calcula en base al compuesto parental y, de este modo, el peso real que se va a usar aumenta proporcionalmente.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 100 mg, 3 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 150 mg, 2 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 200 mg, 2 veces al día.

No obstante, en una realización, el compuesto conjugado se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 50 o aproximadamente 75 mg, 3 ó 4 veces al día.

En una realización, el compuesto conjugado se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 100 o aproximadamente 125 mg, 2 veces al día.

Las cantidades de dosis descritas anteriormente se pueden aplicar al conjugado (incluido el grupo de PBD y el enlazador al anticuerpo) o a la cantidad eficaz de compuesto de PBD proporcionada, por ejemplo la cantidad de compuesto que se puede liberar tras la escisión del enlazador.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada de un ADC de la invención dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si la molécula se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapias previas, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico encargado de la atención. La molécula se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata para la administración al paciente, mediante, por ejemplo, una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación de ejemplo del ADC que se va a administrar a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg del peso del paciente. Para administraciones repetidas en varios días o más, según la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación de ejemplo comprende un ciclo de administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de dosis adicionales cada semana, dos semanas o tres semanas de un ADC. Pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Tratamiento

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratamiento de una afección, se refiere, en general, a tratamiento y terapia, sea de un ser humano o de un animal (p. ej., en aplicaciones veterinarias), en las que se consigue algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo la inhibición de la progresión de la afección, e incluye reducción de la velocidad de la progresión, detención en la velocidad de la progresión, regresión de la afección, mejora de la afección y cura de la afección. También se incluye el tratamiento como una medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de

un compuesto activo o material, composición o dosis que comprende un compuesto activo que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una proporción beneficios/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen terapéutico deseado.

- 5 De un modo similar, como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto activo o material, composición o dosis que comprende un compuesto activo que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, acorde con una proporción beneficios/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen terapéutico deseado.

10 *Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco*

Los conjugados de anticuerpo y fármaco se pueden preparar mediante varias rutas, usando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, incluidos: (1) reacción de un grupo nucleófilo o un grupo electrófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar el intermedio anticuerpo-enlazador Ab-C, a través de un enlace covalente, seguida de reacción con un reactivo del grupo farmacológico activado; y (2) reacción de un reactivo del grupo farmacológico con un reactivo enlazador, para formar el reactivo fármaco-enlazador F-C, a través de un enlace covalente, seguida de reacción con el grupo nucleófilo o un grupo electrófilo de un anticuerpo. Los procedimientos de conjugación (1) y (2) se pueden usar con diversos anticuerpos y enlazadores para preparar los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención.

20 Los grupos nucleófilos sobre anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina en N-terminal, (ii) grupos amina en la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol en la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar en la que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre grupos enlazadores y reactivos enlazadores, incluidos: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y de bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente disulfuro de cisteína formará de este modo, en teoría, dos nucleófilos de tiol reactivo. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en antibióticos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que tiene como resultado la conversión de una amina en un tiol.

35 También se pueden producir conjugados de anticuerpo-fármaco mediante modificación del anticuerpo para introducir grupos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos de oxidación de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona, que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o los grupos farmacológicos. Los grupos de base de Schiff de imina pueden formar un enlazador estable o se pueden reducir mediante, por ejemplo, reactivos de borohidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos adecuados sobre el fármaco (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina en N-terminal pueden reaccionar con metaperyodato sódico, lo que tiene como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído se puede hacer reaccionar con un grupo farmacológico o enlazador nucleófilo. Asimismo, los grupos nucleófilos sobre un grupo farmacológico incluyen, pero sin limitación: Grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazina, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre grupos enlazadores y reactivos enlazadores, incluidos: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y de bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Se pueden introducir grupos nucleófilos reactivos en los compuestos derivados de antraciclina mediante interconversiones del grupo funcional estándar. Por ejemplo, los grupos hidroxilo se pueden convertir en grupos tiol mediante reacciones de tipo Mitsunobu para formar compuestos de fármaco modificados con tiol.

El sujeto/paciente

60 El sujeto/paciente puede ser un animal, mamífero, un mamífero con placenta, un marsupial (p. ej., un canguro, un tejón australiano), un monotrema (p. ej., ornitorrinco), un roedor (p. ej., una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (p. ej., un ratón), un lagomorfo (p. ej., un conejo), un ave (p. ej., un pájaro), un canino (p. ej., un perro), un felino (p. ej., un gato), un equino (p. ej., un caballo), un porcino (p. ej., un cerdo), un ovino (p. ej., una oveja), un bovino (p. ej., una vaca), un primate, un simio (p. ej., un mono o gorila), un mono (p. ej., un títí, babuino), un simio (p. ej., gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

65 Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo un feto. En una

realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

En una realización, el paciente es una población en la que cada paciente tiene un tumor que tiene integrina $\alpha_v\beta_6$ sobre la superficie de la célula.

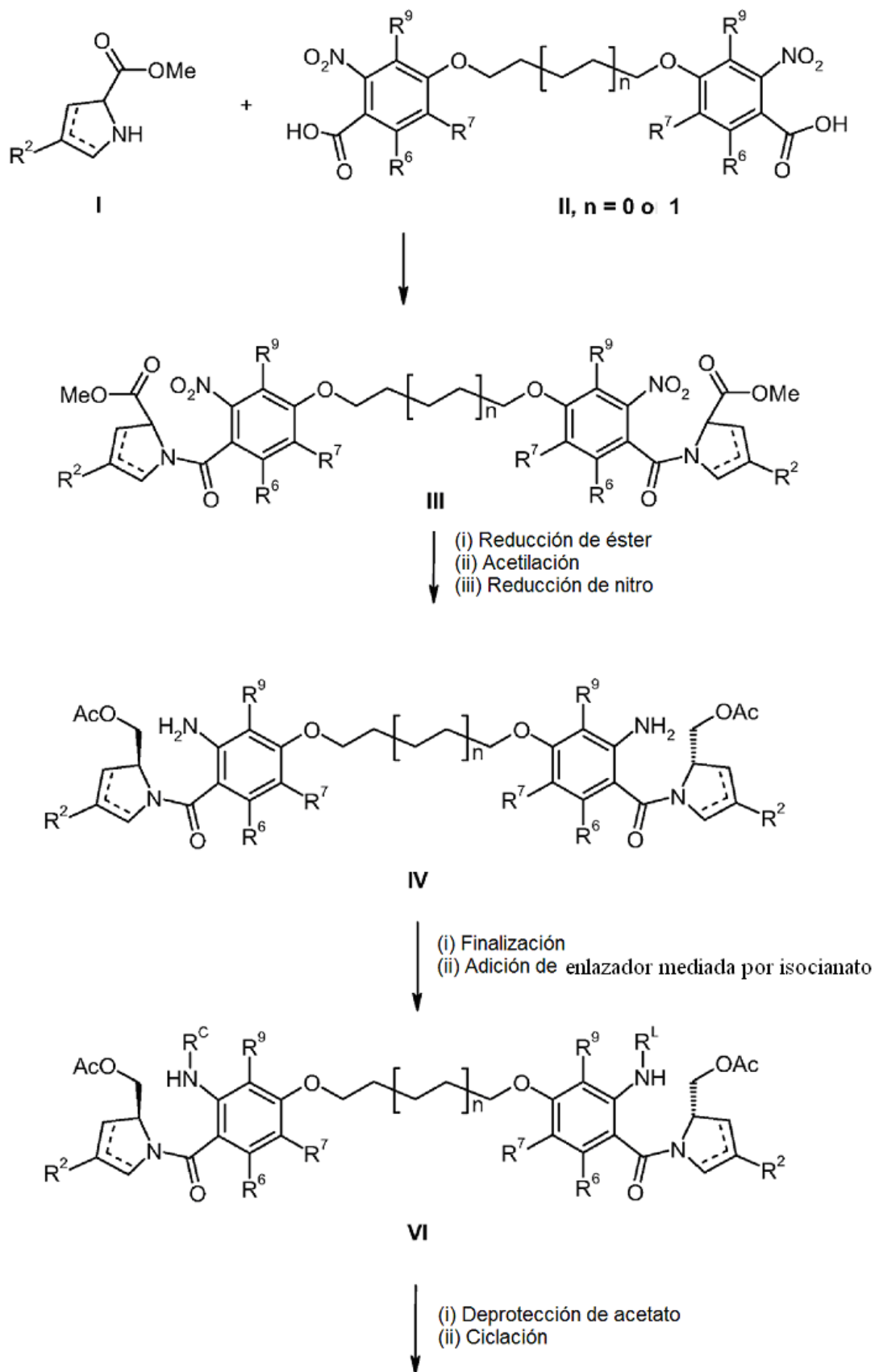
5

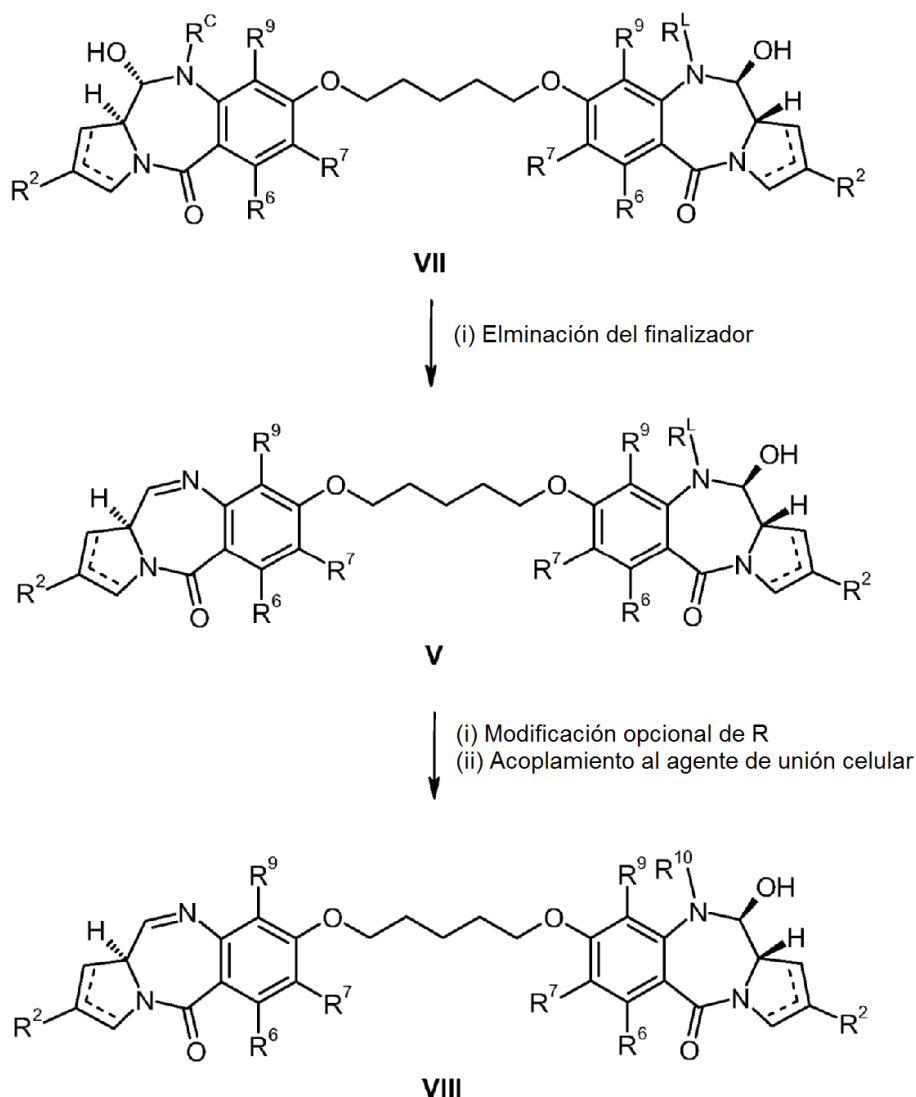
Síntesis

En una realización, un conjugado dimérico de fórmula VIII puede prepararse a partir de los compuestos I y II como se muestra en el Esquema 1.

10

Esquema 1,





En general, pueden prepararse dímeros asimétricos tratando compuestos bis-amino de fórmula **IV** con un equivalente de un reactivo de cloroformiato disponible en el mercado (o que puede prepararse fácilmente) para romper la simetría de las moléculas. Después, la amina libre restante puede funcionalizarse independientemente para introducir el progrupo lábil terapéuticamente (R^L). La manipulación adicional del grupo funcional para cerrar el anillo PBD B, la eliminación de los grupos de protección y la terminación e introducción del grupo funcional de unión a anticuerpo, por ejemplo G^1 , proporciona la molécula diana.

Los compuestos de fórmula **IV** se preparan típicamente acoplado un fragmento de anillo C adecuadamente funcionalizado (I) a un núcleo dimérico que contiene el anillo A de fórmula **II**. Pueden prepararse fragmentos del anillo C a partir de componentes básicos de 4-oxoprolinato de metilo protegidos con carbamato conocidos. Puede emplearse olefinación en condiciones de Wittig o Horner-Emmons para formar alquenos *endo*- o *exo*- insaturados. Como alternativa, pueden usarse consecutivamente reacciones de triflación y acoplamiento de Suzuki para obtener fragmentos del anillo de C 3,4 o 4,5-insaturado sustituidos con 4-arilo. Pueden acoplarse fragmentos del anillo C y del anillo A en condiciones convencionales, en presencia de trietilamina, usando derivados de cloruro de ácido de los fragmentos de anillo A para dar moléculas de fórmula **III**. Los compuestos de tipo **III** pueden reducirse, sin afectar a la insaturación del *endo* o *exo* del anillo de C, con zinc en ácido acético para proporcionar moléculas de fórmula **IV**.

Pueden prepararse carbamatos asimétricos de tipo **VI** tratando bis-aminas de tipo **IV** con un solo equivalente de cloroformiatos disponibles en el mercado (o que pueden prepararse fácilmente), en presencia de piridina o trietilamina. Pueden seleccionarse cloroformiatos para proporcionar unidades de terminación de carbamato (R^C) que son tanto ortogonales como idénticas a las usadas en el progrupo (R^L). Los carbamatos idénticos permiten la eliminación simultánea de ambos grupos protectores ahorrando etapas sintéticas. Sin embargo, la eliminación de los carbamatos de terminación (R^C) requiere que la adición de la funcionalidad de unión a anticuerpo tenga lugar en presencia de un grupo sensible imina o carbinolamina N10-C11. Si fuera necesario, esta situación puede evitarse

mediante el uso de grupos protectores de carbamato ortogonales que permiten la adición de grupos de unión a anticuerpo mientras se mantiene el grupo carbinolamina N10-C11 protegido. En esta estrategia, el grupo N10-C11 debe desenmascararse en presencia del grupo de unión a anticuerpo y los reactivos usados deben ser compatibles con este grupo. Por ejemplo, si una imina N10-C11 debe desenmascararse en presencia de un grupo maleimida, Troc y Teoc serían grupos R^C adecuados como los agentes de desprotección, la pareja Cd/Pb y TBAF, no debería afectar al grupo maleimida. Por otro lado, el grupo Alloc debería evitarse puesto que pueden añadirse neutralizadores de π -alilo, tales como de modo 1,4 al grupo maleimida. El carbamato R^L puede introducirse convirtiendo el grupo amino restante en un isocianato e inactivándolo con el alcohol R^L. Como alternativa, el alcohol R^L puede convertirse en un cloroformiato o equivalente funcional (fluoroformiato, *p*-nitrocarbonato, pentafluorocarbonato o hidroxibenzotriazol carbonato). Finalmente, el grupo amino restante puede convertirse en un *p*-nitrocarbamato, pentafluorocarbamato o carbamato hidroxibenzotriazol reactivo, que puede desplazarse con el alcohol R^L para proporcionar moléculas de fórmula **VI**.

Pueden prepararse moléculas fórmula **VII** a partir de moléculas de fórmula **VI** eliminando los grupos protectores de acetato, con carbonato potásico en metanol acuoso, o en presencia de un grupo Fmoc en R^L con trietilborohidruro de litio. La oxidación con peryodinano de Dess-Martin (o como alternativa TPAP/NMO, PDC o en condiciones de Swern) proporciona el producto de anillo cerrado.

Pueden prepararse conjugados de fórmula **V** a partir de moléculas de fórmula **VII** mediante la eliminación del grupo de terminación R^C, elaboración de R^L para incluir un rento de unión a anticuerpo (por ejemplo, un grupo maleimidocaproilo) que puede conjugarse con un agente de unión celular, tal como un anticuerpo, en condiciones convencionales (véase Dubowchik y col. *Bioconjugate Chemistry*, **2002**, 13,855-869). La elaboración de R^L puede incluir la etapa de extender el grupo para que incluya un elemento espaciador, tal como un grupo G¹, que después puede usarse para conectar a un agente de unión a célula (formando de esta manera el grupo A).

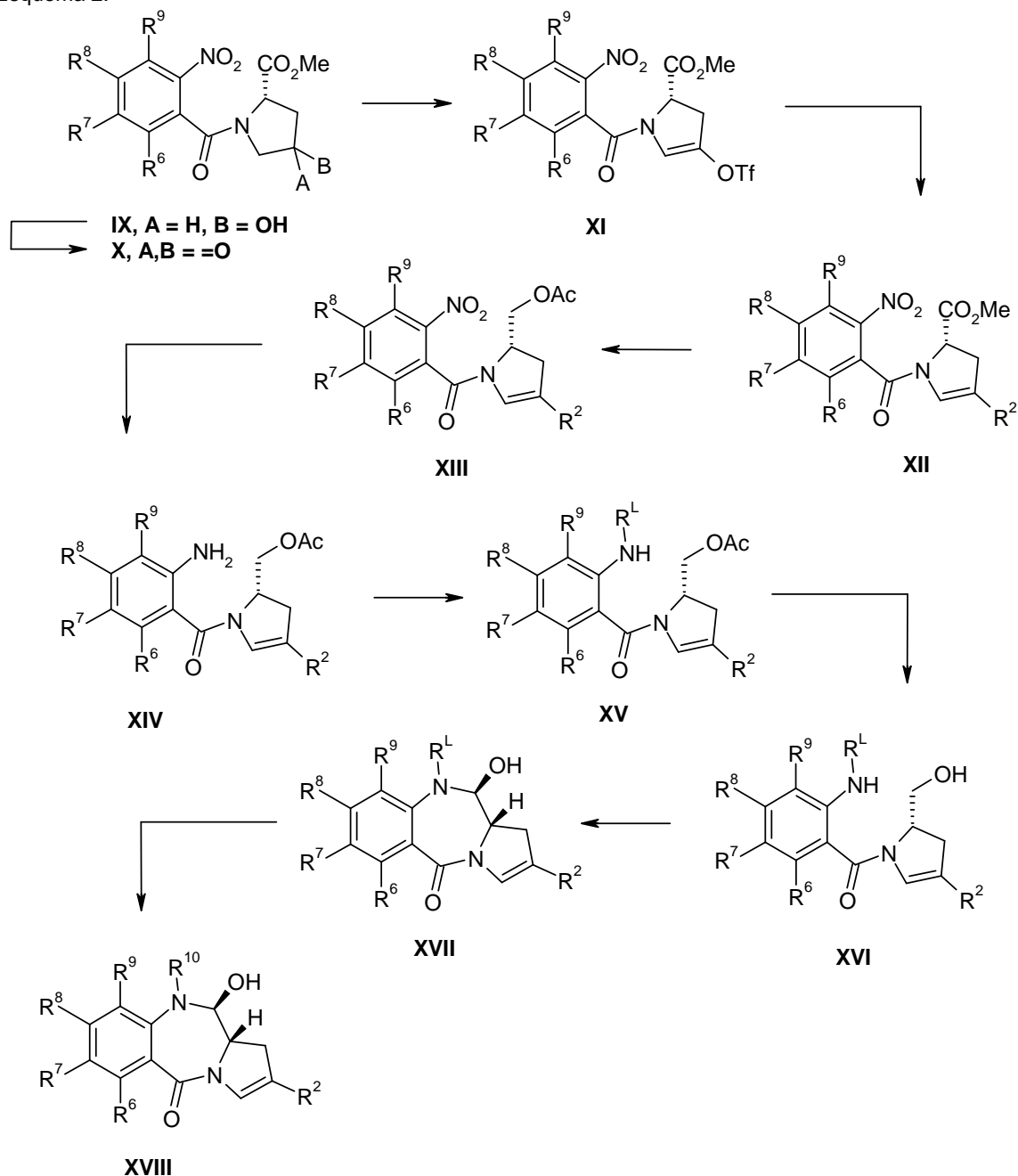
Pueden prepararse compuestos monoméricos y dímeros simétricos de una manera similar al dímero antisimétrico como se ha descrito anteriormente.

En otra realización, un conjugado de fórmula **XVIII** puede prepararse a partir del compuesto **IX** como se muestra en el Esquema 2.

Compuesto II

La síntesis de compuestos de fórmula (II) se describe en la solicitud anterior del solicitante, WO 2006/111759 y también se describe por Gregson y col. (*J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1161-1174). El compuesto (IIa) tiene un enlazador de tres carbonos. El compuesto (IIb) tiene un enlazador de cinco carbonos.

Esquema 2.



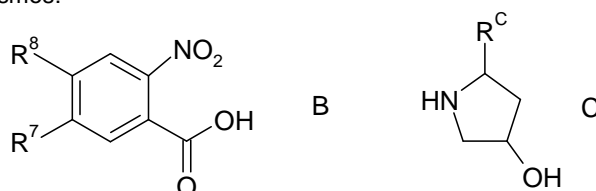
En este esquema, el grupo R² es un grupo arilo C₅₋₂₀. Los compuestos de fórmula IX se describen en el documento WO 2004/043963.

5

Los compuestos de fórmula X pueden sintetizarse a partir de compuestos de fórmula IX mediante oxidación, por ejemplo, usando: TCCA y TEMPO; BAIB y TEMPO; TPAP; condiciones de Dess-Martin; o condiciones de Swern.

10

Los compuestos de fórmula IX pueden sintetizarse acoplado compuestos adecuados de fórmulas B y C, o derivados activados de los mismos:



Los compuestos de fórmulas B y C están generalmente disponibles en el mercado o pueden sintetizarse fácilmente. Si el compuesto B es un dímero, entonces éste puede sintetizarse como se describe en el documento WO 00/12508.

5 Los compuestos de fórmula **XI** pueden prepararse a partir de un compuesto de fórmula **X** en un procedimiento que comprende tratar **X** con el anhídrido adecuado y 2,6-lutidina anhidra o 2,6-*t*Bu-piridina anhidra, a una temperatura de -35°C o inferior, en un disolvente orgánico seco, en una atmósfera inerte. **XI** está sustancialmente libre del compuesto que tiene un doble enlace C1-C2.

Cabe indicar que la preparación de compuestos que tienen un doble enlace C1-C2 se describe por Kang y col., *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689.

10 Los compuestos de fórmula **XI** pueden convertirse en compuestos de fórmula **XII**. La conversión (un acoplamiento de Suzuki) se realiza por acoplamiento cruzado catalizado por paladio de **XI** con el derivado de aril boro adecuado. El catalizador de paladio puede ser cualquier catalizador adecuado, por ejemplo Pd(PPh₃)₄, Pd(OCOCH₃)₂, PdCl₂, Pd(dba)₃.

15 Los compuestos de fórmula **XII** pueden convertirse en compuestos de fórmula **XIV** mediante el compuesto **XIII**. La conversión se consigue mediante la reducción en primer lugar del éster y protección en forma de un acetato (o silil éter en un enfoque alternativo). La reducción puede conseguirse por medios convencionales, por ejemplo con LiAlH₄ o NaBH₄. La protección en forma de un acetato puede conseguirse, por ejemplo, por reacción con cloruro de acetilo (protección en forma de un silil éter puede conseguirse, por ejemplo, por reacción con el cloruro de sililo adecuado). Después, la reducción del grupo se realiza usando, por ejemplo, zinc en ácido acético.

20 Los compuestos de fórmula **XIV** pueden convertirse en compuestos de fórmula **XV**. Esta conversión se consigue normalmente por reacción de **XIV** con trifosgeno para obtener el isocianato seguido de reacción con R^L-OH. Este enfoque se describe en el documento WO 2005/023814. Como alternativa, también pueden introducirse grupos protectores de nitrógeno individuales como un cloroformiato, fluorocformiato o azidoformiato. Los grupos protectores de nitrógeno más complejos, así como los grupos protectores de nitrógeno simples, pueden introducirse como carbonatos de O-succinamida, carbonatos de O-pentafluorfenilo y carbonatos de O-nitrofenilo.

30 La conversión de **XV** a **XVII** puede conseguirse por eliminación inicial del grupo protector de acetato, con carbonato potásico, en metanol acuoso o con trietilborohidruro de litio. La oxidación con peryodinano de Dess-Martin (o como alternativa, TPAP/NMO, TFAA/DMSO, complejo SO₃.Piridina /DMSO, PDC, PCC, BAIB/TEMPO o en condiciones de Swern) proporciona el producto cerrado de anillo. Si se usa un silil éter en lugar de un acetato, la conversión de **XV** en **XVII** puede conseguirse mediante la eliminación inicial del grupo protector silil éter, por ejemplo usando TBAF en THF, ácido acético en THF acuoso, CsF en DMF o HF en piridina, seguido de oxidación como se ha descrito anteriormente.

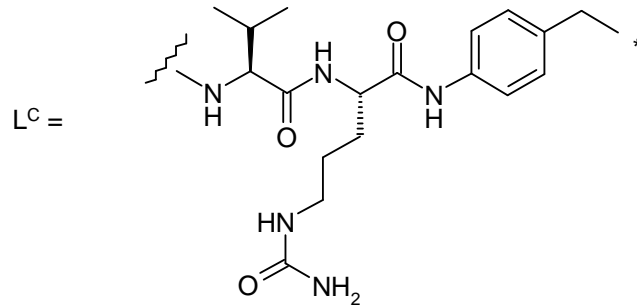
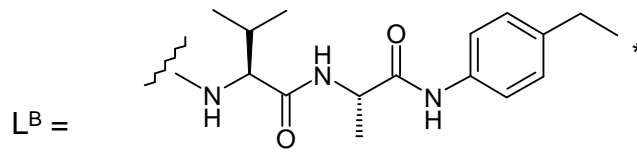
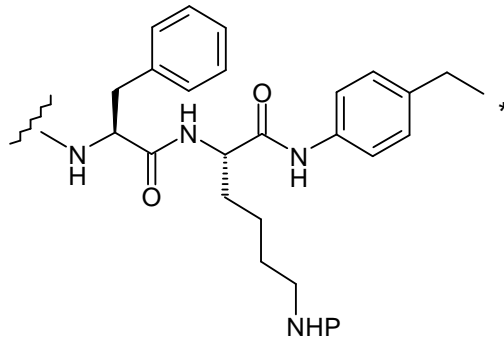
35 Después, el compuesto **XVIII** se acopla al agente de unión a célula. La secuencia de etapa o etapas de **XVII** a **XVIII** depende de la naturaleza de R^L. Este grupo puede modificarse y después acoplarse al agente de unión a célula para formar un conjugado de la invención. Por ejemplo, una terminación de grupo puede eliminarse para proporcionar una funcionalidad adecuada por la reacción con un agente de unión a célula. En otras etapas, esta misma funcionalidad puede usarse para un elemento espaciador adicional, tal como un grupo G¹, y después dicho elemento espaciador puede a su vez conectarse al agente de unión a célula (formando de esta manera el grupo A).

45 En algunas realizaciones de la invención se proporcionan compuestos de fórmula A-A y A-B. Pueden prepararse compuestos de este tipo usando procedimientos similares a los que se describen en el documento WO 2010/091150. Los compuestos intermedios descritos en el documento WO 2010/091150 también pueden emplearse en los procedimientos descritos anteriormente.

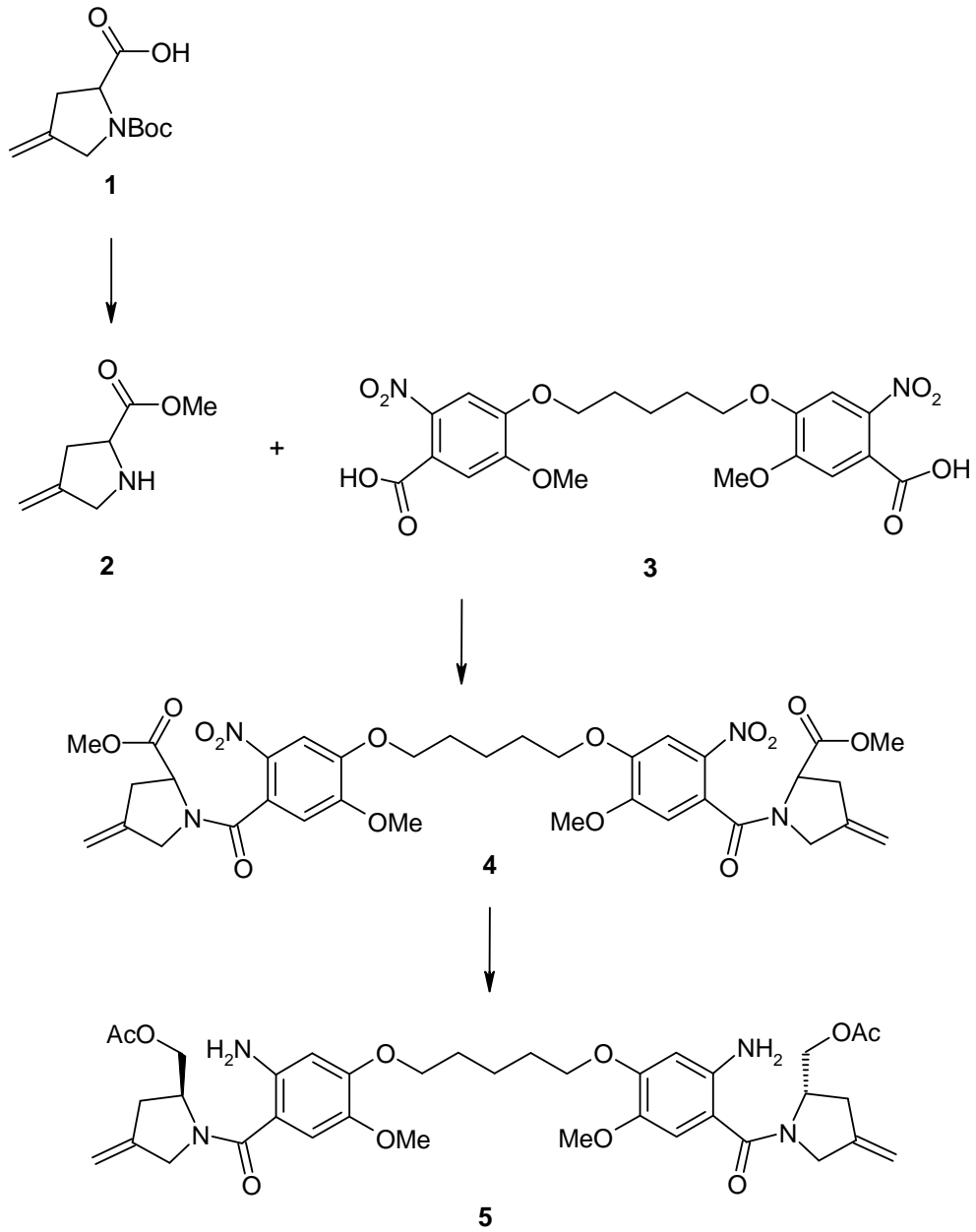
50 Por ejemplo, el compuesto dimérico (15) que se muestra en el párrafo [164] puede usarse como compuesto (III) en el Esquema I anterior. Se muestran compuestos monoméricos de este tipo como compuestos (3), (6) y (9). Estas y otras adaptaciones, serían evidentes para un experto en la materia.

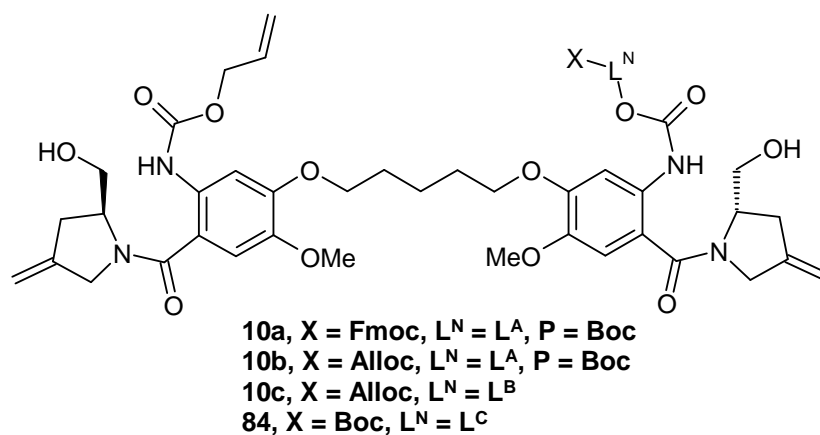
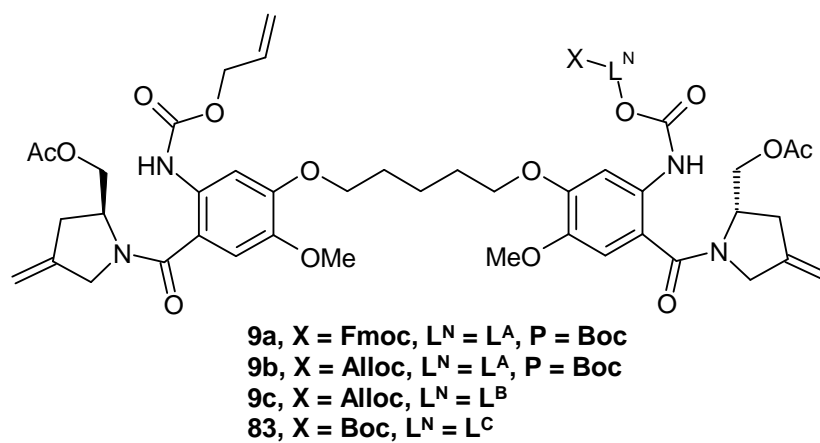
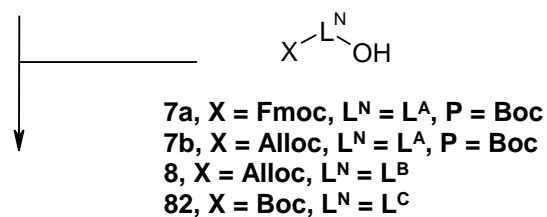
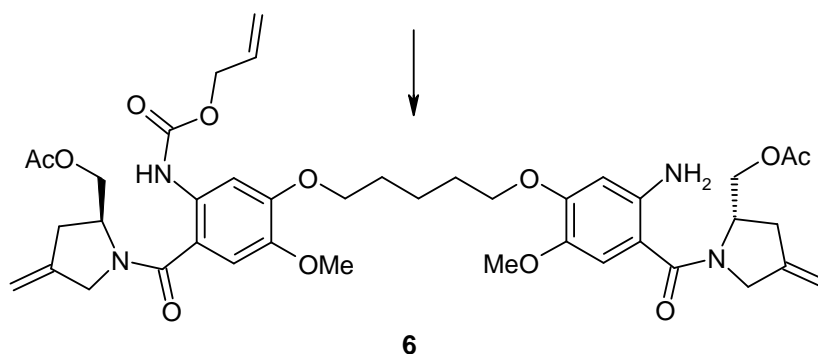
Síntesis preferidas

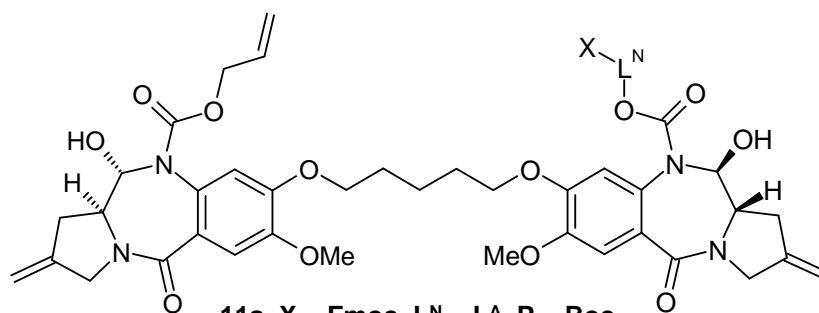
55 En una realización, el conjugado es el compuesto 14, y se prepara como se muestra en el Esquema 3. Los dipéptidos 7a,b y 8 se preparan como se describe en la sección experimental posterior. En dicho esquema, las porciones de enlazador L¹ y L² tienen las estructuras:



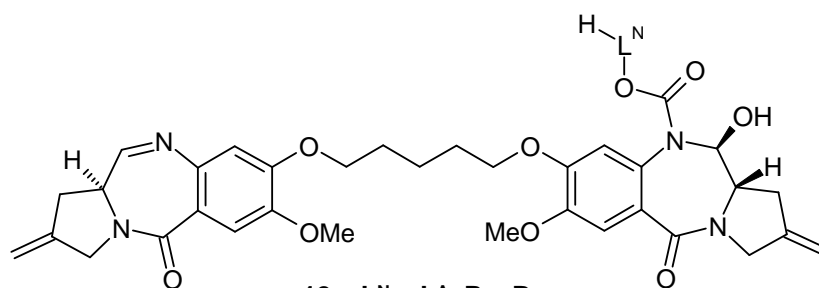
Esquema 3.



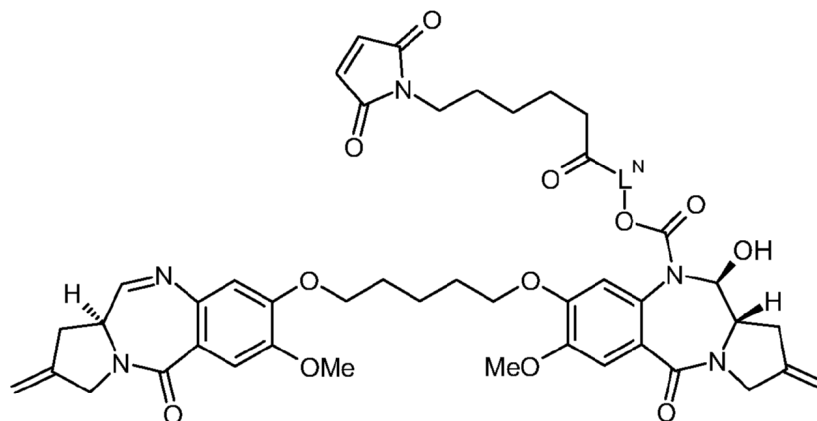




11a, X = Fmoc, L^N = L^A, P = Boc
 11b, X = Alloc, L^N = L^A, P = Boc
 11c, X = Alloc, L^N = L^B
 85, X = Boc, L^N = L^C



12a, L^N = L^A, P = Boc
 12c, L^N = L^B
 86, L^N = L^C



13a, L^N = L^A, P = Boc
 13b, L^N = L^A, P = H
 13c, L^N = L^B
 87, L^N = L^C

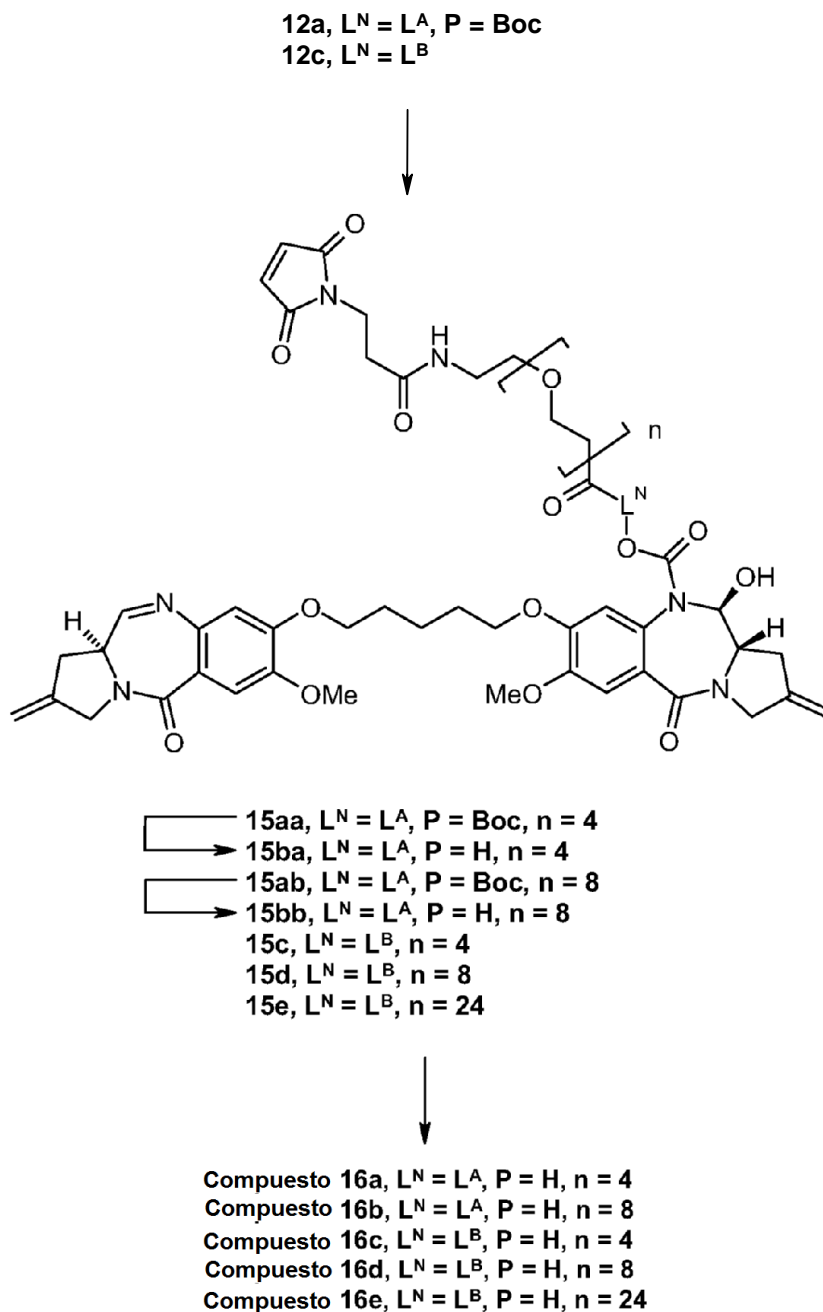
Agente de unión celular

Compuesto 14a, L^N = L^A, P = H
 Compuesto 14c, L^N = L^B
 Compuesto 88, L^N = L^C

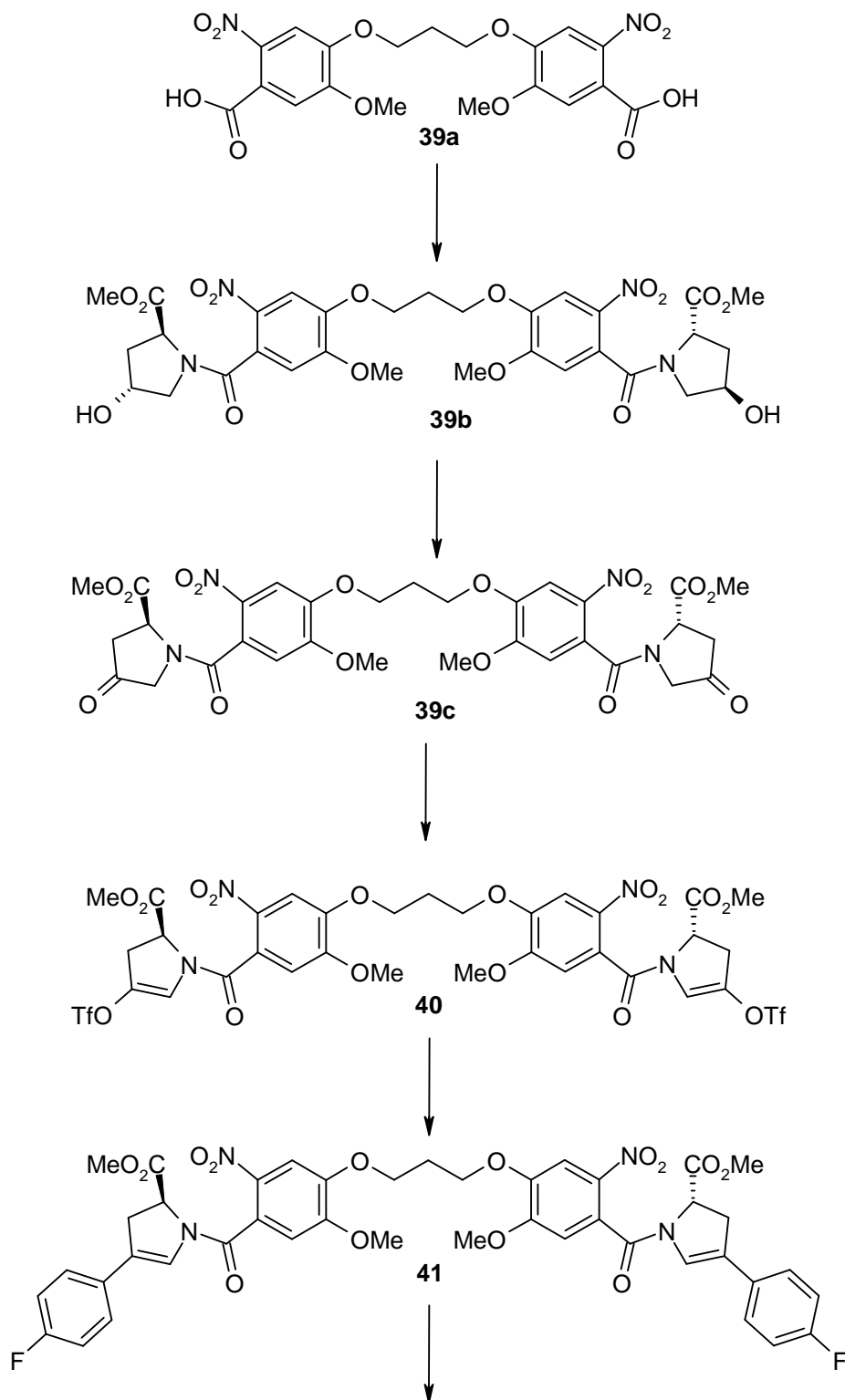
El compuesto 13c, cuando el dipéptido se corresponde con L^2 , puede prepararse a partir de 12c por un procedimiento análogo.

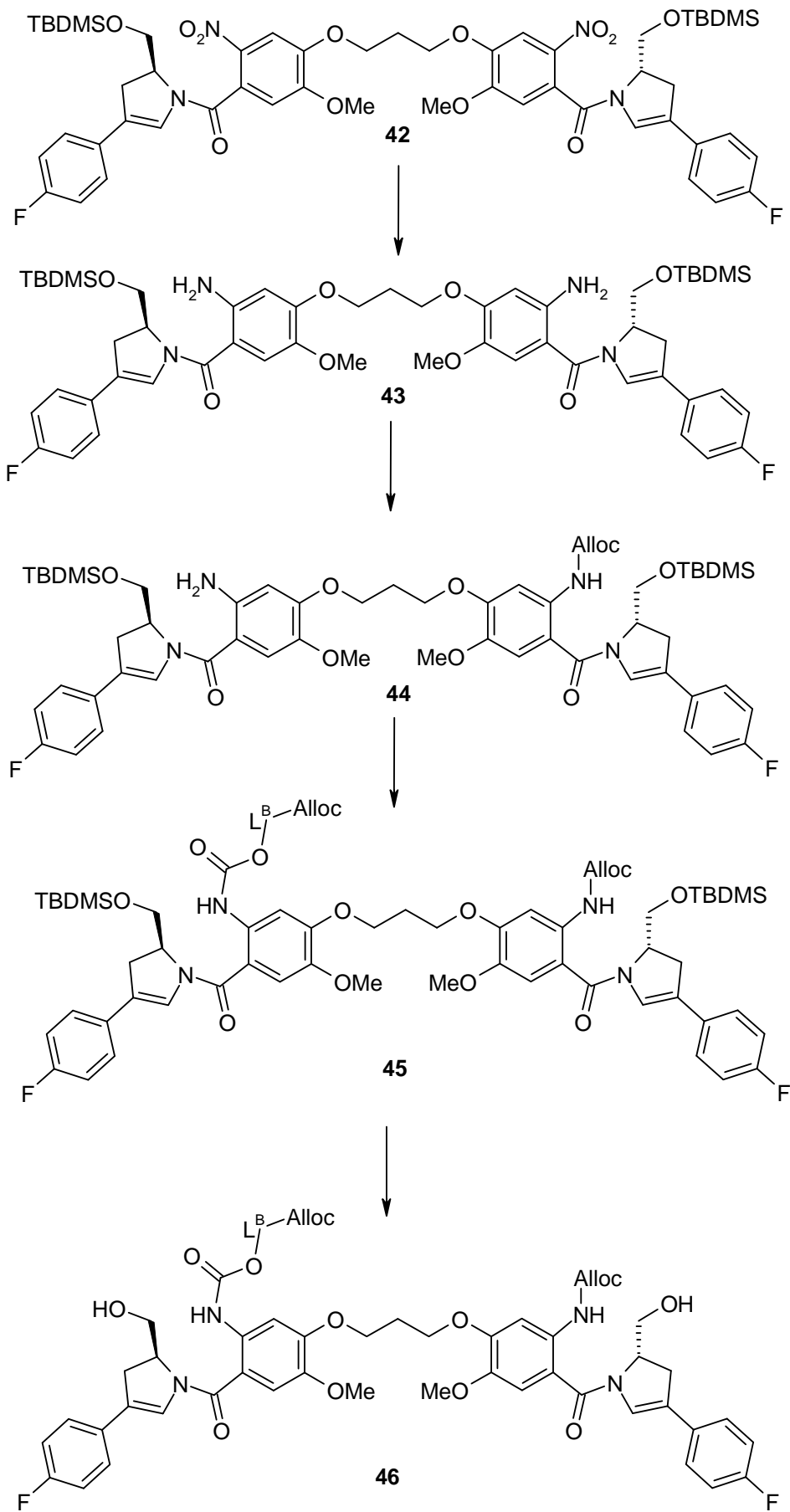
5 En una realización, el conjugado es el compuesto 16a o 16b, y el compuesto se prepara como se muestra en el Esquema 4 siguiente, en el que el compuesto 12a puede prepararse como se ha descrito anteriormente:

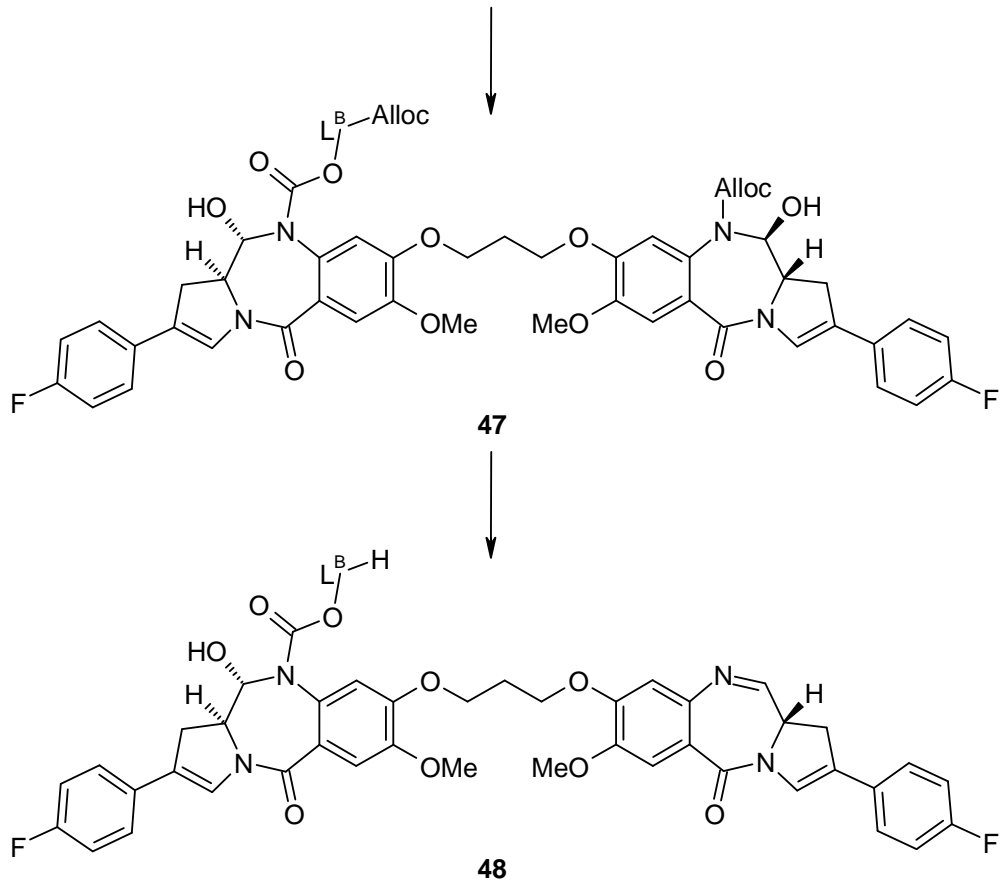
Esquema 4.



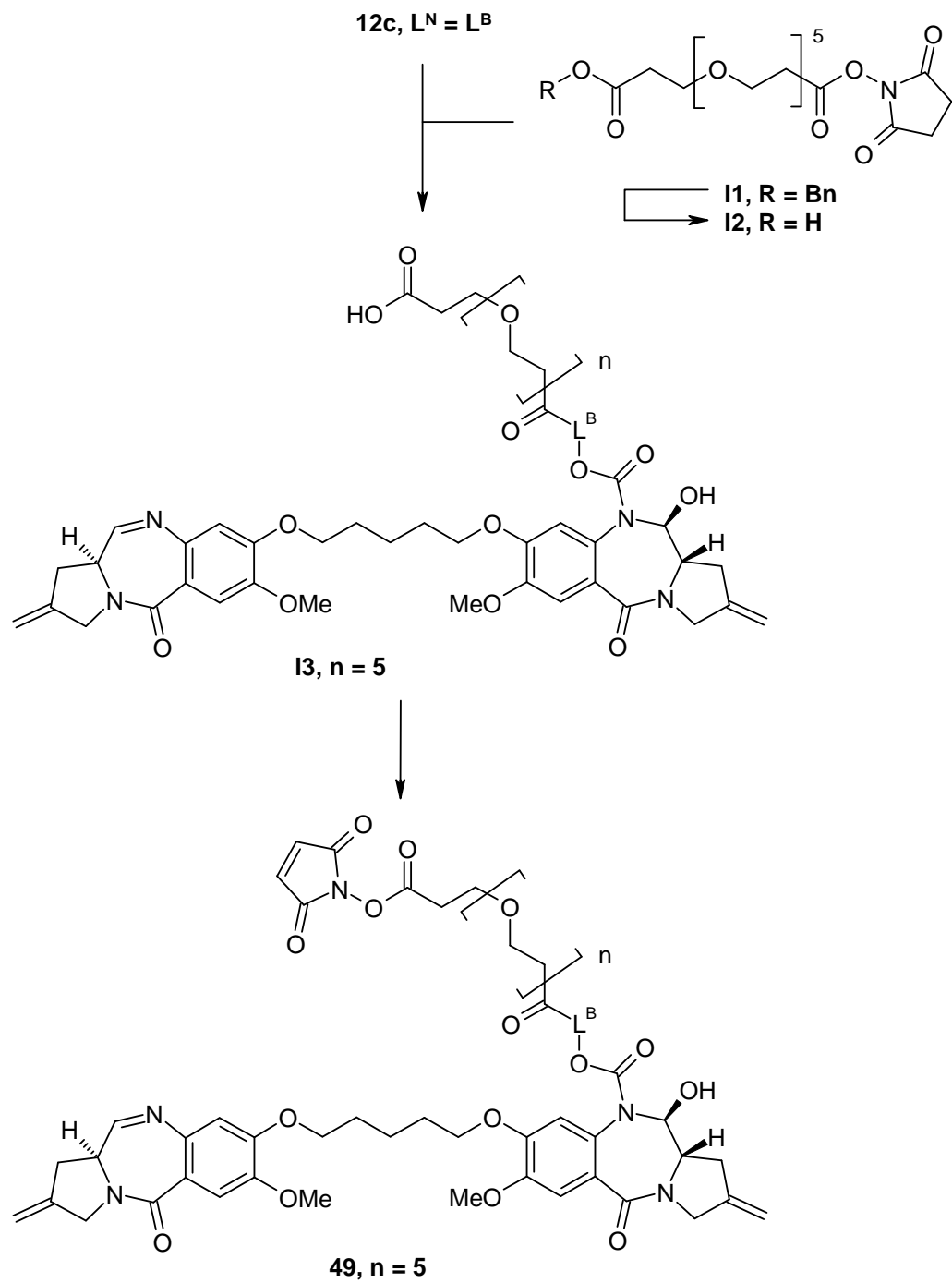
Esquema 9.



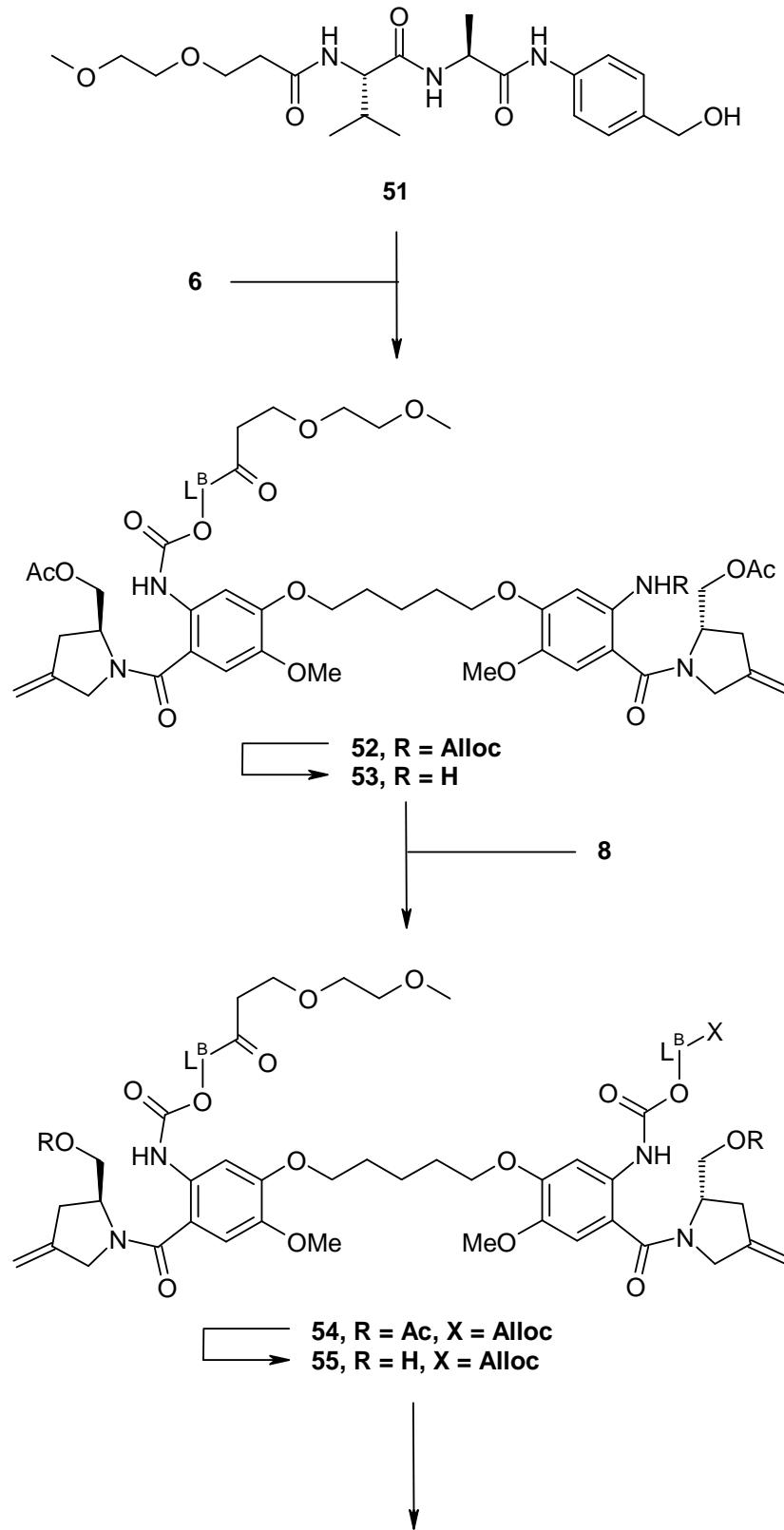


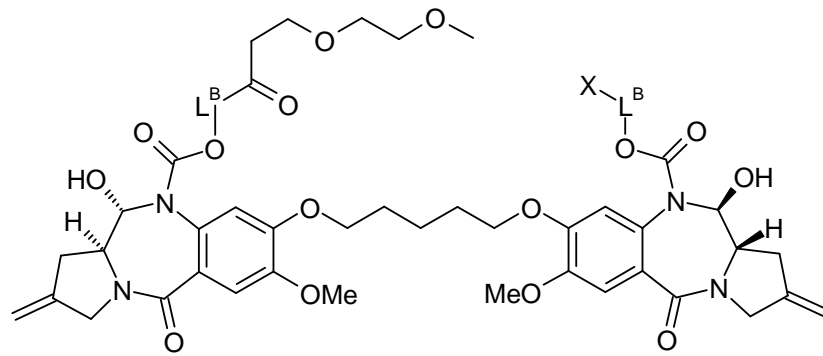


Esquema 10.

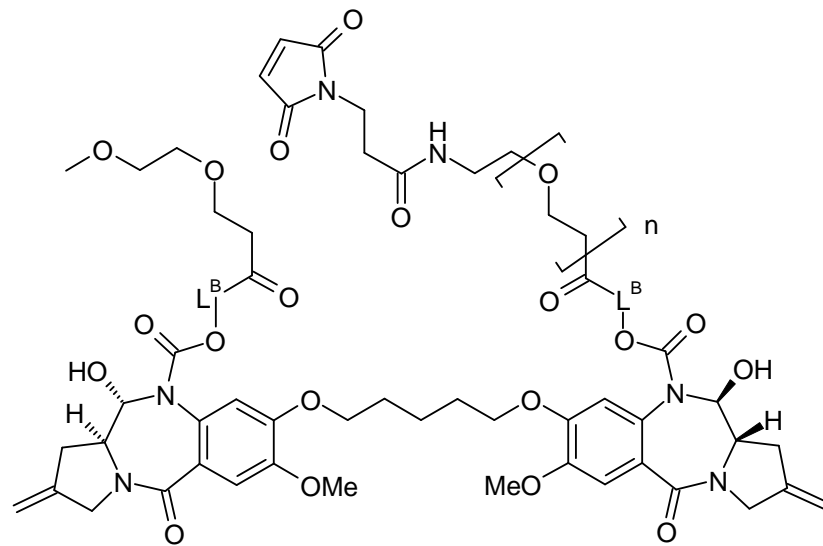


Esquema 11.





$\xrightarrow{\quad}$ **56, X = Alloc**
 $\xrightarrow{\quad}$ **57, X = H**



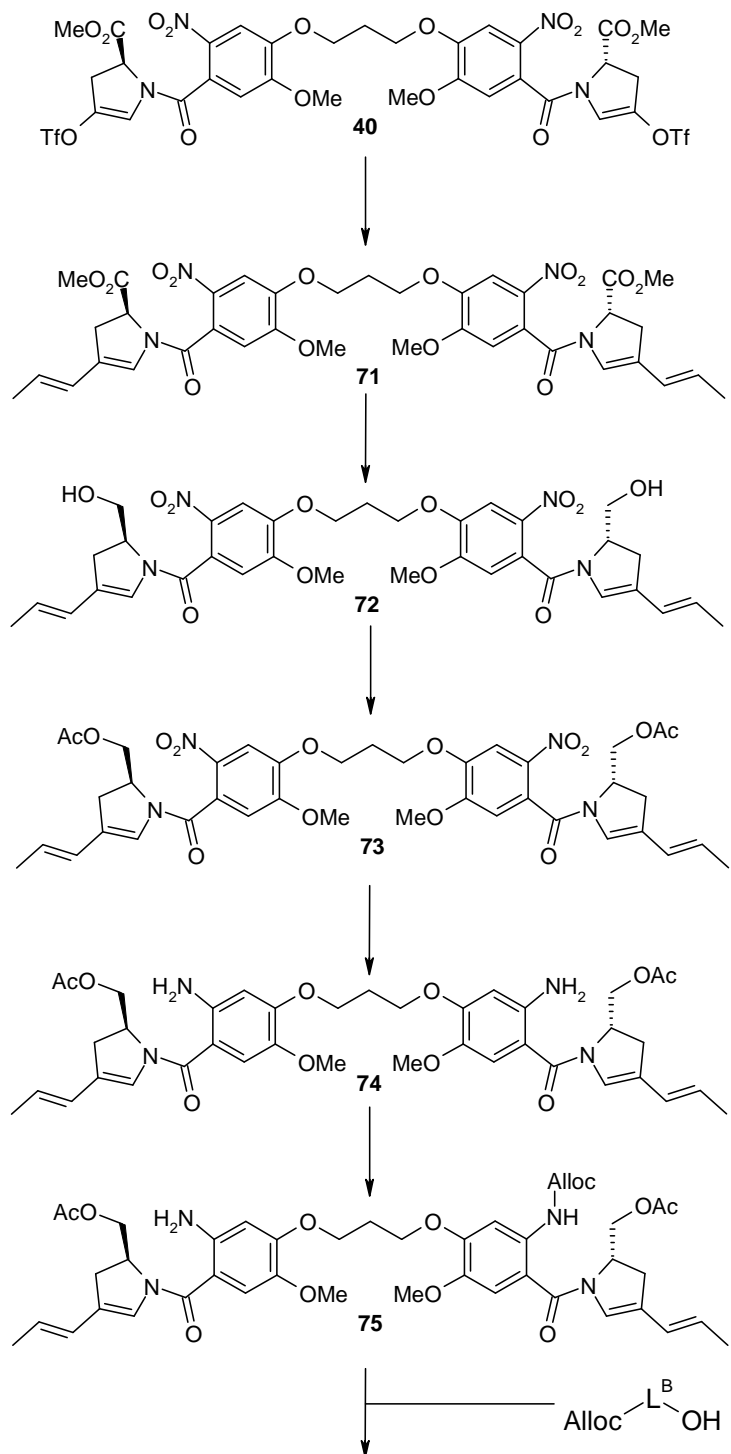
58, n = 8

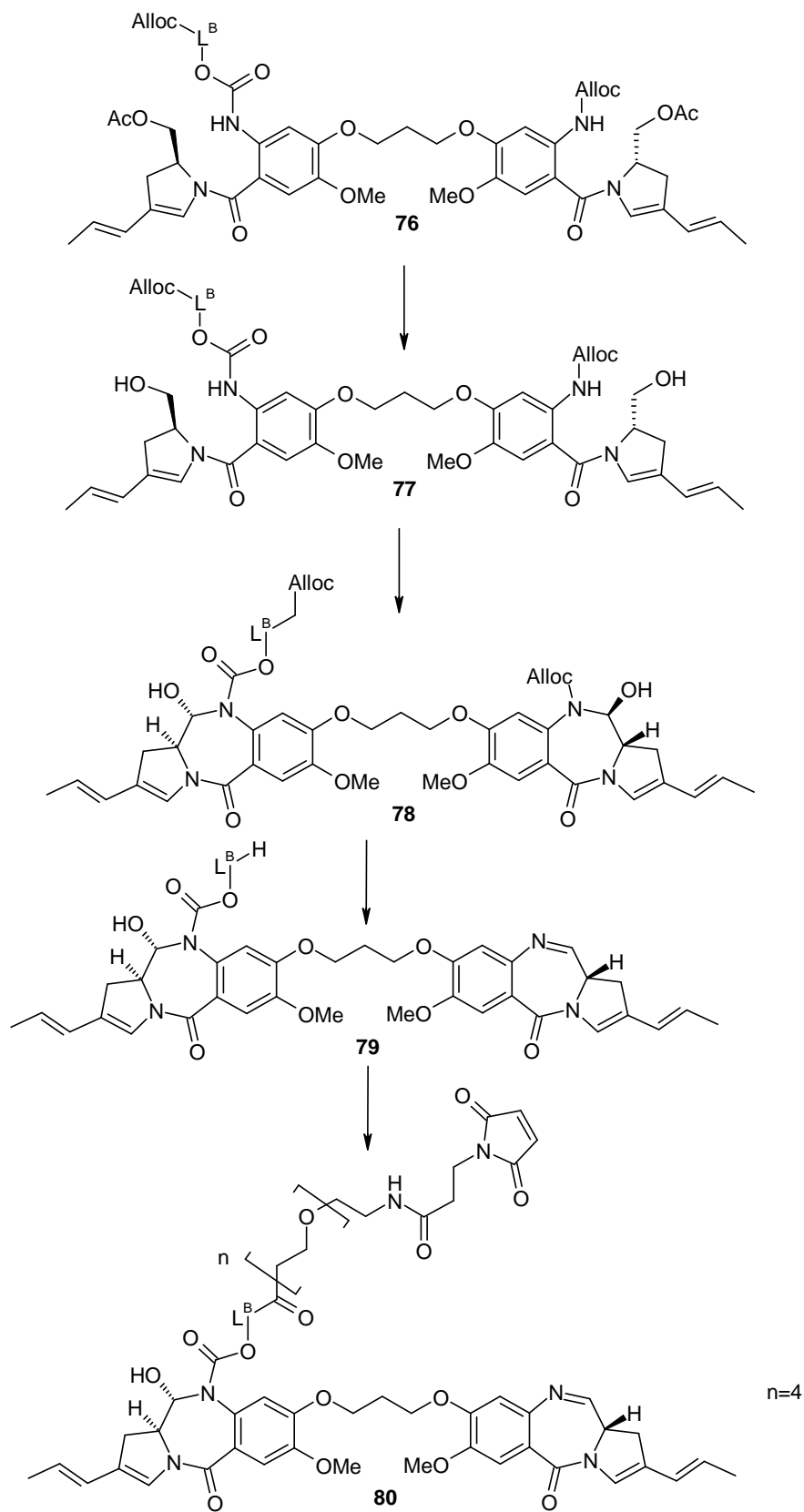
61, n = 24



60

Esquema 15.





A continuación, la invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos no limitante. Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de es éstas.

5

Ejemplos

Información general

El progreso de reacción se controló por cromatografía de capa fina (TLC) usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254, con indicador de fluorescencia sobre placas de aluminio. La visualización de TLC se consiguió con luz UV o vapor de yodo a menos que se indique otra cosa. La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254. Los disolventes de extracción y cromatografía se adquirieron y se usaron sin purificación adicional de Fisher Scientific, U.K. Todos los productos químicos se adquirieron de Aldrich Lancaster o BDH.

Las condiciones de CL/EM fueron como se indica a continuación: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1%) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1%). Gradiente: composición inicial B al 5% durante 1,0 min, después B del 5% al 95% B en 3 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min a B al 95% y después se devolvió a B al 5% en 0,3 minutos. Tiempo de operación de gradiente total igual a 5 min. Caudal 3,0 ml/min, se separaron 400 µl mediante una pieza con forma de T de un volumen muerto de cero que se pasó a través del espectrómetro de masas. Intervalo de longitud de onda de detección: 220 a 400 nm. Tipo de función: diodos alineados (535 exploraciones). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

Se usó el siguiente procedimiento de HPLC semi-preparativa: se realizó cromatografía líquida de alta resolución y fase inversa (HPLC) en columnas Zorbax Eclipse XDB C-18 de las siguientes dimensiones: 150 x 4,6 mm para análisis y 250 x 9,4 mm para trabajo preparativo. Todos los experimentos de HPLC se realizaron con condiciones de gradiente: composición inicial fija de B al 0,5% a B al 50% durante 20 min, detención durante 5 min a B al 50%, después de B al 50% a B al 100% en 2 min, detención durante 3 min a B al 100%, devolución a B al 5% en 2 min y detención durante 3 min. La duración total de la operación de gradiente fue de 35 min. Los eluyentes usados fueron, disolvente A (H₂O con TFA al 0,02%) y disolvente B (CH₃CN con TFA al 0,02%). Los caudales que se usaron fueron 1,20 ml/min para analítica y 5,00 ml/min para HPLC preparativa.

Compuesto 2 - Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio

El compuesto 2 también se describe para su uso en el documento WO 2007/085930 en la preparación de compuestos de PBD.

El compuesto 2 puede prepararse a partir de *trans*-4-hidroxi-prolina como se describe en el documento

WO 2007/085930, que se incorpora por referencia por la presente. En particular, el Ejemplo 13, que describe la preparación de la sal TFA del compuesto 2, es particularmente relevante.

Como alternativa, el compuesto 2 puede prepararse a partir del compuesto 1 como se describe a continuación.

4-metilenpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-1-*tert*-butil-2-metilo

Se añadió carbonato potásico (19,92 g, 14 mmol, 3 equiv.) a una solución agitada del compuesto 1 (10,92 g, 48 mmol, 1 equiv.) en DMF (270 ml). La suspensión de color blanco resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, momento en el que se añadió yodometano (21,48 g/9,5 ml, 151 mmol, 3,15 equiv.). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. La DMF se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, proporcionando un residuo de color amarillo que se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron sobre sulfato de magnesio. El acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida [n-hexano al 85%/acetato de etilo al 15%], proporcionando el producto en forma de un aceite incoloro (véase también F Manfré y col., *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2060-2065).

Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio

Se añadió una solución de ácido clorhídrico en dioxano (4 M, 63 ml, 254,4 mmol, 4,5 equiv.) a 4-metilenpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-1-*tert*-butil 2-metilo (13,67 g, 56,6 mmol, 1 equiv.) a temperatura ambiente. Se observó la efervescencia lo que indicaba la liberación de CO₂ y la eliminación del grupo Boc. El producto precipitó en forma de un sólido de color blanco, se añadió más cantidad de dioxano para facilitar la agitación, la mezcla de reacción se dejó en agitación durante un ahora y después se diluyó con éter. El producto precipitado se recogió por filtración al vacío y se lavó con más cantidad de éter. El secado al aire proporcionó el producto deseado 2 en forma de un polvo de color blanco (9,42 g, 94%) (véase también P Herdwijn y col., *Canadian Journal of Chemistry.* **1982**, *60*, 2903-7).

Compuesto 3

El compuesto 3 puede prepararse como se describe en el documento WO 2006/111759 y Gregson y col.

Compuesto 4

El compuesto **4** puede prepararse a partir del compuesto **3** y el compuesto **2**.

Se añadió una cantidad catalítica de DMF anhidra (0,5 ml) a una suspensión agitada de cloruro de oxalilo (9,1 g, 6,25 ml, 71,7 mmol, 3 equiv.) y el compuesto **3** (11,82 g, 23,9 mmol, 1 equiv.) en DCM anhidro (180 ml) a temperatura ambiente. Se observó una efervescencia vigorosa después de la adición de DMF y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 18 h en un matraz de fondo redondo equipado con un tubo de secado de cloruro cálcico. La solución transparente resultante se evaporó a presión reducida y el sólido se trituró con éter. El producto sólido se recogió por filtración al vacío, se lavó con más cantidad de éter y se secó al vacío a 40 °C durante 1,5 horas. Después, este sólido se añadió en porciones a una suspensión del compuesto **2** (9,35 g, 52,6 mmol, 2,2 equiv.) en TEA (12,08 g, 119,6 mmol, 5 equiv.) y DCM seco (110 ml), manteniendo la temperatura entre -40 °C y -50 °C con la ayuda de un baño de hielo seco/acetonitrilo. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -40 °C durante 1 hora y después se dejó calentar a temperatura ambiente, momento en el que el análisis por CLEM indicó el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con más cantidad de DCM, se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico acuoso (1 M, 2 x 200 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 250 ml), agua (250 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (250 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El DCM se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, proporcionando el producto en forma de una espuma de color amarillo (13,94 g, 79%). Datos Analíticos: TR 3,95 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 741 ([*M* + 1]⁺, 100).

20 *Compuesto 5*

El compuesto **5** puede prepararse a partir del compuesto **4** en tres etapas a través del bis-alcohol y el bis-acetato.

bis-Alcohol

Se añadió en una porción borohidruro de litio sólido (0,093 g, 4,3 mmol, 3 equiv.) a una solución de éster **4** (1,05 g, 142 mmol, 1 equiv.) en THF seco (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C (baño de hielo). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0 °C durante 30 min y después se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, momento en el que se observó la precipitación de una goma de color naranja. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas más, después se enfrió en un baño de hielo y se trató con agua (20 ml), dando una suspensión de color amarillo. Se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico (1 M) (efervescencia vigorosa) hasta que la efervescencia se detuvo. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (4 x 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se eliminó el acetato de etilo por evaporación rotatoria a presión reducida, produciendo el producto de *bis*-alcohol en forma de una espuma de color amarillo (0,96 g, 99%). La reacción se repitió en una escala de 12,4 g, produciendo 11,06 g de producto (96%). Datos Analíticos: TR 3,37 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 685 ([*M* + 1]⁺, 100).

bis-Acetato

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de acetilo (3,4 g/3,1 ml, 43,5 mmol, 2,6 equiv.) en DCM seco (100 ml) a una solución agitada del *bis*-alcohol (11,46 g, 16,73 mmol, 1 equiv.) y trietilamina (5,07 g, 6,98 ml, 50,2 mmol, 3 equiv.) en DCM seco (200 ml) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y la agitación continuó durante una hora. El análisis por TLC y por CLEM reveló que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La eliminación de DCM por evaporación rotatoria a presión reducida dio el producto en bruto. El análisis por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de *n*-hexano al 20%/acetato de etilo al 80% a *n*-hexano al 10%/acetato de etilo al 90%] proporcionó *bis*-acetato puro en forma de una espuma de color amarillo (10,8 g, 84%). Datos Analíticos: TR 3,35 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 769 ([*M* + 1]⁺, 100).

50 *Compuesto 5*

Se añadió polvo de zinc (14,2 g, 2,17 mmol, 30 equiv.) a una solución del *bis*-acetato (5,56 g, 7,24 mmol, 1 equiv.) en etanol (250 ml) y ácido acético (65 ml). La mezcla de reacción agitada se calentó a reflujo, convirtiéndose la solución de color amarillo en incolora (también se observó agregación de zinc haciendo difícil agitar la reacción). La reacción se dejó continuar durante una hora, momento en el que el análisis por CLEM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se filtró a través de celite y la capa de filtró se lavó con DCM. El filtrado se lavó con agua (3 x 500 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 250 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (500 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida produjo el producto **5** en forma de una espuma de color blanquecino (4,71 g, 92%). Datos Analíticos: TR 3,33 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 709 ([*M* + 1]⁺, 100).

Compuesto 6

65 El compuesto **6** puede prepararse a partir del compuesto **5** en tres etapas.

Producto mono-Alloc

Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de alilo (0,634 g/0,56 ml, 5,6 mmol, 0,9 equiv.) en DCM seco (150 ml) a una solución del compuesto **5** (4,145 g, 5,8 mmol, 1 equiv.) y piridina (0,106 g/0,11 ml, 11,1 mmol, 1,9 equiv.) en DCM seco (500 ml) a -78 °C (baño de hielo seco/acetona). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora y después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con una solución acuosa saturada de sulfato de cobre (2 x 300 ml), agua (400 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (400 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto en bruto en forma de una espuma de color oscuro. La purificación por cromatografía ultrarrápida [n-hexano al 40%/acetato de etilo al 60% a metanol al 5%/acetato de etilo al 95%] dio el producto *bis*-alloc (0,84 g), el producto mono-alloc deseado (1,94 g, 44%) y la *bis*-anilina recuperada (0,81 g).

Datos Analíticos: TR 3,32 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 793 ([*M* + 1]⁺, 100); EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 791 ([*M* - 1]⁻, 100).

Isocianato

Se añadió trietilamina (0,018 g/25 µl, 0,18 mmol, 1,35 equiv.) a una solución agitada del producto mono-alloc (0,106 g, 0,134 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (0,015 g, 4,8 x 10⁻² mmol, 0,36 equiv.) en tolueno seco (5 ml) en una atmósfera de nitrógeno a -10 °C. Después de 1 hora, la espectroscopía por IR reveló un tramo de isocianato a 2268 cm⁻¹ y la mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente.

Compuesto **6**

Se añadió gota a gota una solución del alcohol **6a** (0,106 g, 0,15 mmol, 1,1 equiv.) y trietilamina (0,018 g, 25 µl, 0,18 mmol, 1,35 equiv.) en THF seco (5 ml) al isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas, momento en el que el análisis por TLC la formación de un nuevo producto. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se repartió entre DCM y agua. La fase acuosa se separó y la fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de n-hexano al 40%/acetato de etilo al 60% a n-hexano al 20%/acetato de etilo al 80%, con aumentos del 5% en acetato de etilo], proporcionando el producto deseado en forma de una espuma de color blanco (0,092 g, rendimiento del 45%).

Datos Analíticos: TR 4,05 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1540 ([*M* + 2]⁺, 30); 1557 ([*M* + 18]⁺, 50); EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1585 ([*M* - +2Na]⁻, 50).

Compuesto **7**

El compuesto **7** puede prepararse a partir del compuesto **6** en dos etapas.

Producto *bis* desacetilado

Se añadió gota a gota a través de una jeringa una solución de superhydride™ en THF (1 M, 0,35 ml, 0,35 mmol, 4 equiv.) a una solución agitada del acetato **6** (0,135 g, 8,8 x 10⁻² mmol, 1 equiv.) en THF seco (7 ml) a -78 °C (hielo seco/acetona). La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78 °C durante una hora, momento en el que el análisis por CLEM reveló la ausencia de material de partida y la formación de dos nuevos compuestos que correspondían al producto mono y *bis* desacetilado. A la mezcla de reacción se le añadió una alícuota más de superhydride™ (1 M, 0,35 ml, 0,35 mmol, 4 equiv.) y la agitación continuó durante una hora más. El análisis por CLEM en este momento reveló la conversión completa en el producto *bis* desacetilado. Se añadió ácido cítrico (1 M, 1 ml) a la mezcla de reacción (efervescencia vigorosa) que después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, momento en el que se añadió una alícuota más de ácido cítrico (1 M, 1 ml). El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo resultante se repartió entre acetato de etilo (25 ml) y agua (25 ml). La fase acuosa se separó y la fase de acetato de etilo se lavó con agua (25 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (25 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La eliminación del disolvente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se sometió a cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de acetato de etilo → metanol al 1%/acetato de etilo al 99% a metanol al 2%/acetato de etilo al 98%], proporcionando el producto puro en forma de un vidrio incoloro (0,056 g, 44%). Datos Analíticos: TR 3,78 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1456 ([*M* + 1]⁺, 75).

Compuesto **7**

Se añadió en una porción peryodinano de Dess-Martin (0,026g, 6,1 x 10⁻⁵ mol, 2,1 equiv.) a una solución del producto *bis* desacetilado (0,042 g, 2,9 x 10⁻⁵ mol, 1 equiv.) en DCM seco (5 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, momento en el que el análisis por indicó que la reacción se había completado. La suspensión turbia se filtró mediante lavado con DCM (20 ml). El filtrado se lavó con una

solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (25 ml), agua (25 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (25 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto **7** en forma de una espuma de color blanquecino (0,035 g, 84%). Datos Analíticos: TR 3,70 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1451 ([*M* + 1]⁺, 30).

Compuesto 14

El compuesto **14a** o **14b** puede prepararse a partir del compuesto **7** a través del compuesto **8**. El producto protector alloc en el compuesto **7** puede eliminarse en las condiciones apropiadas, por ejemplo, *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) en presencia de pirrolidina. En estas condiciones, el grupo protector Fmoc también se elimina. Como alternativa, el grupo Fmoc puede eliminarse en una etapa separada, antes o después de la eliminación del grupo Alloc, usando piperidina en DMF. El producto de la etapa de desprotección es un producto de imina-carbinolamina que tiene funcionalidad imina en la posición N10-C11 de un monómero de PBD, y una funcionalidad carbinolamina en la posición N10-C11 del otro monómero, en el que la carbinolamina tiene un enlazador -C(=O)-L¹-NH₂ en la posición N10.

La imina-carbinolamina puede hacerse reaccionar con MC-OSu en presencia de base para generar el compuesto **8**. Véase, por ejemplo, Dubowchik y col., *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 855-869.

Después, el grupo protector de la cadena lateral aminoácida puede eliminarse del compuesto **8**, por ejemplo, en condiciones ácidas. Después, el producto resultante puede conjugarse con un anticuerpo apropiado que tiene funcionalidad tiol, dando el compuesto **9**.

En un ejemplo, un anticuerpo puede tratarse con DTT para reducir los enlaces de disulfuro intercatenarios. Después, el anticuerpo resultante, que tiene grupos tiol libres, puede hacerse reaccionar con un compuesto que contiene maleimida obtenido a partir del compuesto **8** para generar el compuesto **9**. El compuesto **9** puede purificarse, por ejemplo, mediante diafiltración. Véase, por ejemplo, Dubowchik y col., *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 855-869.

Compuesto 18

Se añadió dicitclohexilcarbodiimida (2,46 g, 11,92 mmol, 1,05 equiv.) a una suspensión de N-hidroxisuccinimida (1,44 g, 12,5 mmol, 1,1 equiv.) y N-alloc fenilalanina (**17**) (2,83 g, 11,35 mmol, 1 equiv.) en DCM seco (120 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y después a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en DCM (50 ml), se dejó en reposo durante 1 h y se filtró para eliminar la dicitclohexilurea precipitada. La evaporación a presión reducida dio el producto en forma de un sólido de color blanco (3,91 g, 99%). Datos Analíticos: TR 2,93 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 369 ([*M* + Na]⁺, 50).

Compuesto 20

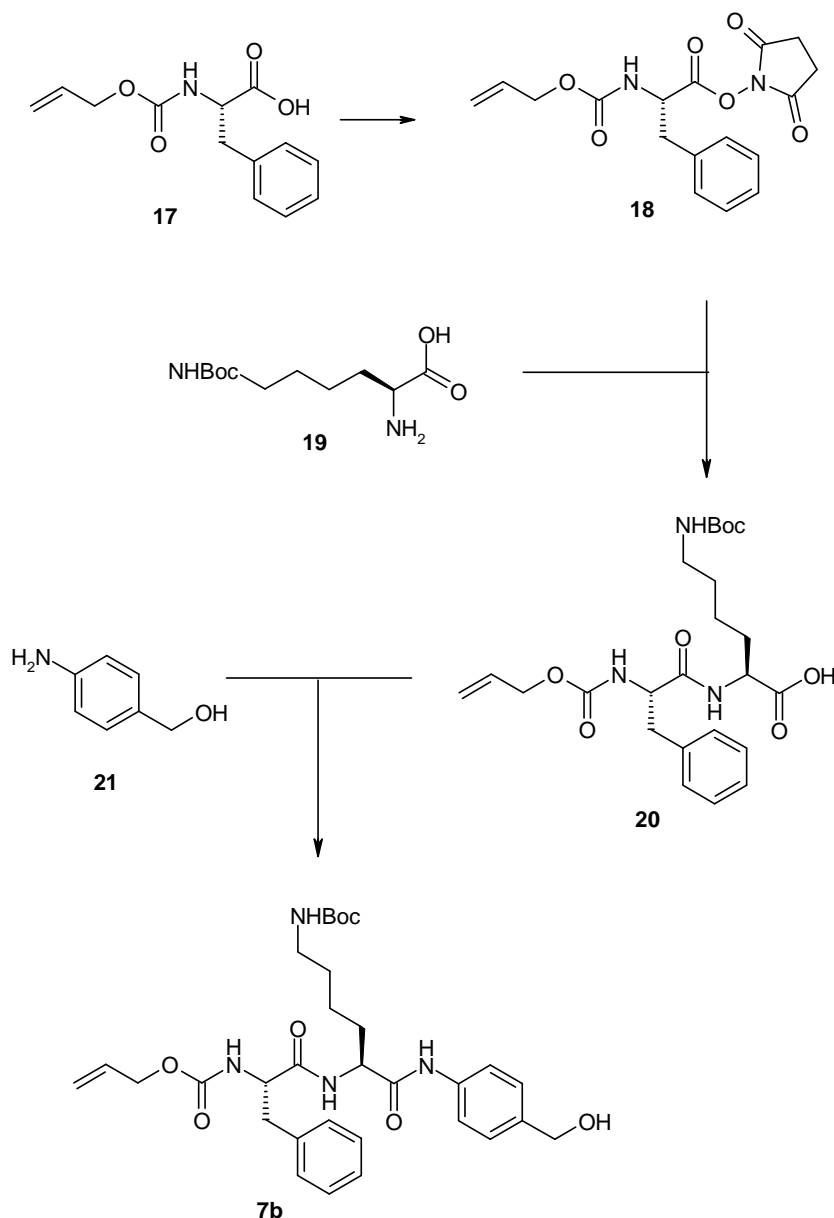
Se añadió una solución de succinimida (**18**) (3,91 g, 11,29 mmol, 1 equiv.) en THF (50 ml) a una solución de H-Lys(Boc)-OH (**19**) (2,92 g, 11,85 mmol, 1,05 equiv.) y NaHCO₃ (1,04 g, 12,42 mmol, 1,1 equiv.) en THF (50 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h y el THF se evaporó a presión reducida. El pH se ajustó a pH 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma de color blanco. Esta se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto en forma de una espuma de color blanco (4,89 g, 91%). Datos Analíticos: TR 3,03 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 478 ([*M* + 1]⁺, 80).

Compuesto 7b

Se añadió EEDQ (2,66 g, 10,75 mmol, 1,05 equiv.) a una solución de *p*-aminobencil alcohol (**21**) (1,32 g, 10,75 mmol, 1,05 equiv.) y Alloc-Phe-Lys(Boc)-OH (4,89 g, 10,24 mmol, 1,0 equiv.) en THF seco (75 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El disolvente se evaporó a presión reducida, dando un sólido de color pardo pálido. El sólido se trituró con éter dietílico y se filtró mediante lavado con un exceso de éter dietílico. Esto proporcionó el producto en forma de un sólido de color blanco (4,54 g, 76%). Datos Analíticos: TR 3,08 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 583,8 ([*M* + 1]⁺, 100).

La síntesis de 7b se describe a continuación en el Esquema 12.

Esquema 12.

**Compuesto 9b**

5 Se añadió trietilamina (0,18 g, 0,25 ml, 1,79 mmol, 2,3 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-alloc protegida (**6**) (0,608 g, 0,77 mmol, 1,06 equiv.) y trifosgeno (0,088 g, 0,3 mmol, 0,39 equiv.) en THF seco (5 ml) en una atmósfera de nitrógeno a -10 °C. La mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, una muestra se trató con metanol, y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo.

10 Al isocianato recién preparado se le añadió gota a gota una solución del alcohol bencílico (**7b**) (0,422 g, 0,72 mmol, 1,0 equiv.) y trietilamina (0,18 g, 0,25 ml, 1,79 mmol, 2,3 equiv.) en THF seco (20 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60-65 °C durante 4 horas y después se dejó en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, momento en el que el análisis por CLEM reveló la formación de un nuevo producto. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de *n*-hexano al 50%/acetato de etilo al 50% a *n*-hexano al 10%/acetato de etilo al 90% en aumentos del 10%], dando el producto deseado en forma de una espuma de color blanco (0,385 g, 38%). Datos Analíticos: TR 3,78 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1402,8 ([*M* + H]⁺, 15).

15

Compuesto 10b

20 Se añadió una solución de K₂CO₃ (0,158 g, 1,15 mmol, 5 equiv.) en H₂O (1 ml) a una solución del acetato (**9b**) (0,32 g, 0,23 mmol, 1 equiv.) en metanol (6 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El metanol se evaporó a presión reducida, el residuo se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 75

ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con H₂O (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto en forma de una espuma de color blanco (0,292 g, 97%). Datos Analíticos: TR 3,52 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1318,6 ([*M* + 1]⁺, 15).

5

Compuesto 11b

Se añadió en una porción peryodinano de Dess-Martin (0,197 g, 0,465 mmol, 2,1 equiv.) a una solución del producto *bis* desacetilado (**10b**) (0,292 g, 0,22 mmol, 1 equiv.) en DCM seco (15 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h, momento en el que el análisis por CLEM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (3 x 100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de acetato de etilo al 80%/n-hexano al 20% a acetato de etilo al 100% en aumentos del 5%] dio el producto **11b** en forma de una espuma de color amarillo (0,235 g, 81%). Datos Analíticos: TR 3,42 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1314,8 ([*M* + 1]⁺, 8).

10

15

Compuesto 12a

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (4 mg, 3,5 x 10⁻⁶ mol, 0,02 equiv.) a una solución del compuesto *bis*-alloc (**11b**) (0,230 g, 0,175 mmol, 1 equiv.) y pirrolidina (31 mg, 36 µl, 0,44 mmol, 2,5 equiv.) en DCM seco (10 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, momento en el que el análisis por CLEM indicó que quedaba (**11b**) sin reaccionar. Se añadieron más equivalentes de pirrolidina (31 mg, 36 µl, 0,44 mmol, 2,5 equiv.) y Pd(PPh₃)₄ (4 mg, 3,5 x 10⁻⁶ mol, 0,02 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h más. El análisis por CLEM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida, dando una espuma de color amarillo. Esto se trituró con éter dietílico, dando el producto (0,187 g, 95%) que se usó sin purificación adicional. Datos Analíticos: TR 2,80 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1128,5 ([*M* + 1]⁺, 20).

20

25

30

Compuesto 23

Se añadió una solución de Alloc-Val-OSu (**22**) (RT 2,67 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 321,4 ([*M* + Na]⁺, 57) preparada de acuerdo con el procedimiento para la preparación del compuesto (**16**)) (11,67 g, 39,0 mmol, 1 equiv.) en THF (50 ml) a una solución de H-Ala-OH (3,66 g, 41,08 mmol, 1,05 equiv.) y NaHCO₃ (3,61 g, 43,03 mmol, 1,1 equiv.) en THF (100 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas y el THF se evaporó a presión reducida. El pH se ajustó a pH 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma de color blanco. Esta se extrajo con acetato de etilo (6 x 150 ml) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando un sólido de color blanco. La trituración con éter dietílico (exceso) proporcionó el producto puro **23** en forma de un polvo de color blanco (7,93 g, 74%).

35

40

Datos Analíticos: TR 2,17 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 295 ([*M* + Na]⁺, 63), 273 ([*M* + 1]⁺, 60).

45

Compuesto 8

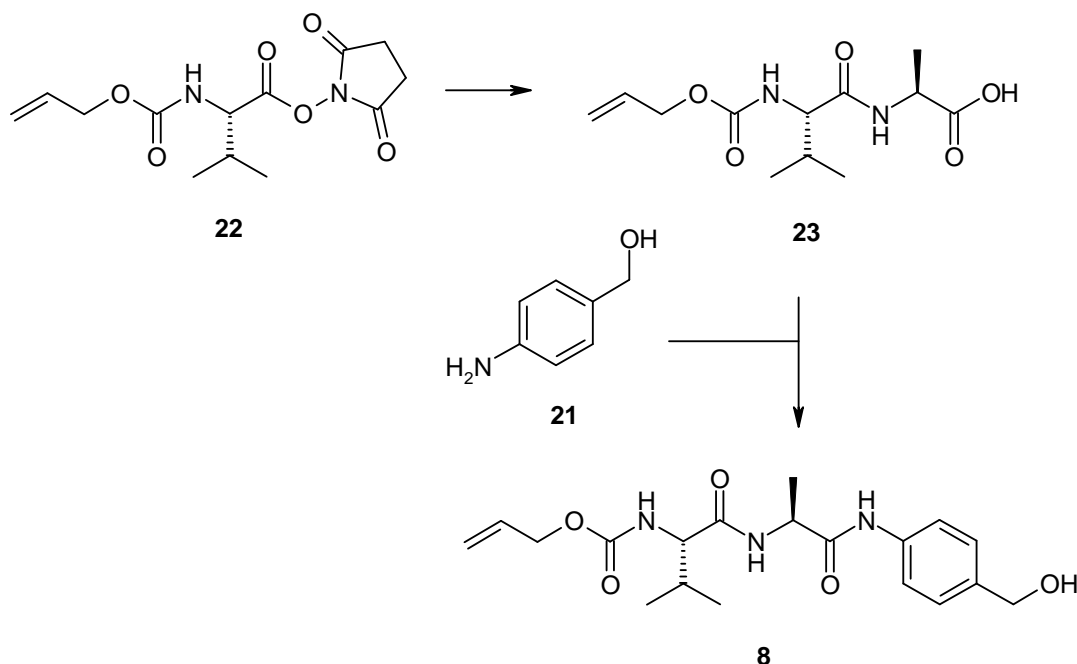
Se añadió EEDQ (4,79 g, 19,3 mmol, 1,05 equiv.) a una solución de *p*-aminobencil alcohol (**21**) (2,38 g, 19,3 mmol, 1,05 equiv.) y Alloc-Val-Ala-OH (5,02 g, 18,4 mmol, 1,0 equiv.) en THF seco (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, dando un sólido de color pardo pálido. El sólido se trituró con éter dietílico y se filtró, mediante lavado con un exceso de éter dietílico. Esto proporcionó el producto en forma de un sólido de color blanco (6,2 g, 89%). Datos Analíticos: TR 2,50 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 400,6 ([*M* + Na]⁺, 50), 378,6 ([*M* + 1]⁺, 60).

50

55

La síntesis de **8** se muestra a continuación en el Esquema 13.

Esquema 13.

**Compuesto 9c**

5 Se añadió trietilamina (0,16 g, 0,22 ml 1,59 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-alloc protegida (**6**) (0,572 g, 0,72 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (0,077 g, 0,26 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (20 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, una muestra se trató con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo.

10 A isocianato recién preparado se le añadió gota a gota una solución del alcohol bencílico (**8**) (0,4 g, 1,06 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,109 g, 0,15 ml, 1,08 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (20 ml). La mezcla de reacción se controló por CLEM en intervalos de 30 min. Después de 3 h, el análisis por CLEM mostró la conversión en el producto, la presencia de carbamato de metilo y *bis*-anilina mono-alloc protegida (**6**). Se añadió una porción más de trifosgeno (0,038 g, 0,128 mmol, 0,18 equiv.) y la reacción continuó a 40 °C durante 18 h más. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 97%/metanol al 3% en aumentos del 0,5%], dando el producto deseado en forma de una espuma de color blanco (0,59 g, 69%).
 15 Datos Analíticos: TR 3,58 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1197 ([*M* + 1]⁺, 60).

Compuesto 10c

20 Se añadió una solución de K₂CO₃ (0,195 g, 1,41 mmol, 5 equiv.) en H₂O (1,4 ml) a una solución del acetato (**9c**) (0,338 g, 0,282 mmol, 1 equiv.) en metanol (8,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El metanol se evaporó a presión reducida, el residuo se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con H₂O (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto en forma de una espuma de color blanco (0,298 g, 95%). Datos Analíticos: TR 3,28 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1113 ([*M* + 1]⁺, 40).

Compuesto 11c

30 Se añadió en una porción peryodinano de Dess-Martin (0,312 g, 0,74 mmol, 2,1 equiv.) a una solución del producto *bis* desacetilado (**10c**) (0,39 g, 0,35 mmol 1 equiv.) en DCM seco (20 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h, momento en el que el análisis por CLEM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (3 x 100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secó (MgSO₄). El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 97%/metanol al 3% en aumentos del 1%] dio el producto en forma de un sólido de color blanco (0,201 g, 52%).
 35 Datos Analíticos: TR 3,15 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1109 ([*M* + 1]⁺, 30), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1107 ([*M* - 1]⁻, 100).

Compuesto 12c

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (8 mg, 7 x 10⁻⁶ mol 0,04 equiv.) a una solución del compuesto *bis*-alloc (**11c**) (0,190 g, 0,17 mmol, 1,0 equiv.) y pirrolidina (61 mg, 71 µl, 0,86 mmol, 5,0 equiv.) en DCM seco (5 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, dando una suspensión turbia. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se trituró con acetato de etilo, dando un sólido de color blanquecino que se recogió por filtración, dando el producto (0,13 g, 82%) que se usó sin purificación adicional. Datos Analíticos: TR 2,55 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 922 ([*M* + 1]⁺, 52).

Compuesto **13a**

Se añadió EEDQ (18,4 mg, 7,45 x 10⁻⁵ mol, 2,2 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**12a**) (40 mg 3,5 x 10⁻⁵ mol, 1,0 equiv.) y ácido maleimida caproico (8,2 mg, 3,9 x 10⁻⁵ mol 1,1 equiv.) en DCM (2 ml) y metanol (1 ml). La solución se agitó a 40 °C durante 72 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM (50 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 x 50 ml), H₂O (50 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida, dando una espuma de color blanco. Esto se trituró con éter dietílico y se filtró mediante lavado con un exceso de éter dietílico, proporcionando el producto en forma de un sólido de color blanco (36 mg, 78%). Datos Analíticos: TR 3,27 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1320 ([*M* + 1]⁺, 75).

Compuesto **13b**

Se añadió ácido trifluoroacético frío (13 ml) al derivado de maleimida (**13a**) (65 mg, 4,9 x 10⁻⁵ mol) a 0 °C. La solución se agitó a esta temperatura durante 30 min y el ácido trifluoroacético se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en DCM anhidro (5 ml). El disolvente se evaporó, el residuo se trituró con éter dietílico, el sólido de color amarillo resultante se recogió por filtración y se secó al vacío (64 mg, 97%). Datos Analíticos: TR 2,83 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1222 ([*M* + 2]⁺, 5).

El acoplamiento de un reactivo de maleimida-PEG-succinimida con **12a** o **12b** proporciona los enlaces al fármaco PBD MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **15ba**, MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **15bb** y MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **15d**, en los que PEG es etilenoxy, y PAB es *para*-aminobenciloxycarbonilo.

Compuesto **15aa**

El dipéptido de amina (**12a**) (83 mg, 7,4 x 10⁻⁵ mol, 1 equiv.) se disolvió en una mezcla de DMF seca al 10%/DCM (2 ml) y se añadió maleimida-4Peg-succinimida (353 µl de una solución 250 mmol en DCM seco) seguida de N,N-diisopropiletilamina (8,2 mg, 11 µl, 8,1 x 10⁻⁵ mol, 1,1 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 h en una atmósfera de nitrógeno. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 92%/metanol al 8% en aumentos del 1%] proporcionó el producto en forma de una espuma de color amarillo (85 mg, 76%). Datos Analíticos: TR 3,13 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1526 ([*M* + 1]⁺, 5).

Compuesto **15ab**

El dipéptido de amina (**12a**) (70 mg, 76,2 x 10⁻⁵ mol, 1 equiv.) se disolvió en una mezcla de DMF seca al 10%/DCM (2 ml) y se añadió maleimida-8Peg-succinimida (263 µl de una solución 250 mmol en DCM seco) seguida de NN-diisopropiletilamina (6,9 mg, 9,5 µl, 6,6 x 10⁻⁵ mol, 1,06 equiv.). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 h en una atmósfera de nitrógeno. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 92%/metanol al 8% en aumentos del 1%] proporcionó el producto en forma de una espuma de color pardo (44 mg, 41,5%). Datos Analíticos: TR 3,20 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1703 ([*M* + 2]⁺, 5).

Compuesto 15ba (MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD; 11-hidroxi-7-metoxi-8-(5-((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-2-(4-aminobutil)-5-bencil-25-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,7,23-trioxo-10,13,16,19-tetraoxa-3,6,22-triazapentacosanamido)bencilo)

Se añadió ácido trifluoroacético frío (17 ml) al derivado de maleimida (**15aa**) (85 mg, 5,6 x 10⁻⁵ mol) a 0 °C. La solución se agitó a esta temperatura durante 30 min y el ácido trifluoroacético se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en DCM anhidro (5 ml). El disolvente se evaporó, el residuo se trituró con éter dietílico, el sólido de color amarillo resultante se recogió por filtración y se secó al vacío (70 mg, 81%). Datos Analíticos: TR 2,78 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1444 ([*M* + 2]⁺, 1).

Compuesto 15bb (MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD; 11-hidroxi-7-metoxi-8-(5-((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-2-(5-aminobutil)-5-bencil-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo)

Se añadió ácido trifluoroacético frío (9 ml) al derivado de maleimida (**15ab**) (44 mg, $2,6 \times 10^{-5}$ mol) a 0 °C. La solución se agitó a esta temperatura durante 30 min y el ácido trifluoroacético se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en DCM anhidro (5 ml). El disolvente se evaporó, el residuo se trituró con éter dietílico, el sólido de color amarillo resultante se recogió por filtración y se secó al vacío (40 mg, 91%).

5

Datos Analíticos: TR 2,80 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1603 ([*M* + 2]⁺, 1).

Compuesto 15d (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD; 11-hidroxi-7-metoxi-8-(5-((*S*)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)pentiloxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-10(5*H*)-carboxilato de (1*S*,11*aS*)-4-((2*S*,5*S*)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-*il*)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)benzilo)

10

Se añadió EEDQ (12 mg, $4,8 \times 10^{-5}$ mol, 1,1 equiv.) a una suspensión del dipéptido de amina (**12c**) (40,3 mg $4,4 \times 10^{-5}$ mol, 1,0 equiv.) y maleimida-8 Peg-ácido (28 mg, $4,8 \times 10^{-5}$ mol, 1,1 equiv.) en DCM seco (5 ml). Se añadió dimetilacetamida seca (0,05 ml), dando una solución de color amarillo pálido que se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se trituró con éter dietílico. El producto sólido resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna. Datos Analíticos: TR 2,90 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1496 ([*M* + *H*]⁺, 40).

15

20 **Compuesto 15e**

Se añadió *N,N*-diisopropildietilamina (10,8 µl, 8 mg, $7,6 \times 10^{-5}$ mol, 2,2 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**12c**) (32 mg, $3,5 \times 10^{-5}$ mol, 1,0 equiv.) y maleimida-dPeg@24-NHS éster (58 mg, $4,16 \times 10^{-5}$ mol, 1,2 equiv.) en DCM seco (5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 96 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (15 ml), se lavó con NaHCO₃ saturado (25 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (25 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida, dando un vidrio de color amarillo pálido. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 91%/metanol al 9% en aumentos del 1%] dio el producto en forma de una goma viscosa de color amarillo (17 mg, 22%).

25

30 **Compuesto 16d**

Se seleccionó el péptido biotina-A20FMDV-Cys (**59**) que es altamente selectivo para la integrina α_vβ₆, que se regula de forma ascendente significativamente por muchos cánceres, para la conjugación de los derivados del enlazador PBD.

35

Se añadió una solución del péptido (**59**) (11,3 mg, 4,35 µmol, 0,98 equiv.) en 1/1 de acetonitrilo/agua (2 ml) a una solución de (**15d**) (6,91 mg, 4,62 µmol, 1,0 equiv.) en 1/1 acetonitrilo/agua (3 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 96 h. El acetonitrilo se evaporó a presión reducida y el agua se eliminó por liofilización, dando una espuma de color blanco. La purificación por HPLC semi-preparativa seguida de liofilización dio el producto en forma de una espuma de color blanco (3,8 mg, 21%). Datos Analíticos: EM (MaldiTOF) *m/z* (intensidad relativa) 3991,1 ([*M* + *H*]⁺, 100).

40

Compuesto 39a

45 El compuesto **39a** y sus síntesis se desvela en los documentos WO 00/012508 y WO 2006/111759.

Compuesto 39b

Procedimiento I: Se añadió una cantidad catalítica de DMF (2 gotas) (efervescencia) a una solución agitada del nitro-ácido **39a** (1,0 g, 2,15 mmol) y cloruro de oxalilo (0,95 ml, 1,36 g, 10,7 mmol) en THF seco (20 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó por evaporación al vacío. El residuo resultante se disolvió de nuevo en THF seco (20 ml) y la solución de cloruro de ácido se añadió gota a gota a una mezcla agitada de clorhidrato de (2*S*,4*R*)-metil-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato (859 mg, 4,73 mmol) y TEA (6,6 ml, 4,79 g, 47,3 mmol) en THF (10 ml) a -30 °C (hielo seco/etilenglicol) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas más, después de lo cual el análisis por TLC (95:5 v/v de CHCl₃/MeOH) y CL/EM (2,45 min (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 721 ([*M* + *H*]⁺, 20)) revelaron la formación de producto. El exceso de THF se eliminó por evaporación rotatoria y el residuo resultante se disolvió en DCM (50 ml). La fase orgánica se lavó con HCl 1 N (2 x 15 ml), NaHCO₃ saturado (2 x 15 ml), H₂O (20 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (30 ml) y se secó (MgSO₄). La filtración y la evaporación del disolvente dieron el producto en bruto en forma de un aceite de color oscuro. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: CHCl₃ al 100% a 96:4 v/v de CHCl₃/MeOH) aisló la amida pura **39b** en forma de un vidrio de color naranja (840 mg, 54%).

55

60

Procedimiento II: Se añadió cloruro de oxalilo (9,75 ml, 14,2 g, 111 mmol) a una suspensión agitada del nitro-ácido **39a** (17,3 g, 37,1 mmol) y DMF (2 ml) en DCM anhidro (200 ml). Tras la efervescencia inicial, la suspensión de la reacción se convirtió en una solución y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. La

65

conversión en el cloruro de ácido se confirmó tratando una muestra de la mezcla de reacción con MeOH, y el éster bis-metilico resultante se observó por CL/EM. La mayor parte del disolvente se eliminó por evaporación al vacío, la solución concentrada resultante se disolvió de nuevo en una cantidad mínima de DCM seco y se trituró con éter dietílico. El precipitado de color amarillo resultante se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico frío y se secó durante 1 hora en una estufa de vacío a 40 °C. El cloruro de ácido sólido se añadió en porciones durante un periodo de 25 minutos a una suspensión agitada de clorhidrato de (2*S*,4*R*)-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxilato (15,2 g, 84,0 mmol) y TEA (25,7 ml, 18,7 g, 185 mmol) en DCM (150 ml) a -40 °C (hielo seco/CH₃CN). Inmediatamente, la reacción se completó según se determinó mediante el análisis por CL/EM (2,47 min (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 721 ([*M* + H]⁺, 100)). La mezcla se diluyó con DCM (150 ml) y se lavó con HCl 1 N (300 ml), NaHCO₃ saturado (300 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (300 ml), se filtró (a través de un separador de fase) y el disolvente se evaporó al vacío, dando el producto puro **39b** en forma de un sólido de color naranja (21,8 g, 82%). Datos Analíticos: [α]_D²² = -46,1° (*c* = 0,47, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, *J* = 11,1 Hz), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (rotámeros) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, CHCl₃) 3410 (a), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm⁻¹; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 721 ([*M* + H]⁺, 47), 388 (80); HRMS [*M* + H]⁺ teórico C₃₁H₃₆N₄O₁₆ *m/z* 721,2199, observado (EN⁺) *m/z* 721,2227.

Compuesto **39c**

Se añadió en porciones TCCA sólido (32 g, 137 mmol, 2,2 equiv.) a una solución de TEMPO (1 g, 6,4 mmol, 0,1 equiv.) y bis-alcohol **18** (45 g, 62,5 mmol, 1 equiv.), en DCM normal (500 ml) a 0 °C. Se observó una ligera exotermia. La reacción se consideró completa por TLC (acetato de etilo) y CL/EM (2,95 min (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 718,10 ([*M* + H]⁺, 100)) después de 30 minutos. La suspensión se filtró a través de celite y se lavó con DCM. El filtrado se lavó con bisulfito sódico acuoso seguido de NaHCO₃ saturado (precaución, efervescencia vigorosa), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml) y se secó (MgSO₄). La filtración y la evaporación del disolvente al vacío proporcionaron el producto en bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (elución: 20:80 v/v de *n*-hexano/EtOAc), proporcionando la cetona **39c** en forma de un sólido de color blanco (28,23 g, 63%). Datos Analíticos: [α]_D²¹ = +18° (*c* = 0,2, CHCl₃); EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 718,10 ([*M* + H]⁺, 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) mezcla de rotámeros δ 7,70 (m, 2H), 6,79 (m, 2H), 5,27 (m, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,30 (m, 4H), 3,93 (m, 6H), 3,81 (s, 3H), 3,75 (m, 1H), 3,63 (s, 2H), 3,58 (m, 1H), 3,09-2,89 (m, 2H), 2,74-2,53 (m, 2H), 2,40 (p, 2H, *J* = 5,73 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) mezcla de rotámeros δ 206,5, 206,4, 206,0, 205,9, 171,2, 171,1, 170,6, 167,0, 166,7, 155,0, 154,5, 148,8, 137,7, 137,3, 126,4, 125,4, 109,8, 109,1, 108,6, 108,4, 108,4, 65,7, 65,6, 65,5, 60,4, 57,9, 56,7, 56,7, 55,1, 53,6, 52,9, 52,9, 51,6, 41,2, 40,1, 28,7, 28,6, 21,0, 14,1; IR (ATR, CHCl₃) 1764, 1650, 1578, 1518, 1415, 1333, 1274, 1217, 1060, 870, 824 759 cm⁻¹.

Compuesto **40**

Se inyectó en una porción 2,6-lutidina anhidra (4,26 ml, 3,92 g, 36,6 mmol) a una solución agitada vigorosamente de bis-cetona **39c** (4,23 g, 5,90 mmol) en DCM seco (100 ml) a -45 °C (baño de refrigeración de hielo seco/acetonitrilo) en una atmósfera de nitrógeno. Se inyectó rápidamente gota a gota anhídrido tríflico anhidro, tomado de una ampolla recién abierta (5,96 ml, 10 g, 35,4 mmol), mientras se mantuvo la temperatura a -40 °C o inferior. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -45 °C durante 1 hora, momento en el que el análisis por TLC (50/50 v/v de *n*-hexano/EtOAc) reveló el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción fría se diluyó inmediatamente con DCM (200 ml) y, con agitación vigorosa, se lavó con agua (1 x 300 ml), una solución al 5% de ácido cítrico (1 x 200 ml), NaHCO₃ saturado (200 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (150 ml) y se secó (MgSO₄). La filtración y la evaporación del disolvente al vacío proporcionaron el producto en bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (gradiente de elución: 70:30 v/v de *n*-hexano/EtOAb a 40:60 v/v de *n*-hexano/EtOAc), proporcionando el bis-triflato **40** en forma de una espuma de color amarillo (1,32 g, 23%). Datos Analíticos: [α]_D²⁵ = -68° (*c* = 0,2, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (s, 2H), 6,85 (s, 2H), 6,20 (t, 2H, *J* = 1,81 Hz), 5,13 (dd, 2H, *J* = 5,05, 11,93 Hz), 4,33 (t, 4H, *J* = 5,91 Hz), 3,95 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,43 (ddd, 2H, *J* = 2,28, 11,92, 16,59 Hz), 2,96 (ddd, 2H, *J* = 1,60, 5,05, 16,58 Hz), 2,44 (p, 2H, *J* = 5,79 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 169,4, 164,1, 154,7, 149,2, 138,0, 135,2, 124,4, 121,1, 120,0, 116,8, 110,0, 108,4, 65,7, 65,6, 57,0, 56,8, 53,1, 33,3, 28,6; IR (ATR, CHCl₃) 1749, 1654, 1576, 1522, 1418, 1337, 1277, 1207, 1131, 1061, 1023, 910, 821, 757 cm⁻¹; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 981,86 ([*M* + H]⁺, 100).

Compuesto **41**

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (660 mg, 571 μ mol, 0,08 equiv.) a una mezcla agitada de bis enol triflato **40** (7 g, 7,13 mmol, 1 equiv.), ácido 4-fluorofenilborónico (2,6 g, 18,5 mmol, 2,6 equiv.), Na₂CO₃ (3,93 g, 37,0 mmol, 5,2 equiv.), EtOH (25 ml), tolueno (50 ml) y agua (25 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación en una atmósfera de nitrógeno durante una noche, después de lo cual se observó el consumo completo del material de partida por TLC (60/40 de EtOAc/Hexano) y CL/EM (3,68 min (EN+) *m/z* (intensidad relativa) 873,90 ([*M* + H]⁺, 100)). La mezcla de reacción se diluyó con EtOAb (300 ml) y se lavó con H₂O (2 x 200 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a presión reducida, proporcionando el producto en bruto. La purificación

por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 50:50 v/v de Hexano/EtOAc a 80:20 v/v de Hexano/EtOAc) proporcionó el compuesto bis C2-arilo **41** en forma de un sólido de color naranja (5,46 g, 88%). Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{22} = -107^\circ$ ($c = 0,2$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (s, 2H), 7,14-7,04 (m, 4H), 6,97-6,87 (m, 6H), 6,31 (s, 2H), 5,18 (dd, 2H, $J = 11,68$, 5,03 Hz), 4,36 (t, 4H, $J = 5,87$ Hz), 3,97 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,53-3,39 (m, 2H), 3,00 (ddd, 2H, $J = 1,22$, 5,01, 16,28 Hz), 2,46 (p, 2H, $J = 5,98$ Hz); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 171,0, 163,3, 148,9, 138,0, 128,1, 126,3, 126,2, 125,8, 123,1, 122,6, 115,7, 115,5, 110,3, 108,5, 65,7, 58,3, 56,8, 34,7, 28,7; IR (ATR, CHCl_3) 1738, 1650, 1578, 1512, 1416, 1333, 1275, 1212, 1064, 1023, 869, 808, 758, 654, 613 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 873,90 ($[M + H]^+$, 100).

10 **Compuesto 42**

Se añadió en una porción LiBH_4 (132 mg, 21,3 mmol, 3 equiv.) a una solución agitada del éster **41** (5,30 g, 6,07 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora, después de lo cual se observó directamente la conversión completa del material de partida por CL/EM (3,42 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 818,35 ($[M + H]^+$, 100)). La mezcla de reacción se diluyó cuidadosamente con acetato de etilo (500 ml) y el exceso de borohidruro se destruyó con ácido cítrico acuoso frío. La fase orgánica se lavó con HCl acuoso 1 N (100 ml) seguido de NaHCO_3 acuoso saturado (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida a 35 °C, proporcionando el alcohol intermedio que se disolvió de nuevo inmediatamente en DCM anhidro (200 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se añadió imidazol (3,97 g, 58,0 mmol, 9,6 equiv.) seguido de TBDMS-Cl (4,390 g, 29,1 mmol, 4,8 equiv.). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la TA y reaccionar durante 2 horas.

La reacción completa se observó por TLC (EtOAc/hexano, 50/50) y CL/EM (4,23 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1045,99 ($[M + H]^+$, 100)). La solución se lavó con ácido cítrico acuoso 2 N (50 ml), NaHCO_3 acuoso saturado (50 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de 80/20 hasta 60/40 hexano/EtOAc), produciendo 2,45 g (38,6% en dos etapas) de producto puro en forma de un sólido de color naranja. Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{22} = -123^\circ$ ($c = 0,18$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,76 (s, 2H), 7,17-7,06 (m, 4H), 6,96-6,87 (m, 4H), 6,81 (s, 2H), 6,17 (s, 2H), 4,84-4,72 (m, 2H), 4,35 (t, 4H, $J = 5,87$ Hz), 3,93 (s, 6H), 3,25-3,07 (m, 2H), 3,03-2,91 (m, 2H), 2,45 (p, 2H, $J = 5,92$ Hz), 0,84 (s, 18H), 0,07 (s, 12H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 163,2, 160,7, 154,5, 148,6, 137,9, 130,1, 130,0, 126,7, 126,3, 126,2, 124,3, 123,0, 115,6, 115,4, 110,0, 108,5, 65,7, 60,4, 59,2, 56,7, 33,2, 28,7, 25,8, 25,7, 21,0, 18,2, 14,2, -5,3; IR (ATR, CHCl_3) 2953, 1742, 1650, 1576, 1512, 1417, 1334, 1274, 1214, 1063, 1023, 869, 808, 759, 654, 612 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1045,99 ($[M + H]^+$, 100).

35 **Compuesto 43**

Se añadió una solución de ácido fórmico en etanol (5% v/v, 100ml) a una suspensión del compuesto bis-nitro **42** (2,35 g, 2,25 mmol, 1 equiv.) y polvo de zinc (8,82 g, 0,135 mmol, 60 equiv.) en etanol (35 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 25 min, momento en el que el análisis por TLC (metanol/cloroformo, 2/98) y CL/EM (4,23 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 986,3 ($[M + H]^+$, 10), 493,9 ($[(M + 2H)/2]^+$, 100)) revelaron la reacción completa. La suspensión se filtró y el filtrado se repartió entre acetato de etilo (400 ml) y NaHCO_3 acuoso saturado (200 ml). Los productos orgánicos se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron a presión reducida, produciendo bis-amina pura (2,20g, 98%) que se llevó directamente a la siguiente etapa.

Compuesto 44

Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de alilo (0,209 ml, 1,97 mmol, 0,9 equiv.) en DCM seco (50 ml) a una solución del compuesto bis-anilino **43** (2,15 g, 2,18 mmol, 1 equiv.) y piridina (0,335 ml, 4,14 mmol, 1,9 equiv.) en DCM seco (250 ml) a -78 °C. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 2 horas, y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente. La solución se lavó con sulfato de cobre acuoso saturado (2 x 50 ml), agua (250 ml), con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de 70/30 hasta 30/70 de hexano/EtOAc), produciendo 668 mg (26,5%) del compuesto bis-Alloc protegido como se indicó por CL/EM (4,45 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1154,32 ($[M + H]^+$, 100)) y 800 mg del compuesto mono-alloc protegido deseado ligeramente contaminado (4,32 min (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1070,58 ($[M + H]^+$, 100)). Este compuesto se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida (gradiente de 40/60 hasta 20/80 de hexano/éter dietílico), dando 700 mg (30%) del compuesto mono-alloc puro deseado. Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{22} = -41^\circ$ ($c = 0,16$, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,72 (s a, 1H), 7,88 (s, 2H), 7,25-7,18 (m, 4H), 7,02-6,93 (m, 4H), 6,93-6,83 (m, 3H), 6,80 (s, 1H), 6,36 (s, 1H), 6,00-5,84 (m, 1H), 5,32 (dd, 1H, $J = 1,37$, $J = 17,21$ Hz), 5,21 (dd, 1H, $J = 0,90$, $J = 10,40$ Hz), 4,85-4,71 (m, 2H), 4,60 (dd, 2H, $J = 1,02$, $J = 5,62$ Hz), 4,46 (s, 2H), 4,31 (t, 2H, $J = 5,96$ Hz), 4,25 (t, 2H, $J = 6,31$ Hz), 3,98 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,19-3,05 (m, 2H), 3,05-2,93 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, $J = 6,16$ Hz), 0,84 (m, 18H), 0,05 (m, 12H); IR (ATR, CHCl_3) 2952, 2359, 1732, 1652, 1601, 1507, 1472, 1406, 1225, 1119, 836, 777, 668 cm^{-1} ; EM (EN^+) m/z (intensidad relativa) 1070,58 ($[M + H]^+$, 100).

Compuesto 45

Se añadió gota a gota una solución de la amina **44** (650 mg, 0,607 mmol, 1 equiv.) y TEA (220 μ l, 1,58 mmol, 2,6 equiv.) en THF seco a una solución recién preparada de trifosgeno (81 mg, 0,273 mmol, 0,45 equiv.) en THF seco (4 ml) a 0 °C. La suspensión de color blanco se dejó en agitación a 0 °C durante 10 min. Se añadió rápidamente una solución de alcohol (Alloc-Val-Ala-PABOH, 229 mg, 0,607 mmol, 1 equiv.) y TEA (220 μ l, 1,58 mmol, 2,6 equiv.) en THF seco (30 ml). La suspensión de color blanco se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos, después se calentó a 65 °C durante 2 horas y después se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Las sales TEA de color blanco se eliminaron por filtración a través de algodón hidrófilo. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida (Gradiente, MeOH al 0% en cloroformo hasta MeOH al 3% en cloroformo), produciendo 220 mg del carbamato deseado (25%). Datos Analíticos: $[\alpha]_D^{24} = -46,1^\circ$ (c = 0,13, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,70 (s a, 2H), 8,46 (s, 1H), 7,83 (s, 2H), 7,50 (m, 2H), 7,31 (d, 2H, J = 8,50 Hz) 7,25-7,15 (m, 4H), 7,03-6,93 (m, 4H), 6,92-6,77 (m, 4H), 6,51 (d, 1H, J = 7,48Hz), 5,99-5,81 (m, 1H), 5,38-5,15 (m, 5H), 5,13-5,03 (m, 2H), 4,77 (s a, 2H), 4,66-4,53 (m, 5H), 4,38-4,22 (m, 4H), 4,08-3,94 (m, 3H), 3,93-3,81 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,20-3,05 (m, 2H), 3,05-2,94 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, J = 5,95 Hz), 2,22-2,08 (m, 1H), 1,45 (d, 3H, J = 7,03 Hz), 0,94 (dd, 6H, J = 6,81, 14,78 Hz), 0,84 (m, 18H), 0,14-0,02 (m, 12H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 171,7, 169,8, 165,9, 163,1, 153,6, 151,0, 144,3, 137,8, 132,4, 132,3, 132,0, 130,2, 129,2, 126,2, 126,1, 125,3, 123,3, 123,2, 119,8, 118,2, 118,0, 115,7, 115,5, 112,0, 106,0, 66,5, 66,2, 65,8, 65,4, 62,5, 60,4, 59,5, 56,6, 49,6, 30,8, 28,9, 25,7, 19,2, 18,2, 18,1, 17,7, 17,3, 14,2, -5,4; IR (ATR, CHCl₃) 2950, 2356, 1725, 1691, 1602, 1512, 1408, 1201, 1109, 1023, 832, 774, 668 cm⁻¹; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 1473,43 ([M + H]⁺, 100).

Compuesto 12

Se hidrogenó 19-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) 4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-dioato de 1-bencilo (**11**) (100 mg, 0,19 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo seco (15 ml) a 206,84 kPa (30 psi) sobre paladio al 10% sobre carbono (10 mg, 10% en peso) durante 45 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de celite mediante lavado con acetato de etilo seco. La evaporación a presión reducida dio el producto **12** en forma de un aceite incoloro (74 mg, 89%). Datos Analíticos: TR (no visible por CL) EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 458 ([M + Na]⁺, 55), 436 ([M + H]⁺, 12).

Compuesto 13

Se añadió N,N-diisopropildietilamina (8,4 μ l, 6 mg, $5,97 \times 10^{-5}$ mol, 1,1 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**12c**) (50 mg, $5,42 \times 10^{-5}$ mol, 1,0 equiv.) y ácido-dPeg@5-NHS éster (**12**) (28 mg, $6,5 \times 10^{-5}$ mol, 1,2 equiv.) en DCM seco (5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida, dando un aceite de color amarillo pálido. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 96%/metanol al 4% a cloroformo al 92%/metanol al 8% en aumentos del 0,5%] dio el producto **13** en forma de un vidrio de color amarillo (42 mg, 64%). Datos Analíticos: TR 2,78 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 1242 ([M + H]⁺, 40).

Compuesto 49

Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (9,1 mg, $4,76 \times 10^{-5}$ mol, 1,6 equiv.) a una solución de N-hidroxisuccinimida (5,8 mg, $5,06 \times 10^{-5}$ mol, 1,7 equiv.) y un ácido (**13**) en DCM seco (6 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La solución se filtró lavando con DCM (10 ml). La solución de DCM se lavó con agua (20 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (20 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida. El producto **49** (32 mg, 80%) se usó sin purificación adicional. Datos Analíticos: TR 2,88 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 1339 ([M + H]⁺, 100).

Compuesto 50

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (61 mg, 0,053 mmol, 0,01 equiv.) a una solución del compuesto alloc (**8**) (2,0 g, 5,3 mmol, 1,0 equiv.) y pirrolidina (0,47 g, 0,55 ml, 6,63 mmol, 1,25 equiv.) en DCM seco en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis por CLEM indicó la presencia del compuesto alloc sin reaccionar. Se añadieron porciones adicionales de pirrolidina (0,38 g, 0,44 ml, 5,3 mmol, 1,0 equiv.) y Pd(PPh₃)₄ (61 mg, 0,053 mmol, 0,01 equiv.) y la reacción continuó durante 30 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100%, después cloroformo al 98%/metanol al 2% a cloroformo al 90%/metanol 10% en aumentos del 1%] dio el producto **50** en forma de un polvo de color blanco (1,37 g, 88%). Datos Analíticos: TR 0,33 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 294 ([M + H]⁺, 60), EM (EN⁻) m/z (intensidad relativa) 292 ([M - H]⁻, 100).

Compuesto 51

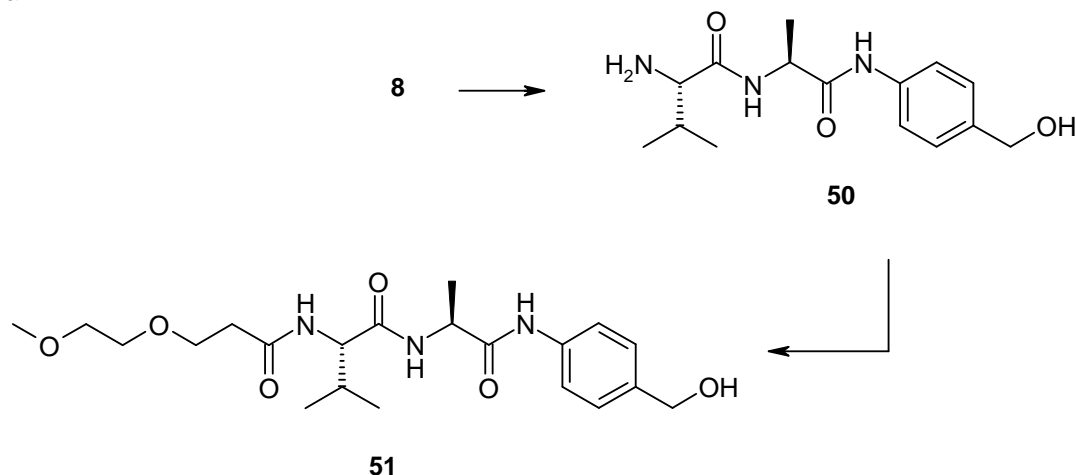
Se añadió EEDQ (1,22 g, 4,93 mmol, 1,05 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**50**) (1,37 g, 4,69 mmol, 1 equiv.) y m-dPeg@2 ácido (0,73 g, 4,93 mmol, 1,05 equiv.) en THF seco (60 ml). La solución se agitó a temperatura

ambiente durante 5 días. El disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna [cloroformo al 100% a cloroformo al 95%/metanol al 5% en aumentos del 1%], dando el producto **51** en forma de un sólido de color blanco (1,46 g, 74%). Datos Analíticos: TR 2,22 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 446 ([M + Na]⁺, 80), 424 ([M + H]⁺, 70), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 422 ([M - H]⁻, 100).

5

La síntesis de **51** se muestra a continuación en el Esquema 14.

Esquema 14.



10 **Compuesto 52**

Se añadió trietilamina (0,47 g, 0,65 ml 4,66 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-alloc protegida (**6**) (1,68 g, 2,12 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (0,226 g, 0,76 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (40 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, una muestra se trató con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo.

15

Al isocianato recién preparado se le añadió gota a gota una solución del dPeg@2-bencil-alcohol (**51**) (1,35 g, 3,18 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,32 g, 0,44 ml, 3,18 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (60 ml). La mezcla de reacción se controló por CLEM en intervalos de 30 minutos. Después de 3 horas, el análisis por CL-EM mostró la conversión en el producto, la presencia de carbamato de metilo y *bis*-anilina mono-alloc protegida (**9**). Se añadió una porción más de trifosgeno (0,056 g, 0,19 mmol, 0,09 equiv.) y la reacción continuó a 40 °C durante 3 horas más. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 95%/metanol al 5% en aumentos del 1%], dando el producto deseado **52** en forma de una espuma de color amarillo (1,91 g, 73%). Datos Analíticos: TR min 3,42 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1243 ([M + H]⁺, 50), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1241 ([M - H]⁻, 100).

20

25

Compuesto 53

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (35 mg, 3,0 x 10⁻⁵ mol 0,02 equiv.) a una solución del compuesto alloc (**52**) (1,87 g, 1,5 mmol, 1,0 equiv.) y pirrolidina (0,27 mg, 310 µl, 3,8 mmol, 2,5 equiv.) en DCM seco (30 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 95%/metanol al 5% en aumentos del 1%], dando el producto **53** en forma de una espuma de color amarillo (1,57 g, 90%). Datos Analíticos: TR min 3,17 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1159 ([M + H]⁺, 65).

30

35

Compuesto 54

Se añadió trietilamina (0,26 g, 0,36 ml 2,6 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-protegida (**53**) (1,37 g, 1,18 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (0,126 g, 0,43 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (40 ml) en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, una muestra se trató con metanol y se analizó por CL-EM según el carbamato de metilo indicó la formación completa de isocianato.

40

45

Al isocianato recién preparado se le añadió gota a gota una solución del alcohol bencilico (**8**) (0,67 g, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,18 g, 0,25 ml, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (50 ml). La mezcla de reacción se controló por CLEM y se completó después de 18 horas a 40 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía ultrarrápida [gradiente de elución de acetato de etilo al 95%/metanol al 5% a acetato de etilo al 93%/metanol al 7% en aumentos del 1%], dando el

producto deseado **54** en forma de una espuma de color blanco (1,21 g, 66%). Datos Analíticos: TR min 3,42 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1562 ([M + H]⁺, 15).

Compuesto 55

Se añadió una solución de K₂CO₃ (0,522 g, 3,78 mmol, 5 equiv.) en H₂O (5,0 ml) a una solución del acetato (**54**) (1,18 g, 0,756 mmol, 1 equiv.) en metanol (29 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El metanol se evaporó a presión reducida, el residuo se diluyó con H₂O (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos combinados de acetato de etilo se lavaron con H₂O (200 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto **55** en forma de una espuma de color blanco (1,052 g, 94%). Datos Analíticos: TR min 3,15 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1478 ([M + H]⁺, 5), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1477 ([M - H]⁻, 100).

Compuesto 56

Se añadió en una porción peryodinano de Dess-Martin (0,152 g, 0,36 mmol, 2,1 equiv.) a una solución del producto *bis* desacetilado (**55**) (0,252 g, 0,17 mmol 1 equiv.) en DCM seco (5 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, momento en el que el análisis por CLEM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (3 x 100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secó (MgSO₄). El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 92%/metanol al 8% en aumentos del 1%] dio el producto **56** en forma de una espuma de color blanco (0,17 g, 68%). Datos Analíticos: TR min 6,17 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1474 ([M + H]⁺, 5), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1472 ([M - H]⁻, 100).

Compuesto 57

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (8 mg, 6,9 μmol, 6,0 equiv.) a una solución del compuesto alloc (**56**) (160 mg, 0,108 mmol, 1,0 equiv.) y una solución 0,5 M de pirrolidina en DCM (0,27 ml, 0,135 mmol, 1,25 equiv.) en DCM seco (18 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 100% a cloroformo al 91%/metanol al 9% en aumentos del 1%] dio el producto **57** en forma de un polvo de color blanco (0,114 g, 74%). Datos Analíticos: TR min 2,60 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1390 ([M + H]⁺, 5).

El acoplamiento de un reactivo de maleimida-PEG-succinimida con **57** proporciona el enlazador al fármaco de PBD **58**. La figura 1b muestra las estructuras del enlazador al fármaco de PBD MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **58** en el que MP es maleimidopropanamida, PEG es etilenoxi, y PAB es para-aminobenciloxicarbonilo, e imp es el grupo protector *N*-10 imina: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB.

Compuesto 58 (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; 11-hidroxi-8-(5-((11S,11aS)-11-hidroxi-10-((4-((10S,13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxa-9,12-diazatetradecanamido)enciloxi)carbonil)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-pirrolbenzo[2,1-c][1,4]diazepin-8-iloxi)pentiloxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-pirrolbenzo[2,1-c][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encilo)

Se añadió una solución 0,5 M de *N,N*-diisopropildietilamina en DCM seco (176 μl, 8,8 x 10⁻⁵ mol, 2,2 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**57**) (55 mg, 3,96 x 10⁻⁵ mol, 1,0 equiv.) y maleimida-dPeg@8-NHS éster (33 mg, 4,75 x 10⁻⁵ mol, 1,2 equiv.) en DCM seco (6 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió de nuevo en DCM (50 ml). La solución de DCM se extrajo con carbonato ácido sódico saturado (2 x 100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida, dando una goma de color amarillo. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo a cloroformo al 91%/metanol al 9% en aumentos del 1%] dio el producto **58** en forma de una espuma de color blanco (41 mg, 52%). Datos Analíticos: TR min 5,8 min. EM (MaldiTOF) *m/z* (intensidad relativa) 1987,9 ([M + Na]⁺, 100).

Conjugado 60

Se seleccionó el péptido biotina-A20FMDV-Cys (**59**) que es altamente selectivo para la integrina α_vβ₆, que se regula de forma ascendente significativamente por muchos cánceres, para la conjugación de los derivados del enlazador de PBD. Se añadió una solución del péptido (**59**) (7,7 mg, 3,08 μmol, 1,2 equiv.) en 1/1 de acetonitrilo/agua (1 ml) a una solución de (**58**) (5,05 mg, 2,57 μmol, 1,0 equiv.) en 1/1 de acetonitrilo/agua (2 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El acetonitrilo se evaporó a presión reducida y el agua se eliminó por liofilización, dando el producto **60** en forma de una espuma de color blanco. La purificación por HPLC semi-preparativa seguida de liofilización dieron el producto en forma de una espuma de color blanco (3,4 mg, 29%). Datos

Análiticos: EM (MaldiTOF) m/z (intensidad relativa) 4458,3 ($[M + H]^+$, 100).

Compuesto **61** (MP-PEG24-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; 11-hidroxi-8-((5-(((11S,11aS)-11-hidroxi-10-(((4-((10S,13S)-10-isopropil-13-metil-8,11-dioxo-2,5-dioxa-9,12-diazatetradecanamido)encil)oxi)carbonil)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-16-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,14-trioxo-10-oxa-3,6,13-triazahexadecanamido)encilo)

Se añadió NN-diisopropildietilamina (6 μ l, $4,3 \times 10^{-5}$ mol, 2,2 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**57**) (27 mg, $1,94 \times 10^{-5}$ mol, 1 equiv.) y maleimida-dPeg@24-NHS éster (30 mg, $2,13 \times 10^{-5}$ mol, 1,1 equiv.) en DCM seco (5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió de nuevo en DCM (25 ml). La solución de DCM se extrajo con carbonato ácido sódico saturado (2 x 50 ml), agua (50 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (50 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida, dando una goma de color amarillo. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo a cloroformo al 91%/metanol al 9% en aumentos del 1%] dio el producto en forma de una goma incolora (22 mg, 42%). Datos Analíticos: EM (MaldiTOF) m/z (intensidad relativa) 2691,8 ($[M + H]^+$, 100).

1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoil))bis(4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-2-carboxilato) de (2S,2'S,E)-dimetilo (**71**)

Se añadió *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) (21,6mg) al triflato **40** (230 mg), ácido *trans*-propenilborónico (52,3 mg) y carbonato sódico (129 mg) en una mezcla de tolueno (5 ml), etanol (2,5 ml) y agua (2,5 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 3 horas en una atmósfera de argón a 32 °C. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio. Después de la filtración, el exceso de acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El producto de acoplamiento en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; gradiente de acetato de etilo/hexano al 50%/50% a acetato de etilo/hexano al 80%/20%). Las fracciones puras se combinaron y la eliminación del exceso de eluyente proporcionó el producto puro **71** en forma de un sólido de color naranja (110 mg, rendimiento del 61,4%, CL/EM 3,52 min, m/z EN⁺ 764,92). La reacción se repitió a una escala mayor, proporcionando 7,21 g del producto de acoplamiento de Suzuki. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,92 (s, 2H), 5,98 (d, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,46-5,55 (m, 2H), 5,10 (dd, 2H), 4,37 (t, 4H), 3,93-4,00 (m, 6H), 3,86 (s, 6H), 3,19-3,26 (m, 2H), 2,80 (dd, 2H), 2,45-2,51 (m, 2H), 1,77 (d, 6H OCH₃).

(S,E)-((propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona) (**72**)

El *bis*-éster **71** (7,21 g) se añadió en una porción en forma de un sólido a una solución de borohidruro de litio (622 mg) en tetrahidrofurano seco (300 ml) a 0 °C (baño de hielo). El baño de hielo se eliminó y la mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Después de 1 hora, el análisis por TLC (tras un mini tratamiento con acetato de etilo y agua) reveló que las reacciones no estaban completas y por ello se añadió más cantidad de borohidruro de litio (0,75 equivalentes). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2,5 horas más, momento en el que el análisis por TLC (después de un mini tratamiento) reveló que la reacción se había completado. El borohidruro de litio restante se inactivó con un gran exceso de acetato de etilo (baño de hielo) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 50 min. La fase orgánica se lavó con agua, una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secó sobre sulfato de magnesio. El sulfato de magnesio se eliminó por filtración al vacío y el acetato de etilo se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, proporcionando el diol **72** (5,46 g, rendimiento del 82%) que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional (CL/EM 3,17 min, m/z EN⁺ 708,84). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,85 (s, 2H), 5,97 (d, 2H), 5,77 (s, 2H), 5,61-5,53 (m, 2H), 4,75-4,82 (m, 2H), 4,38 (t, 4H), 3,89-4,00 (m, 12H), 3,01-3,08 (m, 2H) 2,46-2,51 (m, 4H), 1,77 (d, 6H OCH₃).

((2S,2'S,E)-1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoil))bis(4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-2,1-diil))bis(metilen)diacetato (**73**)

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de acetilo (1,64 ml) en diclorometano seco (40 ml) a una solución del *bis* alcohol **72** (6,2 g) en diclorometano (200 ml) en presencia de trietilamina (3,68 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y la reacción se controló por TLC y CL/EM. Una vez que la reacción se completó, la fase orgánica se lavó secuencialmente con agua, ácido cítrico (0,5 N), bicarbonato sódico saturado y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de diclorometano se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice; gradiente, acetato de etilo al 60%/hexano al 40% a acetato de etilo al 70%/hexano al 30%). Las fracciones puras se combinaron y la eliminación del exceso de eluyente proporcionó el *bis*-acetato **73** (2,50 g, rendimiento del 36%, CL/EM 3,60 min, m/z EN⁺ 792,63). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (d, $J = 3,4$ Hz, 2H), 6,89 (s, 2H), 5,99 (d, $J = 15,2$ Hz, 2H), 5,78 (s, 2H), 5,65 – 5,45 (m, $J = 15,4$, 6,8 Hz, 2H), 5,02 – 4,86 (m, $J = 9,7$, 5,5 Hz, 2H), 4,57 (s, 2H), 4,37 (t, $J = 5,9$ Hz, 4H), 4,00 (s, 6H), 3,10 – 2,92 (m, $J = 10,7$ Hz, 2H), 2,60 (dd, $J = 16,3$, 3,1 Hz, 2H), 2,52 – 2,43 (m, 2H), 2,10 (s, 6H), 1,78 (d, $J = 6,7$ Hz, 4H).

((2S,2'S,E)-1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxibenzoil))bis(4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-2,1-diil))bis(metilen)diacetato (**74**)

5 Se añadió polvo de zinc (10 g) a una solución del compuesto *bis*-nitro **73** (2,5 g) en etanol (20 ml) y acetato de etilo (20 ml) seguido de una solución de ácido fórmico en etanol (5% v/v; 100 ml). La reacción tenía exotermia con el aumento de temperatura a 33 °C, la temperatura se redujo a 15 °C con un baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación mientras se controlaba estrechamente por TLC y CL/EM. Después de 30 min, se dedujo que la
10 reacción se había completado ya que no se detectaron trazas de material de partida ni intermedios. La mezcla se decantó y se filtró a través de algodón hidrófilo. El filtrado se repartió entre acetato de etilo (300 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (300 ml). La fase orgánica se lavó adicionalmente con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El exceso de disolventes se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, proporcionando el producto **74** (2,09 g; rendimiento del 90%, CL/EM 3,35 min, m/z EN⁺ 732,06).
15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,76 (s, 2H), 6,45 (s, 2H), 6,33 (s, 2H), 6,12 (d, J = 15,3 Hz, 2H), 5,54 (dc, J = 13,2, 6,6 Hz, 2H), 4,90 (td, J = 9,6, 4,5 Hz, 2H), 4,48 (s, 4H), 4,42 – 4,33 (m, 4H), 4,23 (t, J = 6,1 Hz, 4H), 3,79 (s, 6H), 2,95 (dd, J = 16,0, 10,4 Hz, 2H), 2,55 (dd, J = 16,2, 3,5 Hz, 2H), 2,42 – 2,32 (m, 2H), 2,07 (s, 6H), 1,81 (d, J = 6,6 Hz, 6H).

((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-5-(((aliloxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-amino-5-metoxibenzoil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-2-il)metil (**75**)

20 Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de alilo en diclorometano seco a una solución de la *bis*-anilina **74** y piridina en diclorometano seco a -78 °C. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 2 horas y después se dejó que regresara a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó secuencialmente con sulfato de cobre II acuoso, agua, bicarbonato sódico saturado y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio.
25 La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró al vacío y el exceso de diclorometano se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. Los análisis por TLC y CL/EM revelaron la presencia de tanto el producto mono Alloc deseado **75** como el producto *bis*-Alloc. La mezcla del producto se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice; gradiente de acetato de etilo al 40%/hexano al 60% a acetato de etilo al 70%/hexano al 40%). Las fracciones puras que contenían el producto mono Alloc deseado **75** se recogieron y se combinaron, y el exceso de eluyente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, proporcionando el producto (580 ml, rendimiento del 25%). CL/EM 3,58 min, EN⁺ 817,02 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,60 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,42 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,33 (s, 1H), 6,08 (dd, J = 15,4, 6,1 Hz, 2H), 6,00 – 5,87 (m, 1H), 5,62 – 5,44 (m, 2H), 5,34 (dd, J = 17,2, 1,4 Hz, 1H), 5,23 (dd, J = 10,4, 1,2 Hz, 1H), 4,88 (cd, J = 9,5, 4,5 Hz, 2H), 4,67 – 4,57 (m, 2H), 4,50 – 4,25 (m, 8H), 4,22 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,00 – 2,85 (m, 2H), 2,58 – 2,47 (m, 2H), 2,37
35 (p, J = 6,1 Hz, 2H), 2,06 (s, 6H), 1,81 – 1,73 (m, 6H).

Acetato de ((2S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-5-(((4-(2-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-5-metoxibenzoil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-2-il)metilo (**76**)

40 Se añadió trietilamina seca (0,206 ml) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-alloc protegida **75** (560 mg) y trifosgeno (72 mg) en tetrahidrofurano seco (20 ml) en una atmósfera inerte. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, y una muestra se eliminó y se trató con metanol. El análisis por CL/EM reveló la conversión completa en el carbamato de metilo indicando que el grupo de amina libre se había convertido con éxito en el intermedio de isocianato reactivo. Una solución del alloc-val-ala-PABOH (381 mg) y trietilamina (0,14 ml) en tetrahidrofurano seco (20 ml) se inyectó rápidamente en el recipiente de reacción a 40 °C. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual una muestra se eliminó y se trató con metanol. El análisis por CL/EM reveló que no había ninguna traza de carbamato de metilo, lo que indicaba que todo el isocianato se había consumido. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando el producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice; gradiente de cloroformo a metanol al 2%/cloroformo al 98%). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron, y la eliminación del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto puro **76** (691 mg, rendimiento del 84%). CL/EM 3,73 min, EN⁺1220,21.

55 ((S,E)-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen)dicarbamato de alil 4-(2-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzilo (**77**)

60 Se añadió una solución acuosa de carbonato potásico (770 mg en 4,8 ml de agua) a una solución del *bis*-acetato **76** (680 mg) en metanol (29 ml) a temperatura ambiente. La desacetilación se completó en 30 min según se controló por CL/EM. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (200 ml) y la fase orgánica se lavó secuencialmente con ácido cítrico (0,5 N, 100 ml), agua (200 ml) y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, la suspensión se filtró (filtración al vacío) y el exceso de disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice; gradiente de metanol al 1,5%/cloroformo al 98,5% a metanol al 3,5%/cloroformo al 96,5%). Las fracciones puras se combinaron y la eliminación del exceso de eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el diol **77** (530 mg, rendimiento del 84%). CL/EM 3,40 min, EN⁺ 1136,49.

8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,10,11,11a-tetrahidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**78**)

Se añadió en una porción peryodinano de Dess-Martin (373 mg, 4 equiv.) a una solución de **77** (250 mg) y piridina (0,36 ml, 20 equiv.) en diclorometano seco (10 ml) a temperatura ambiente. El control estrecho por TLC (metanol al 5%/cloroformo) reveló la desaparición del material de después de 30 minutos. La reacción se trató con una solución de metabisulfito sódico y carbonato ácido sódico seguido de una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La fase de diclorometano se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró al vacío. Después, la solución de diclorometano se trató con una cantidad catalítica de DMAP (aprox. 10 mg), haciendo que la mancha de producto principal se fusionara en una como se observó por TLC/CL/EM. La solución se filtró y el diclorometano se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna (gel de sílice; gradiente de metanol al 1,5%/cloroformo al 98,5% a metanol al 3%/cloroformo al 97%). Las fracciones puras se recogieron y la eliminación del eluyente por evaporación rotatoria a presión reducida proporcionó el producto ciclado deseado **78** (62 mg, rendimiento del 25%). CL/EM 3,35 min, EN⁺ 1132,19, EN⁻ 1130,25.

11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]d benzoiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**79**)

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (1,9 mg) a una solución del compuesto alloc (**78**) (62 mg) y pirrolidina (22,6 µl) en DCM seco (3 ml) en una atmósfera de argón. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de metanol al 3%/cloroformo al 97% a cloroformo al 90%/metanol al 10%] dio el producto en forma de un polvo de color blanco (26 mg, 50%). CL/EM: TR 2,70 min EM (EN⁺) 946,17,

11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-pirrolbenzo[2,1-c][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-25-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,23-trioxo-10,13,16,19-tetraoxa-3,6,22-triazapentacosanamido)bencilo (**80**)

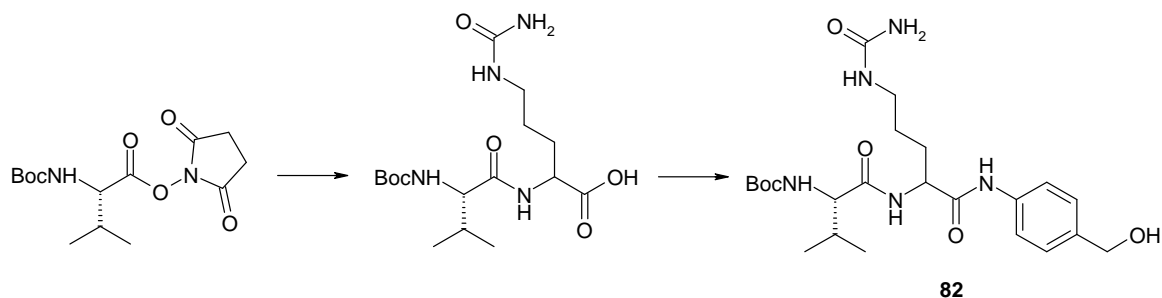
Se añadió una solución de *N,N*-diisopropildietilamina (2,6 µl) a una solución del dipéptido de amina **79** (13 mg) y maleimida-dPeg®4-NHS éster (8,5mg) en DCM seco (4 ml) La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se sometió a TLC semi-preparativa (metanol al 10%/cloroformo al 90%), proporcionando una muestra pura de la 14 deseada. Tiempo de retención de CL-EM 2,87 min EN⁺ 1344,29.

Boc-Val-Cit-PABOH (**82**)

Se añadió una solución de Boc-Val-OSu (10,0 g, 31,8 mmol, 1 equiv.) en THF (50 ml) a una solución de H-Cit-OH (5,85 g, 33,4 mmol, 1,05 equiv.) y NaHCO₃ (2,94 g, 34,9 mmol, 1,1 equiv.) en THF (50 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas y el THF se evaporó a presión reducida. El pH se ajustó a 3 con ácido cítrico para precipitar una goma de color blanco. Esta se extrajo con IPA al 10%/acetato de etilo (8 x 150 ml), los extractos combinados se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (300 ml) y se secaron (MgSO₄). La evaporación a presión reducida dio una espuma de color blanco que se secó a presión reducida durante 18 horas. La espuma se suspendió en éter con sonicación seguida de filtración, dando el producto en forma de un polvo fino de color blanco (10,6 g, 89%). Una porción de este material (7,2 g, 19,2 mmol, 1 equiv.), *p*-aminobencil alcohol (2,6 g, 21,15 mmol, 1,1 equiv.) y EEDQ (9,5 g, 38,5 mmol, 2,0 equiv.) en DCM/MeOH (100 ml/50 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida, la goma residual se trituró con éter con sonicación, el producto resultante se recogió por filtración y se secó a presión reducida, dando el producto **82** en forma de un sólido de color blanco (6,6 g, 71%). Datos Analíticos: TR 2,42 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 479,8 ([M + 1]⁺, 60), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 477,6 ([M - H]⁻, 90).

La síntesis del compuesto **82** se muestra en el esquema 16 que se indica a continuación.

Esquema 16



Acetato de ((S)-1-(4-((5-(4-((S)-2-(acetoximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-5-metoxibenzoil)-4-metilenpirrolidin-2-il)metilo (**83**)

Se añadió trietilamina (0,14 g, 0,19 ml, 1,4 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-alloc protegida (**6**) (0,505 g, 0,64 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (0,068 g, 0,23 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (10 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C, una muestra se trató con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo.

Al isocianato recién preparado se le añadió gota a gota una solución del alcohol bencilico (**82**) (0,46 g, 0,96 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,096 g, 0,13 ml, 0,96 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco/DMF (20 ml/1 ml). La mezcla de reacción se controló por CL-EM y se completó después de 2 horas a 40 °C. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se repartió entre IPA al 10%/DCM y agua. La porción orgánica se separó, se lavó con agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida, dando una espuma de color pardo. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo a cloroformo al 93%/metanol al 7% en aumentos del 1%] dio el producto en forma de un sólido de color blanco (0,5 g, 60%). Datos Analíticos: TR 3,42 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1298 ([M + H]⁺, 100).

((S)-(Pentan-1,5-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de alil 4-((S)-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (**84**)

Se añadió una solución de K₂CO₃ (0,28 g, 2,0 mmol, 5,4 equiv.) en H₂O (2 ml) a una solución del acetato (**83**) (0,49 g, 0,4 mmol, 1 equiv.) en metanol (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El metanol se evaporó a presión reducida, el residuo se diluyó con H₂O (10 ml) y se acidificó a pH 3 con ácido cítrico 1 M. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 50 ml) y los extractos combinados se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto en forma de una espuma de color blanco (0,43 g, 94%). Datos Analíticos: TR 3,12 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1214 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1212 ([M - H]⁻, 100).

8-((5-(((11S,11aS)-10-(3-(4-((S)-2-((S)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenil)propanoil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**85**)

Se añadió en una porción ácido 2-yodóxibenzoico estabilizado al 45% en peso (IBX) (0,18 g, 0,29 mmol, 2,4 equiv.) a una solución del producto *bis* desacetilado (**55**) (0,147 g, 0,12 mmol, 1 equiv.) en DMSO seco (4 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 26 horas. Se añadió una porción más de IBX (15 mg, 2,4 x 10⁻⁵, 0,2 equiv.) y la reacción continuó durante 18 horas más. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 ml), se extrajo con MeOH al 10%/DCM (4 x 25 ml) y los extractos combinados se lavaron con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (2 x 100 ml), agua (100 ml), una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml) y se secaron (MgSO₄). El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, dando el producto en bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de diclorometano al 100% a diclorometano al 94%/metanol al 6% en aumentos del 1%] dio el producto **85** en forma de un sólido de color blanco (77 mg, 53%). Datos Analíticos: TR 2,98 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1210 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1208 ([M - H]⁻, 100).

8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**86**)

Se añadió ácido trifluoroacético frío (3 ml) al compuesto Boc protegido (**85**) (72 mg, 6,0 x 10⁻⁵ mol) a 0 °C. La solución se agitó a esta temperatura durante 15 minutos. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo y el pH se

ajustó a pH 8 con una solución saturada de NaHCO₃. La solución se extrajo con DCM (4 x 25 ml) y los extractos combinados se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio saturada (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida, dando el producto en forma de un sólido de color blanco (55 mg, 83%). Datos Analíticos: TR 2,53 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1110 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1108 ([M - H]⁻, 100).

11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (**86**)

Se añadió Pd(PPh₃)₄ (2,7 mg, 2,3 μmol, 0,03 equiv.) a una solución del compuesto alloc (**85**) (80 mg, 72 μmol, 1,0 equiv.) y pirrolidina (30 μl, 26 mg, 0,36 mmol, 5 equiv.) en DCM seco (3 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo al 90%/metanol al 10% a cloroformo al 76%/metanol al 24%] dio el producto en forma de un polvo de color blanco (62,5 g, 86%). Datos Analíticos: TR 2,45 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1008 ([M + H]⁺, 80).

11-hidroxi-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-2-metilen-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (**87**)

Se añadió *N,N*-diisopropildietilamina (12 μl, 7,1 x 10⁻⁵ mol, 5,0 equiv.) a una solución del dipéptido de amina (**86**) (14,2 mg, 1,4 x 10⁻⁵ mol, 1 equiv.) y 6-maleimida-ácido hexanoico-NHS éster (4,8 mg, 1,55 x 10⁻⁵ mol, 1,1 equiv.) en DCM seco/DMA (2 ml/0,2 ml) en una atmósfera de argón. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en columna [gradiente de elución de cloroformo a cloroformo al 93%/metanol al 7% en aumentos del 1%], dando el producto en forma de una espuma de color blanquecino (5 mg, 29%). Datos Analíticos: TR 2,83 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1201 ([M + H]⁺, 100).

Reducción/Oxidación de tioAbMo para conjugación

Los anticuerpos monoclonales de longitud completa manipulados con cisteína (TioAbMo) expresados en células CHO se redujeron con un exceso de 20-40 veces de TCEP (tris(1-carboxietil)fosfina clorhidrato o DTT (ditiotreitolo) en Tris 50 mM a pH 7,5 con EDTA 2 mM durante 3 horas a 37 °C o durante la noche a temperatura ambiente (Getz y col. (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). El TioAbMo reducido se diluyó y cargó en una columna de HiTrap en acetato sódico 10 mM, a pH 5, y se eluyó con PBS con cloruro sódico 0,3M. Como alternativa, el anticuerpo se acidificó mediante la adición de 1/20 del volumen de ácido acético al 10 % diluido con succinato 10 mM a pH 5, se cargó sobre la columna y después se lavó con 10 volúmenes de columna del tampón succinato. La columna se eluyó con tris 50 mM, a pH 7,5, EDTA 2 mM.

El TioAbMo reducido eluido se trató con sulfato de cobre acuoso (CuSO₄) 200 nM o un exceso molar de 15 veces de DHAA (ácido deshidroascórbico). La oxidación de los enlaces disulfuro intercatenarios se completó en aproximadamente tres horas o más. La oxidación al aire ambiente fue también eficaz. El anticuerpo reoxidado se dializó en succinato sódico 20 mM, pH 5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y se almacenó congelado a -20 °C.

Conjugación de TioAbMo con compuestos de fármaco-enlazador para preparar conjugados de anticuerpo-fármaco

Los TioAbMo reoxidados como se ha descrito anteriormente se combinaron con un exceso de 2,5 a 10 veces del intermedio fármaco-enlazador (**15ba**, **15bb**, **15d**, **58**) mezclado y dejado reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para efectuar la conjugación y formar los conjugados anticuerpo-fármaco TioAbMo **101-115** en la Tabla 1. La mezcla de conjugación se purificó mediante filtración en gel, cromatografía de intercambio de cationes o diálisis para eliminar el exceso de intermedio fármaco-enlazador y otras impurezas.

Tabla 1

ADC	ADC (Ab-fármaco/enlazador)	Compuesto fármaco-enlazador	PFA (proporción entre el fármaco y el anticuerpo)	Figuras
101	Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1,3	2, 3, 4
102	antiCD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1,2	2, 3
103	Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,37	2, 3, 4

104	antiCD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,2	2, 3
105	trastuzumab-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	1	6
106	trastuzumab-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,1	6
107	antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD	15bb	0,5	4, 6
108	antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD	15ba	1,5	4, 6
109	antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,75	5
110	antiCD22-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,8	5
111	antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,8	
112	gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,85	
113	gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,9	
114	trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD	15d	1,7	
115	trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD	58	1,8	
Tr = tio trastuzumab, anti HER2, 4D5 HC A118C (numeración secuencial), A114C (numeración de Kabat) imp = N-10 imina protegida: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB-				

En concreto, el intermedio fármaco-enlazador **15d** (PM 1496,65) se solubilizó en DMA (dimetilacetamida) hasta una concentración de 20 mM. El anticuerpo trastuzumab (Tr) H118C sometido a ingeniería con cisteína y reoxidado se descongeló y se añadió un exceso molar de 3 veces de **15d**. La reacción se llevó a cabo a pH después de que los experimentos mostraran un incremento de la agregación del anticuerpo a un pH mayor. La extensión de la conjugación del fármaco se monitorizó mediante análisis CL-EM. Tras 3 horas se añadió 1 equivalente adicional de **15d** y se dejó proceder la reacción durante la noche a 4 °C para dar el ADC **114** bruto.

El conjugado anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **114**, se aplicó después a una columna de intercambio catiónico tras dilución con succinato, se lavó con al menos 10 volúmenes de columna de succinato y se eluyó con PBS. El conjugado anticuerpo-fármaco **114** se formuló en His/acetato 20 mM a pH 5, sacarosa 240 mM usando columnas de filtración en gel. El conjugado anticuerpo-fármaco **114** se caracterizó mediante espectroscopia UV para determinar la concentración proteica, SEC analítica (cromatografía de exclusión por tamaño) para análisis de agregación y CL-EM antes y después de la reducción para determinar la carga del fármaco.

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó usando una columna Shodex KW802.5 en fosfato potásico 0,2M a pH 6,2 con cloruro potásico 0.25 mM e IPA al 15 % a un caudal de 0,75 ml/min. El estado de agregación del conjugado se determinó mediante integración de la absorbancia del área máxima eluida a 280 nm. El análisis mediante SEC mostró un 4,1 % mediante el área integrada del ADC agregado a 8,08 min y 95,9 % de ADC monomérico **114** a 8,99 min.

El análisis CL-EM se realizó usando un instrumento Agilent QTOF 6520 ESI. Como ejemplo, **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD se redujo con DTT (ditiotreitól) y se cargó en una columna de 1000 Å, 8µm PLRP-S (Varian) calentada hasta 80 °C y se eluyó con un gradiente del 30 % de B al 40 % de B en 5 minutos. La fase móvil A era H₂O con TFA al 0,05%, la fase móvil B era acetonitrilo con TFA al 0,04%. El caudal fue de 0,5 ml/min. La elución de proteínas se monitorizó mediante detección de absorbancia UV a una A 280 nm antes del análisis de ionización por electropulverización y TOF. Se obtuvo la resolución cromatográfica basal de la cadena ligera desnuda, la cadena pesada desnuda residual y la cadena pesada con fármaco. Los espectros m/z obtenidos se aclararon usando el software Agilent Mass Hunter(TM) para calcular la masa de los fragmentos de anticuerpo reducido.

Peso molecular (PM) de MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **58** (Figura 1) = 1964 daltons. Masas aclaradas observadas:

23440 daltons corresponden al PM de la CL desnuda
50627 daltons corresponden al PM de la CH desnuda
52591 daltons corresponden al PM de la CH con fármaco

Por tanto, el pico observado a 52591 daltons corresponde al fragmento esperado de la cadena pesada (CH) (50627

daltons) portador de un grupo farmacológico, el intermedio fármaco-enlazador 58 (daltons).

5 Cuando el anticuerpo para conjugar a un intermedio-enlazador de PBD no es un anticuerpo sometido a ingeniería con cisteína, los puentes disulfuro intercatenarios se reducen parcialmente mediante la adición de un exceso molar de aproximadamente 2,2 veces de TCEP en fosfato a pH 7,5 durante 2 horas a 37 °C. Cada equivalente de TCEP tiene como resultado, en teoría, 2 cisteínas reactivas. Normalmente, para una proporción de fármaco/anticuerpo (PFA) diana de aproximadamente 3,5 se añade un exceso molar de 1,8-2 veces de TCEP. Normalmente no se necesita ninguna etapa de purificación tras la reducción. Se añade un ligero exceso (1,2-1,5 X) del intermedio fármaco-enlazador a las cisteínas reactivas, aproximadamente 8 equivalentes molares de intermedio fármaco-enlazador al anticuerpo y la reacción se lleva a cabo durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La purificación se puede realizar mediante diafiltración, intercambio iónico o filtración en gel. La PAF se puede determinar mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) o CL-EM del conjugado reducido usando una integración del área A280 UV.

15 Ensayos de proliferación celular in vitro

La eficacia del ADC se midió mediante un ensayo de proliferación celular usando el protocolo siguiente (ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo, Promega Corp. Boletín Técnico TB288; Mendoza y col. (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

- 20 1. Un alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10⁴ células (por ejemplo, KPL-4, una línea celular de cáncer de mama humano, Kurebayashi y col. (1999) Brit. Jour. Cancer 79(5-6):707-717), SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 96 pocillos.
- 25 2. Se prepararon pocillos control que contienen medio y sin células.
3. A los pocillos experimentales se añadió ADC y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de reactivo de CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
- 30 6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir lisis celular.
7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró e indicó en los gráficos como ULR= unidades de luminiscencia relativas.

35 Determinadas células se siembran a 1.000-2.000/pocillo o 2.000-3.000/pocillo en una placa de 96 pocillos, 50 µl/pocillo. Tras uno o dos días, los ADC se añaden en volúmenes de 50 µl hasta una concentración final de 9.000, 3.000, 1.000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1 o 1,4 ng/ml, con pocillos control "sin ADC" que reciben solo medio. Las condiciones están por duplicado o por triplicado. Tras 3-5 días, se añaden 100 µl/pocillo de Cell TiterGlo II (ensayo basado en luciferasa, proliferación medida por los niveles de ATP) y los recuentos celulares se determinan usando un luminómetro. Los datos se representan como la media de la luminiscencia para cada conjunto de duplicados, con barras de error de desviación estándar. El protocolo es una modificación del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo (Promega);

- 45 1. Sembrar en placa 1.000 células/pocillo en 50 µl/pocillo de medio con FBS/glutamina. Dejar que las células se unan durante la noche.
2. El ADC se diluye en serie a 1:3 en medio comenzando a una concentración de trabajo de 18 µg/ml (esto tiene como resultado una concentración final de 9 µg/ml). Se añaden 50 µl de ADC diluido a los 50 µl de células y el medio ya en el pocillo.
3. Incubar 72-96 horas (lo normal es 72 horas, pero vigilar la concentración de 0 µg/ml para detener el ensayo cuando las células llegan a un 85-95 % de confluencia).
- 50 4. Añadir 100 µl/pocillo del reactivo Promega Cell Titer Glo, agitar 3 minutos y leer en el luminómetro.

Resultados

55 La Figura 2 muestra un gráfico de SK-BR-3 viabilidad celular in vitro a 5 días frente a concentraciones de: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **101** (●), antiCD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **102** (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **103** (◆), y antiCD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **104**, donde Tr es anti HER2 tio trastuzumab 4D5 HC A118C, los mutantes del anticuerpo sometidos a ingeniería con cisteína en la cadena pesada se numeran mediante el esquema de numeración secuencial.

60 La proliferación de las células SK-BR-3 que expresan HER2 es inhibida de forma selectiva por los conjugados anticuerpo-fármaco antiHER2 **101** y **103**, pero no por los conjugados anticuerpo-fármaco antiCD22 **102** y **104**. Estos resultados confirman el efecto de destrucción selectiva dependiente de la diana in vitro de los conjugados anticuerpo-fármaco de PBD.

65 La Figura 3 muestra un gráfico de KPL-4 viabilidad celular in vitro a 5 días frente a concentraciones de: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **101** (●), antiCD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **102** (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-

PBD **103** (♦), y antiCD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **104** (▼), donde Tr es anti HER2 tio trastuzumab 4D5 HC A118C, los mutantes de anticuerpo sometidos a ingeniería con cisteína en la cadena pesada se numeran mediante el esquema de numeración secuencial.

5 Los conjugados anticuerpo-fármaco, trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **114** y trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **115** se analizaron de nuevo contra células SK-BR-3, KPL-4 y MCF-7 (Levenson y col. (1997) *Cancer Res.* 57(15):3071-3078) para medir la viabilidad celular *in vitro* en estudios de cinco días. El valor de la Cl_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para **114** contra SK-BR-3 fue de 17,2 y contra KPL-4 fue de 68,1. El valor de la Cl_{50} para **115** contra SK-BR-3 fue de 12,3 y contra KPL-4 fue de 50,7. Tanto **114** como **115** fueron inactivos de un modo eficaz contra MCF-7, que es una línea celular de adenocarcinoma de mama humano que no expresa HER2. Por tanto, los conjugados **114** y **115** demuestran potencia de destrucción celular dirigida.

Inhibición del crecimiento tumoral, eficacia in vivo en ratones transgénicos con explantes que expresan niveles altos de HER2

15 Se pueden obtener animales adecuados para experimentos transgénicos a partir de fuentes comerciales estándar tales como Taconic (Germantown, N.Y.). Son adecuadas muchas cepas, pero se prefieren ratones FVB hembra por su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Los ratones FVB macho se usaron para apareamiento y se usaron sementales CD.1 vasectomizados para estimular pseudogestación. Se pueden obtener ratones vasectomizados a partir de cualquier proveedor comercial. Los animales fundadores fueron criados con ratones FVB o con ratones heterocigotos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con heterocigosidad en el alelo p53 se usaron para incrementar potencialmente la formación del tumor. No obstante, esto se ha demostrado que es innecesario. Por tanto, algunos tumores F1 son de una cepa mixta. Los tumores fundadores son solo FVB. Se obtuvieron seis fundadores con algunos tumores en desarrollo sin tener camadas.

25 Los animales con tumores (aloinjerto propagado de ratones transgénicos Fo5 mmtv) fueron tratados con una o múltiples dosis mediante inyección IV de ADC. El volumen tumoral se evaluó a varios puntos de tiempo tras la inyección.

30 Los tumores se producen fácilmente en ratones transgénicos que expresan una forma mutacionalmente activada de neu, el homólogo en rata de HER2, pero HER2 que se sobreexpresa en los cánceres de mama humanos no está mutado y la formación del tumor es mucho menos sólida en ratones transgénicos que sobreexpresan HER2 no mutada (Webster y col. (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5:69-76).

35 Para mejorar la formación de tumor con HER2 no mutada, se produjeron ratones transgénicos usando un plásmido de ADNc de HER2 en el que se eliminó una ATG cadena arriba con el fin de prevenir el inicio de la traducción en dichos codones de ATG cadena arriba, lo que, por otro lado, reduciría la frecuencia del inicio de la traducción desde el codón de iniciación auténtico cadena debajo de HER2 (por ejemplo, véase Child y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 24335-24341). Adicionalmente se añadió un intrón quimérico en el extremo 5', que debería también potenciar el nivel de expresión, como se ha indicado anteriormente (Neuberger y Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713; Buchman y Berg (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:4395; Brinster y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836). El intrón quimérico derivó de un vector Promega, vector de expresión en mamíferos Pci-neo (pb 890-1022). El extremo 3' del ADNc está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona de crecimiento humana y las secuencias de poliadenilación. Además, se usaron ratones FVB porque esta cepa es más susceptible al desarrollo de tumores. El promotor de MMTV-LTR se usó para garantizar la expresión de HER2 específica de tejido en la glándula mamaria. Los animales se alimentaron con la dieta AIN 76A con el fin de aumentar la susceptibilidad de la formación de tumores (Rao y col. (1997) *Breast Cancer Res. y Treatment* 45:149-158).

Modelo de tumor mamario murino Fo5

50 El modelo Fo5 es un modelo de ratón transgénico en el que el gen HER2 humano, bajo la regulación transcripcional del promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV-HER2), se sobreexpresa en el epitelio mamario. La sobreexpresión produce el desarrollo espontáneo de tumores mamarios que sobreexpresan el receptor HER2 humano. El tumor mamario de uno de los animales fundadores (fundador nº 5 [Fo5]) se ha propagado en generaciones posteriores de ratones FVB mediante trasplante en serie de fragmentos tumorales. Antes de usarse para un estudio de eficacia in vivo, el tumor mamario transgénico MMTV-HER2 Fo5 se transplantó mediante cirugía en la almohadilla de grasa de mama nº 2/3 de ratones nu/nu (de Charles River Laboratories) en fragmentos que median aproximadamente 2 x 2 mm. Cuando los tumores alcanzaron los volúmenes deseados, los ratones portadores del tumor fueron aleatorizados y se les administró una única dosis mediante inyección IV del ADC.

Resultados

65 La Figura 4 muestra un gráfico del cambio de volumen tumoral medio in vivo en el tiempo en el modelo de cáncer de mama MMTV-HER2 Fo5 de tumores de aloinjerto mamario inoculados en ratones nu/nu CRL tras una única dosis iv el día 0 con: (1) Vehículo de histidina acetato 20mM, pH 5,5, sacarosa 240mM, (2) antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **107** a 10 /mg/kg, (3) antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **108** a 10 mg/kg, (4) Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-

PAB-PBD **101** a 10 mg/kg y (5) Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **103** a 10 mg/kg. Las líneas en la figura están indicadas con los símbolos siguientes:

Vehículo **107** **108** **101** **103**

- 5 Los conjugados anti-HER2 **101** y **103** mostraron inhibición del crecimiento tumoral específica de la diana. De los 10 animales tratados con el conjugado **101**, dos mostraron respuestas parciales. De los 10 animales tratados con el conjugado **103**, tres mostraron respuestas parciales. Los ADC control no dirigidos **107** y **108** no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento del tumor.
- 10 En otro estudio de ejemplo, el cambio de volumen tumoral medio in vivo en el tiempo en el modelo de cáncer de mama MMTV-HER2 Fo5 de tumores de aloinjerto mamario inoculados en ratones nu/nu CRL se midió tras una única dosis iv el día 0 con: (1) Vehículo histidina acetato 20mM, pH 5,5, sacarosa 240mM; (2) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD a 5 mg/kg (dosis de ADC), 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (exposición al fármaco con PBD); (3) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD a 10 mg/kg, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$; (4) **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD a 5 mg/kg, 284 $\mu\text{g}/\text{m}^2$;
- 15 (5) **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD a 10 mg/kg, 569 $\mu\text{g}/\text{m}^2$; (6) **113** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD a 10 mg/kg, 807 $\mu\text{g}/\text{m}^2$; y (7) **115** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD a 10 mg/kg, 790 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. El tamaño del tumor se midió a los 0, 3, 7 y 10 días. Tras 10 días se administró a los animales: (1) Vehículo mostraron un incremento del tamaño del tumor y ninguna inhibición del tumor en el grupo de 10 animales; (2) **112** mostró ausencia de respuestas parciales o completas en el grupo de 10 animales; (3) **112** mostró ausencia de respuestas parciales o completas en el grupo de 10 animales; (4) **114** mostró diez respuestas parciales en el grupo de 10 animales; (6) **113** mostró ausencia de respuestas parciales o completas en el grupo de 10 animales; y (7) **115** mostró diez respuestas parciales en el grupo de 10 animales. Por tanto, los ADC antiHER2 dirigidos **114** y **115** mostraron inhibición dirigida del tumor, mientras que el vehículo control negativo y los ADC no dirigidos **112** y **113** no lo hicieron.

25 Modelo de tumor de próstata humano LuCap35V

LuCap35V, obtenido de la University of Washington (Seattle, WA), es una Variante independiente de andrógenos del modelo de tumor de explante de próstata humano LuCap35 (Corey E, Quinn JE, Buhler KR, y col. LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence. The Prostate 2003;55:239-46). El tejido usado para establecer LuCap35 se aisló de la biopsia de los ganglios linfáticos inguinales que contienen cáncer de próstata metastásico y, después, se implantó en el flanco de los ratones (Corey y col. 2003). El modelo de explante LuCap35V se mantuvo mediante implantaciones en serie en ratones C.B-17 Fox Chase SCID macho castrados durante 38 pases en la University of Washington y, después, en ratones C.B-17 SCID-beige macho castrados de Charles River Laboratories para continuos pases en Genentech. Antes de usarse para un estudio de eficacia in vivo, las piezas de tumor LuCap35V (de aproximadamente 20-30 mm³) se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de los ratones C.B-17 SCID-beige macho castrados. Los animales fueron castrados 2 semanas antes de la implantación del tumor para dar tiempo a que los niveles residuales de testosterona alcanzaran un valor de cero. Cuando los tumores alcanzaron los volúmenes deseados, se aleatorios a los ratones portadores del tumor y se les administró una única dosis mediante inyección IV del ADC.

Resultados

45 La Figura 5 muestra un gráfico del cambio del volumen del tumor medio en el tiempo en el modelo de cáncer de próstata LuCap35V de tumores xenoinjertados en ratones SCID beige macho castrados tras una única dosis iv el día 0 con (1) Vehículo acetato de histidina 20mM a pH 5,5, sacarosa 240 mM (**▲**), (2) antiCD22-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **110** a 5 mg/kg (**○**), y (3) antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **109** a 5 mg/kg (**■**).

50 La Figura 6 muestra un gráfico del cambio del volumen tumoral medio in vivo en el tiempo en el modelo de cáncer de próstata LuCap35V de tumores xenoinjertados en ratones SCID beige macho castrados tras una única dosis iv el día 0 con (1) Vehículo histidina acetato 20mM, a pH 5,5, sacarosa 240 mM (**A**) (2) **107** antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 9,8 mg/kg, 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (**■**), (3) **107** antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 19,5 mg/kg, 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (**●**), (4) **108** antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 3,3 mg/kg, 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (**□**), (5) **108** antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 6,5 mg/kg, 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (**○**), (6) **105** trastuzumab-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 9.4 mg/kg, 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (**◆**) y (7) **106** trastuzumab-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 8,6 mg/kg (dosis de ADC), 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (exposición al fármaco de PBD) (**X**).

60 En otro estudio de ejemplo, el cambio del volumen del tumor medio en el tiempo en el modelo de cáncer de próstata LuCap35V de tumores xenoinjertados en ratones SCID beige macho castrados se midió tras una única dosis iv el día 0 con (1) Vehículo acetato de histidina 20mM a pH 5,5, sacarosa 240 mM (**▲**), (2) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 mg/kg (dosis de ADC), 68.3 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (exposición al fármaco de PBD), (3) **111** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 1 mg/kg, 22,15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, (4) **111** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 mg/kg, 66,4 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, (5) **113** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD a 3 mg/kg, 70,1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$; y (6) **109** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-

(imp)PBD 3 mg/kg, 64,6 µg/m². El tamaño del tumor se midió cada 4 días. Tras 27 días se administró a los animales: (1) Vehículo mostraron un incremento del tamaño del tumor y ninguna inhibición del tumor en el grupo de 8 animales; (2) **112** mostró una respuesta parcial del grupo de 8 animales; (3) **111** mostró cuatro respuestas parciales y cuatro respuestas completas en el grupo de 6 animales; (4) **111** mostró cinco respuestas parciales y tres respuestas completas en el grupo de 5 animales; (5) **113** mostró ausencia de respuestas parciales o completas en el grupo de 8 animales; y (6) **109** mostró siete respuestas parciales y una respuesta completa en el grupo de 7 animales. Los ADC antiSteap1 dirigidos **109** y **111** mostraron inhibición dirigida del tumor, mientras que el vehículo control negativo y los ADC no dirigidos **112** y **113** no lo hicieron.

10 Abreviaturas

	Ac	acetilo
	Acm	acetamidometilo
	Alloc	aliloxicarbonilo
15	Boc	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
	t-Bu	<i>tert</i> -butilo
	Bzl	bencilo, en el que Bzl-OMe es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno
	Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, en el que Z-Cl y Z-Br son cloro- y bromobenciloxi carbonilo, respectivamente
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
20	Dnp	dinitrofenilo
	DTT	ditiotreitolo
	Fmoc	9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmtoxycarbonilo
	imp	grupo protector de imina <i>N</i> -10: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB
	MC-OSu	maleimidocaproil- <i>O</i> - <i>N</i> -succinimida
25	Moc	metoxycarbonilo
	MP	maleimidopropanamida
	Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
	PAB	para-aminobenciloxicarbonilo
	PEG	etilenoxi
30	PNZ	carbamato de <i>p</i> -nitrobencilo
	Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
	TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
	TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo
	Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
35	Tos	tosilo
	Troc	cloruro de 2,2,2-tricloretoxicarbonilo
	Trt	tritilo
	Xan	xantilo

40 Referencias

EP 0522868
 EP 0875569
 EP 1295944
 EP 1347046
 EP 1394274
 EP 1394274
 EP 1439393
 JP 05003790
 JP 2004113151
 JP 58180487
 US 2001/055751
 US 2002/034749
 US 2002/042366
 US 2002/150573
 US 2002/193567
 US 2003/0228319
 US 2003/060612
 US 2003/064397
 US 2003/065143
 US 2003/091580

US 2003/096961
US 2003/105292
US 2003/109676
US 2003/118592
US 2003/119121
US 2003/119122
US 2003/119125
US 2003/119126
US 2003/119128
US 2003/119129
US 2003/119130
US 2003/119131
US 2003/124140
US 2003/124579
US 2003/129192
US 2003/134790-A1
US 2003/143557
US 2003/157089
US 2003/165504
US 2003/185830
US 2003/186372
US 2003/186373
US 2003/194704
US 2003/206918
US 2003/219806
US 2003/224411
US 2003/224454
US 2003/232056
US 2003/232350
US 20030096743
US 20030130189
US 2003096743
US 2003130189
US 2004/0001827
US 2004/005320
US 2004/005538
US 2004/005563
US 2004/005598
US 2004/0101899
US 2004/018553
US 2004/022727
US 2004/044179
US 2004/044180
US 2004/101874
US 2004/197325
US 2004/249130
US 20040018194
US 20040052793
US 20040052793
US 20040121940
US 2005/271615
US 2006/116422
US 4816567

US 5362852
US 5440021
US 5583024
US 5621002
US 5644033
US 5674713
US 5700670
US 5773223
US 5792616
US 5854399
US 5869445
US 5976551
US 6011146
US 6153408
US 6214345
US 6218519
US 6268488
US 6518404
US 6534482
US 6555339
US 6602677
US 6677435
US 6759509
US 6835807
US 7223837
US 7375078
US 7521541
US 7723485
WO 00/012508
WO 00/12507
WO 00/12508
WO 01/16318
WO 01/45746
WO 02/088172
WO 03/026577
WO 03/043583
WO 04/032828
WO 2000/12130
WO 2000/14228
WO 2000/20579
WO 2000/22129
WO 2000/32752
WO 2000/36107
WO 2000/40614
WO 2000/44899
WO 2000/55351
WO 2000/75655
WO 200053216
WO 2001/00244
WO 2001/38490
WO 2001/40269
WO 2001/40309
WO 2001/41787

WO 2001/46232
WO 2001/46261
WO 2001/48204
WO 2001/53463
WO 2001/57188
WO 2001/62794
WO 2001/66689
WO 2001/72830
WO 2001/72962
WO 2001/75177
WO 2001/77172
WO 2001/88133
WO 2001/90304
WO 2001/94641
WO 2001/98351
WO 2002/02587
WO 2002/02624
WO 2002/06317
WO 2002/06339
WO 2002/101075
WO 2002/10187
WO 2002/102235
WO 2002/10382
WO 2002/12341
WO 2002/13847
WO 2002/14503
WO 2002/16413
WO 2002/16429
WO 2002/22153
WO 2002/22636
WO 2002/22660
WO 2002/22808
WO 2002/24909
WO 2002/26822
WO 2002/30268
WO 2002/38766
WO 2002/54940
WO 2002/59377
WO 2002/60317
WO 2002/61087;
WO 2002/64798
WO 2002/71928
WO 2002/72596
WO 2002/78524
WO 2002/81646
WO 2002/83866
WO 2002/86443
WO 2002/88170
WO 2002/89747
WO 2002/92836
WO 2002/94852
WO 2002/98358
WO 2002/99074

WO 2002/99122
WO 2003/000842
WO 2003/002717
WO 2003/003906
WO 2003/003984
WO 2003/004989
WO 2003/008537
WO 2003/009814
WO 2003/014294
WO 2003/016475
WO 2003/016494
WO 2003/018621
WO 2003/022995
WO 2003/023013
WO 2003/024392
WO 2003/025138
WO 2003/025148
WO 2003/025228
WO 2003/026493
WO 2003/029262
WO 2003/029277
WO 2003/029421
WO 2003/034984
WO 2003/035846
WO 2003/042661
WO 2003/045422
WO 2003/048202
WO 2003/054152
WO 2003/055439
WO 2003/055443
WO 2003/062401
WO 2003/062401
WO 2003/072035
WO 2003/072036
WO 2003/077836
WO 2003/081210
WO 2003/083041
WO 2003/083047
WO 2003/083074
WO 2003/087306
WO 2003/087768
WO 2003/088808
WO 2003/089624
WO 2003/089904
WO 2003/093444
WO 2003/097803
WO 2003/101283
WO 2003/101400
WO 2003/104270
WO 2003/104275
WO 2003/105758
WO 2003004529
WO 2003042661

WO 2003104399
WO 2004/000997
WO 2004/001004
WO 2004/009622
WO 2004/011611
WO 2004/015426
WO 2004/016225
WO 2004/020595
WO 2004/022709
WO 2004/022778
WO 2004/027049
WO 2004/031238
WO 2004/032828
WO 2004/032842
WO 2004/040000
WO 2004/043361
WO 2004/043963
WO 2004/044178
WO 2004/045516
WO 2004/045520
WO 2004/045553
WO 2004/046342
WO 2004/047749
WO 2004/048938
WO 2004/053079
WO 2004/063355
WO 2004/063362
WO 2004/063709
WO 2004/065577
WO 2004/074320
WO 2004000221
WO 2004020583
WO 2004042346
WO 2004065576
WO 2005/023814
WO 2005/082023
WO 2005/085251
WO 2006/111759
WO 2007/044515
WO 2007/085930
WO 2009/052249
WO 2010/091150
WO 91/02536
WO 92/07574
WO 92/17497
WO 94/10312
WO 94/28931
WO 9630514
WO 97/07198
WO 97/44452
WO 98/13059
WO 98/37193
WO 98/40403

WO 98/51805
 WO 98/51824
 WO 99/28468
 WO 99/46284
 WO 99/58658

Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)
 Amiel J., y col. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996
 Amir y col. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499
 Amsberry, y col. (1990) J. Org. Chem. 55:5867
 Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186
 Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998)
 Arai H., y col. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993
 Arai H., y col. Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992
 Arima, y col., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)
 Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995
 Auricchio A., y col. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996
 Barel M., y col. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998
 Barella y col. (1995) Biochem. J. 309:773-779
 Barnett T., y col. Genomics 3, 59-66, 1988
 Beck y col. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441
 Beck y col. (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13
 Berge, y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999)
 Blood (2002) 100 (9):3068-3076
 Blood 99 (8):2662-2669 (2002)
 Blumberg H., y col. Cell 104, 9-19, 2001
 Bose, y col., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)
 Bourgeois C., y col. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997
 Brinster y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836
 Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395
 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)
 Carl y col. (1981) J. Med. Chem. 24:479-480
 Carlsson y col. (1978) Biochem. J. 173:723-737
 Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357
 Cell 109 (3):397-407 (2002)
 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288
 Chakravarty y col. (1983) J. Med. Chem. 26:638-644
 Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991)
 Child y col. (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341
 Cho H.-S., y col. Nature 421, 756-760, 2003
 Ciccodicola, A., y col. EMBO J. 8(7):1987-1991 (1989)
 Clackson y col. (1991) Nature, 352:624-628
 Clark H.F., y col. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003
 Corey E, Quinn JE, Buhler KR, y col. LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence. The Prostate 2003;55:239-46
 Coussens L., y col. Science (1985) 230(4730):1132-1139
 Cree y col. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404
 Crouch y col. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88
 Davis y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777
 de Groot y col. (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830
 de Groot y col. (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494
 Dennis y col. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of

- Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043
- Dobner y col.(1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799
- Dornan y col.(2009) Blood 114(13):2721-2729
- Doronina y col.(2006) Bioconj. Chem. 17:114-124
- Dubowchik y col. Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869
- Dubowchik, y col. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60
- Dumoutier L., y col.J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001
- E. Schröder and K. Lübke, The Peptides, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press
- Ehsani A., y col.(1993) Genomics 15, 426-429
- Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994
- Elshourbagy N.A., y col.J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993
- Erickson y col.(2006) Cancer Res. 66(8):1-8
- Feild, J.A., y col.(1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582
- Fields, G. y Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizando 9-fluoroenilmetoxicarbonil aminoácidos", Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214
- Fuchs S., y col.Mol. Med. 7, 115-124, 2001
- Fujisaku y col.(1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125)
- Gary S.C., y col.Gene 256, 139-147, 2000
- Gaugitsch, H.W., y col.(1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273)
- Geiser y col."Automation of solid-phase peptide synthesis" en Macromolecular Sequencing y Synthesis, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218
- Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003)
- Genomics 62 (2):281-284 (1999)
- Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146
- Getz y col.(1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80
- Glynn-Jones y col.(2001) Int J Cancer. Oct 15; 94(2):178-84
- Gregson y col., Chem. Commun. 1999, 797-798
- Gregson y col., J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174
- Gu Z., y col.Oncogene 19, 1288-1296, 2000
- Ha y col.(1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531
- Haendler B., y col.J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992
- Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087-1103
- Hamblett y col.(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070
- Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, USA)
- Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994
- Hara, y col., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988)
- Hashimoto y col.(1994) Immunogenetics 40(4):287-295
- Hay y col. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237
- Herdwijn, P. y col., Canadian Journal of Chemistry. 1982, 60, 2903-7
- Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242
- Hochlowski, y col., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)
- Hofstra R.M.W., y col.Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997
- Hofstra R.M.W., y col.Nat. Genet. 12, 445-447, 1996
- Horie y col.(2000) Genomics 67:146-152
- Hubert, R.S., y col.(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528)
- Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)
- Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002)
- Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)
- Itoh, y col., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)
- J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)
- J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)
- J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002)
- J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)

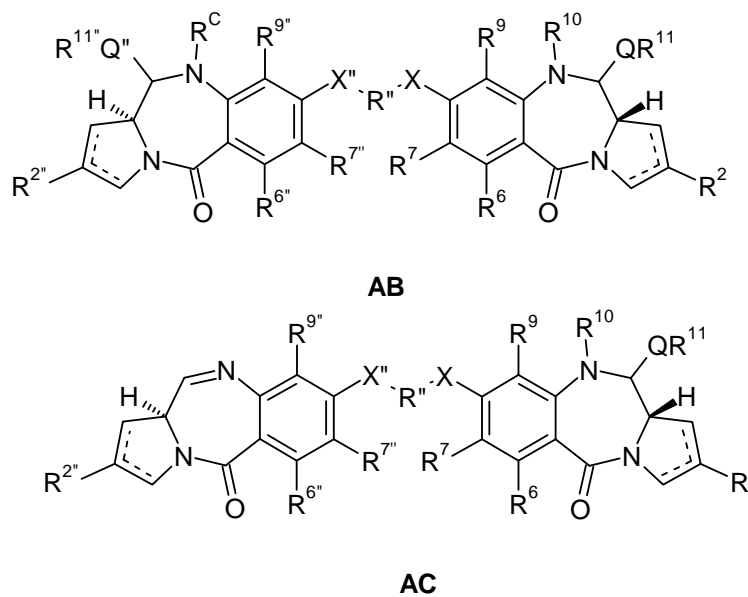
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, Nueva York
- Jeffrey y col.(2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358
- Jonsson y col.(1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413
- Junutula, y col., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932
- Kang, G-D., y col., *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689
- Kasahara y col.(1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68
- King y col.(2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990
- Kingsbury y col.(1984) *J. Med. Chem.* 27:1447
- Kohler y col.(1975) *Nature* 256:495
- Kohn, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 3-11 (1975).
- Konishi, y col., *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)
- Kovtun y col.(2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121
- Kuhns J.J., y col.*J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999
- Kuminoto, y col., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)
- Kurebayashi y col.(1999) *Brit. Jour. Cancer* 79(5-6):707-717
- Lab. Invest.* 82 (11):1573-1582 (2002)
- Lambert J. (2005) *Current Opin. en Pharmacol.* 5:543-549
- Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)
- Larhammar y col.(1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
- Law y col.(2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337
- Le y col.(1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199
- Leber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)
- Leimgruber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)
- Leimgruber, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965)
- Levenson y col.(1997) *Cancer Res.* 57(15):3071-3078
- Liang y col.(2000) *Cancer Res.* 60:4907-12
- Manfré, F. y col., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065
- Marks y col.(1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597
- McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.*, 19(7): 299-307
- Mendoza y col.(2002) *Cancer Res.* 62:5485-5488
- Miller y col.(2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861
- Miura y col.(1996) *Genomics* 38(3):299-304
- Miura y col.(1998) *Blood* 92:2815-2822
- Moore M., y col.*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987
- Morrison y col.(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855
- Muller y col.(1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625
- Mungall A.J., y col.*Nature* 425, 805-811, 2003
- Nagase T., y col.(2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150)
- Nakamuta M., y col.*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991
- Nakayama y col.(2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127
- Naruse y col.(2002) *Tissue Antigens* 59:512-519
- Nature* 395 (6699):288-291 (1998)
- Neuberger and Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713
- Novabiochem Catalog* 2006/2007
- Ogawa Y., y col.*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991
- Okamoto Y., y col.*Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997
- Oncogene* 10 (5):897-905 (1995)
- Oncogene* 14(11):1377-1382 (1997))
- Parrish-Novak J., y col.*J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002
- Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212
- Pingault V., y col.(2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206
- Pletnev S., y col.(2003) *Biochemistry* 42:12617-12624
- Preud'homme y col.(1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999)
Protective Groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts, 3rd Edition, 1999, John Wiley & Sons Inc.
Puffenberger E.G., y col. Cell 79, 1257-1266, 1994
Rao y col. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158
Reiter R.E., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998
Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000
Rodrigues y col. (1995) Chemistry Biology 2:223
Ross y col. (2002) Cancer Res. 62:2546-2553
S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York
Sakaguchi y col. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464
Sakamoto A., Yanagisawa M., y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991
Sanderson y col. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852
Semba K., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985
Serenius y col. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766
Shamis y col. (2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731
Sheikh F., y col. (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010
Shimizu, et al, J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982)
Sinha S.K., y col. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320
Storm y col. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815
Strausberg y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903
Sun y col. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215
Sun y col. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768
Svensson P.J., y col. Hum. Genet. 103, 145-148, 1998
Swiercz J.M., y col. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004
Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614
Takeuchi, y col., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)
Tawaragi Y., y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988
ten Dijke, P., y col. Science 264 (5155):101-104 (1994)
Thompson, J.S., y col. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001) WO 2004/058309
Thurston, y col., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990)
Thurston, y col., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)
Toki y col. (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872
Tonnelle y col. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847
Touchman y col. (2000) Genome Res. 10:165-173
Trail y col. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337
Tsunakawa, y col., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)
Tsutsumi M., y col. Gene 228, 43-49, 1999
Uchida y col. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602
Verheij J.B., y col. Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002
Von Hoegen y col. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877
Webster y col. (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76
Weis J.J., y col. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988
Weis J.J., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986
Wilson y col. (1991) J. Exp. Med. 173:137-146
Wu y col. (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145
Xie y col. (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291
Xu, M.J., y col. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775 WO 2004/016225
Xu, X.Z., y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001)
Yamaguchi, N., y col. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994)

Yamamoto T., y col. Nature 319, 230-234, 1986
Yu y col. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de Fórmula (AB) o (AC):



y sales y solvatos del mismo, en el que:

las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;
 R^2 se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente se selecciona adicionalmente entre halo o dihalo;

en los que R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H y halo;

R^6 y R^9 se seleccionan independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R^7 se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R^{10} es un enlazador conectado a un agente de unión a célula seleccionado entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico;

Q se selecciona independientemente entre O, S y NH;

R^{11} es H o R o, cuando Q es O, SO₃M, en el que M es un catión metálico;

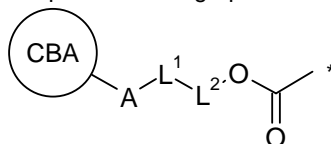
cada uno de R y R' se selecciona independientemente entre los grupos opcionalmente sustituidos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, y opcionalmente en relación al grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4, 5, 6 ó 7 miembros;

R'' es un grupo alqueno C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos por NH₂;

cada X es O, S o N(H); y

en el que R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , X'', Q'' y R^{11} son como se han definido de acuerdo con R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , X, Q y R^{11} respectivamente, y R^C es un grupo de terminación.

2. Conjugado, según la reivindicación 1, en el que R^{10} es un grupo:



en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, CBA es un agente de unión a célula, L¹ es un enlazador escindible, A es un grupo de conexión que conecta L¹ al agente de unión a célula, L² es un enlace covalente o, junto con -OC(=O)-, forma un enlazador de auto-destrucción.

3. Conjugado, según la reivindicación 2, en el que L¹ es una enzima escindible.

4. Conjugado, según la reivindicación 3, en el que L¹ comprende un dipéptido y el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, se selecciona entre:

-Phe-Lys-,
 -Val-Ala-,
 -Val-Lys-,
 -Ala-Lys-,
 -Val-Cit-,
 -Phe-Cit-,
 -Leu-Cit-,
 -Ile-Cit-,
 -Phe-Arg-,
 -Trp-Cit-.

5

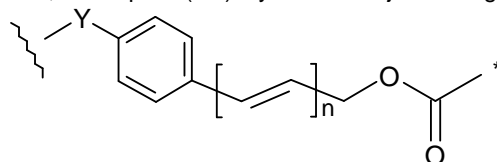
5. Conjugado, según la reivindicación 4, en el que el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, es -Phe-Lys-, -Val-Ala- o -Val-Cit-.

15 6. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el grupo X_2-CO- está conectado a L^2 , y el grupo $NH-X_1-$ está conectado a A.

7. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que L^2 junto con $OC(=O)$ forma un enlazador de auto-destrucción.

20

8. Conjugado, según la reivindicación 7, en el que $C(=O)O$ y L^2 forman juntos el grupo:



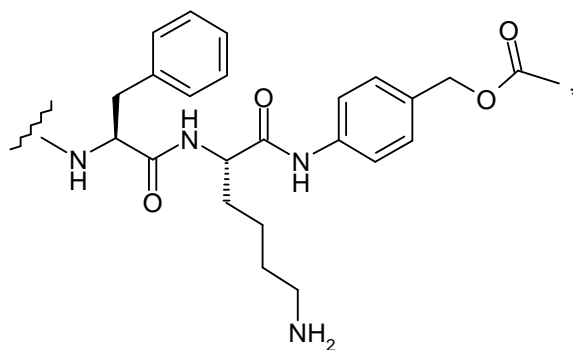
en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, la línea ondulada indica el punto de unión al enlazador L^1 , Y es NH, O, $C(=O)NH$ o $C(=O)O$, y n es de 0 a 3.

25

9. Conjugado, según la reivindicación 8, en el que Y es NH, y n es 0.

10. Conjugado, según la reivindicación 2, en el que L^1 y L^2 junto con $-OC(=O)-$ comprenden un grupo seleccionado entre:

30

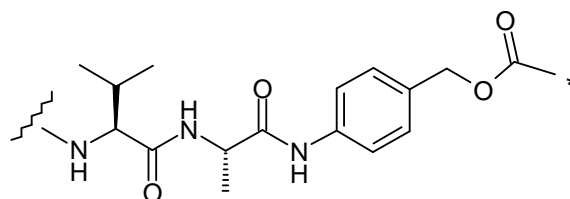


35

40

45

o



50

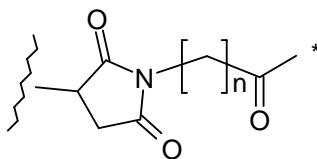
55

en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, y la línea ondulada indica el punto de unión a A.

11. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que A es:

(i)

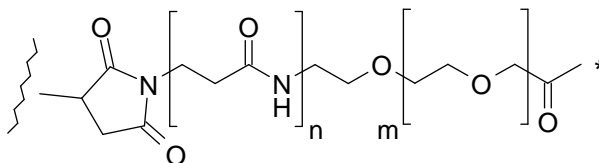
5



10 en el que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, y n es de 0 a 6; o

(ii)

15



20

en el que el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión a célula, n es 0 ó 1, y m es de 0 a 30.

25 12. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el agente de unión a célula está conectado a A a través de un enlace tioéter formado a partir de un residuo de tiol de cisteína del agente de unión a célula y un grupo maleimida de A.

30 13. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de unión a célula de R¹⁰ es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo.

14. Conjugado, según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para un antígeno asociado a tumor.

35 15. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R⁹ es independientemente H y R⁶ es independientemente H.

16. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R⁷ es independientemente OMe.

40 17. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X es O.

18. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R¹¹ es H.

45 19. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las líneas de puntos indican la presencia opcional de un doble enlace entre C2 y C3.

20. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R² se selecciona independientemente entre H, =O, =CH₂, R, =CH-R^D y =C(R^D)₂.

50 21. Conjugado, según la reivindicación 20, en el que R² es independientemente =CH₂.

22. Conjugado, según la reivindicación 20, en el que R² es independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido.

55 23. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que Rⁿ es un grupo alquileo C₃ o un grupo alquileo C₅.

24. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que R^C puede eliminarse de la posición N10 para dejar un enlace imina N10-C11.

60 25. Conjugado, según la reivindicación 24, en el que R^C es un grupo protector de carbamato seleccionado entre:

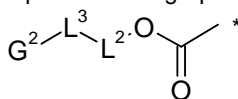
Alloc
Fmoc
Boc
Troc
Teoc
Psec

65

Cbz
PNZ.

26. Conjugado, según la reivindicación 24, en el que R^C es un grupo:

5



10 en el que el asterisco indica el punto de unión a la posición N10, G² es un grupo de terminación, L³ es un enlace covalente o un enlazador escindible L¹, L² es un enlace covalente o, junto con OC(=O), forma un enlazador de auto-destrucción.

15 27. Conjugado, según la reivindicación 26, en el que L³ es un enlazador escindible L¹, y se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

20 28. Conjugado, según la reivindicación 26 o reivindicación 27, en el que L² junto con OC(=O) forma un enlazador de auto-destrucción, y el enlazador de auto-destrucción es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.

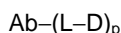
29. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que G² es Ab o Moc, o es un grupo protector de carbamato seleccionado entre:

25 Alloc
Fmoc
Boc
Troc
Teoc
Psec
Cbz
30 PNZ.

30. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en terapia.

35 31. Conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto, en el que la enfermedad es cáncer.

32. Conjugado que tiene la fórmula:



40 en el que Ab es un anticuerpo unido mediante un grupo enlazador (L) al grupo farmacológico PBD (D) de fórmula (AB) o (AC), y p es un número entero de 1 a aproximadamente 8, en el que el grupo enlazador (L) y el grupo farmacológico PBD (D) de fórmula (AB) o (AC) es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

45 33. Conjugado, según la reivindicación 32, en el que Ab es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de la superficie celular seleccionados entre (1)-(36):

- 50 (1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea de tipo IB);
(2) E16 (LAT1, SLC7A5);
(3) STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata)
(4) 0772P (CA125, MUC16);
(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina);
(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia 34 de transportadores de soluto (fosfato sódico), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio de tipo II.);
(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B).
55 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, gen de RIKEN ADNc 2700050C12);
(9) ETBR (receptor de tipo B de la endotelina);
60 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, seis antígenos epiteliales transmembrana de la próstata 2, seis proteínas prostáticas transmembrana);
(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, potencial canal catiónico del receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4);
65 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);

(14) CD21 (CR2 (receptor 2 del complemento) o C3DR (receptor C3d/del virus de Epstein Barr) o Hs 73792);

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociado a inmunoglobulina), B29);

5 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);

(17) HER2;

(18) NCA;

(19) MDP;

(20) IL20R α ;

10 (21) Brevican;

(22) EphB2R;

(23) ASLG659;

(24) PSCA;

(25) GEDA;

15 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLyS 3, BR3);

(27) CD22 (receptor de células B, isoforma CD22-B);

(28) CD79a (CD79A, CD79 α , alfa asociada con inmunoglobulina);

(29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt);

20 (30) HLA-DOB (subunidad beta de la molécula de clase II del MHC (antígeno Ia));

(31) P2X5 (canal iónico 5 aplicado al ligando P2X del receptor purinérgico);

(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de las células B, Lyb-2);

(33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo 1 de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR);

(34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc);

25 (35) IRTA2 (receptor de la superfamilia de las inmunoglobulinas 2 asociado a la translocación); y

(36) TENB2 (posible proteoglicano transmembrana).

34. Conjugado, según la reivindicación 42, en el que el Ab es un anticuerpo modificado con cisteína.

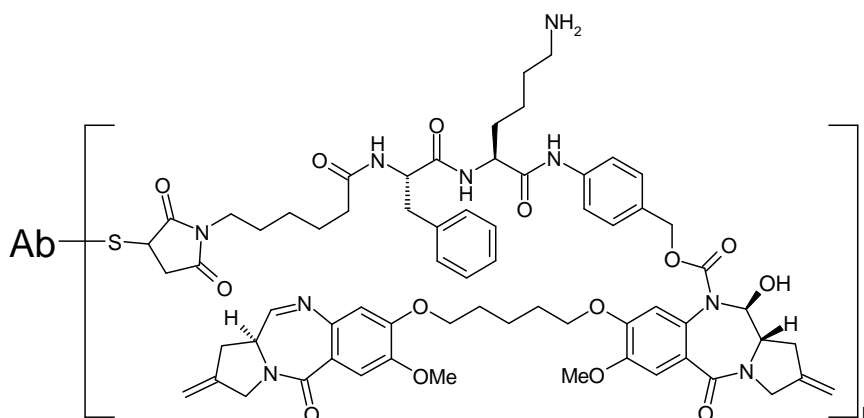
30 35. Conjugado, según la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en el que el Ab es un anticuerpo que se une a un receptor ErbB.

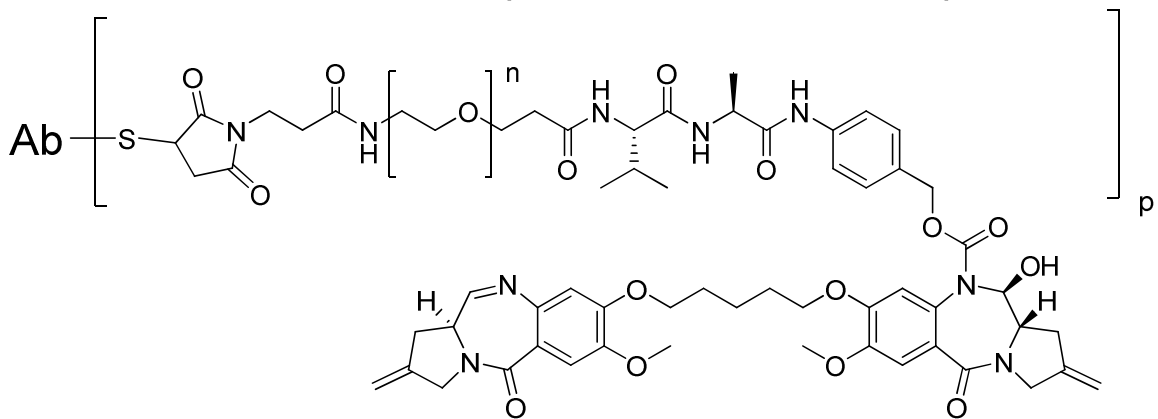
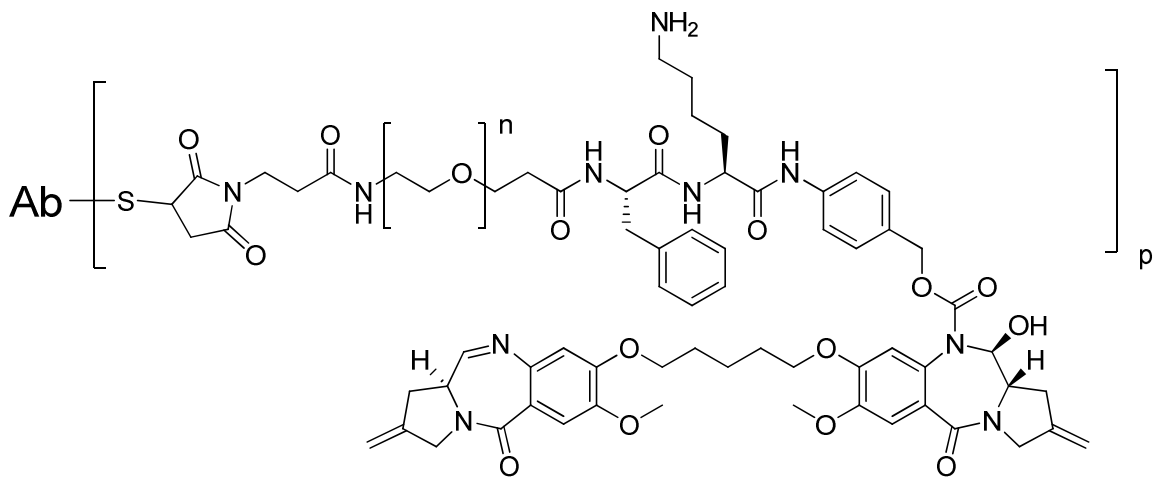
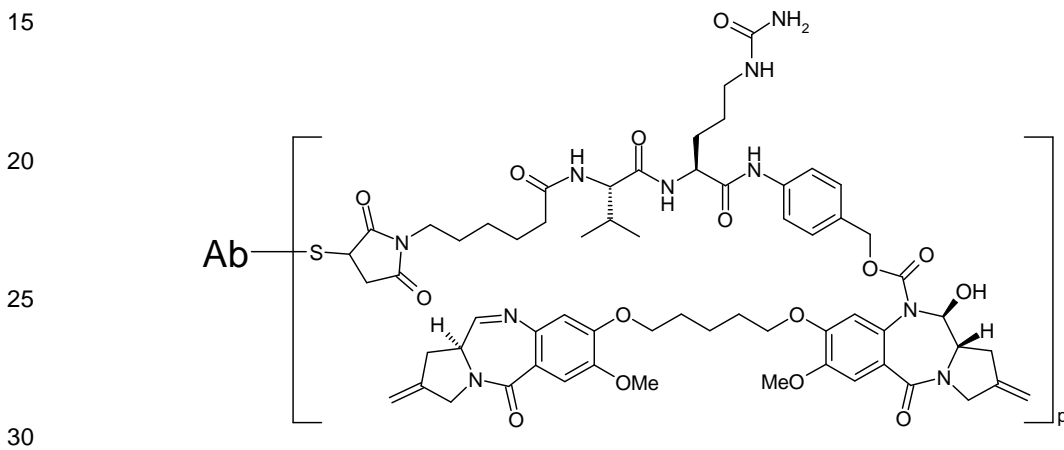
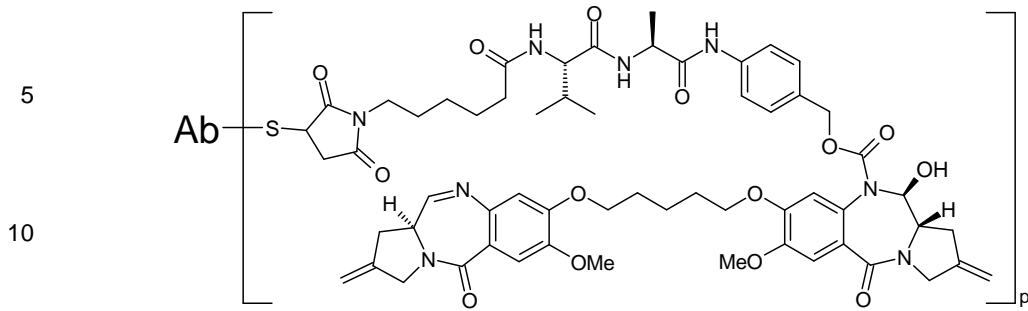
36. Conjugado, según la reivindicación 35, en el que el Ab es trastuzumab.

35 37. Conjugado, según la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en el que el Ab es un anticuerpo anti-HER2, anti-Steap 1 o anti-CD22.

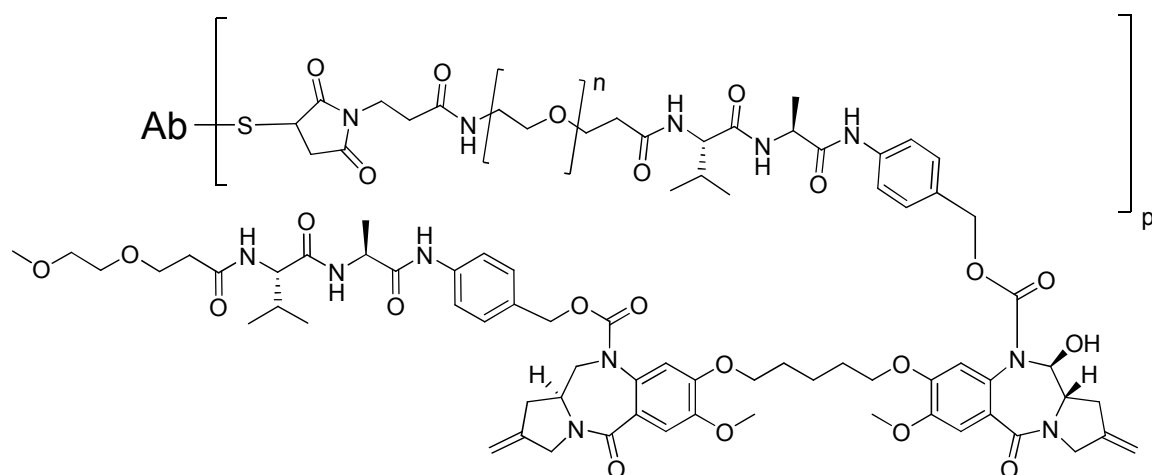
38. Conjugado, según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 37, en el que p es 1, 2, 3 ó 4.

40 39. Conjugado, según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 38, que tiene una fórmula seleccionada entre:





y



en el que n es un número entero de 1 a 24.

5

40. Conjugado, según la reivindicación 39, en el que n es un número entero de 1 a 12.

41. Conjugado, según la reivindicación 40, en el que n es 4 u 8.

42. Composición farmacéutica que comprende el conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o las reivindicaciones 32 a 41, un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

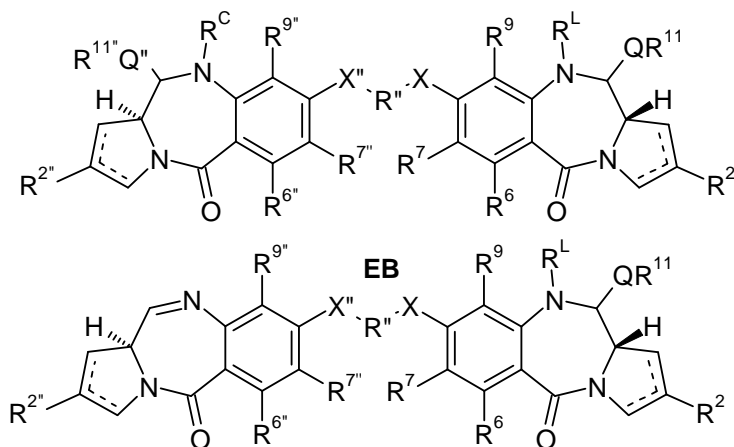
43. Composición farmacéutica, según la reivindicación 42, que comprende adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico.

15

44. Uso de un conjugado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 o las reivindicaciones 32 a 41, en la preparación de un medicamento para utilizar en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

45. Compuesto de fórmula (EB) o (EC):

20



25

30

35

EC

40

y sales y solvatos del mismo, en el que

las líneas de puntos indican la presencia opcional de a doble enlace entre C1 y C2 o C2 y C3;

R² se selecciona independientemente entre H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R y COR, y opcionalmente se selecciona adicionalmente entre halo o dihalo;

45

en los que R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H, y halo; R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R⁷ se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo;

R^L es un enlazador para la conexión a un agente de unión a célula seleccionado entre un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión y un polipéptido cíclico;

50

Q se selecciona independientemente entre O, S y NH;

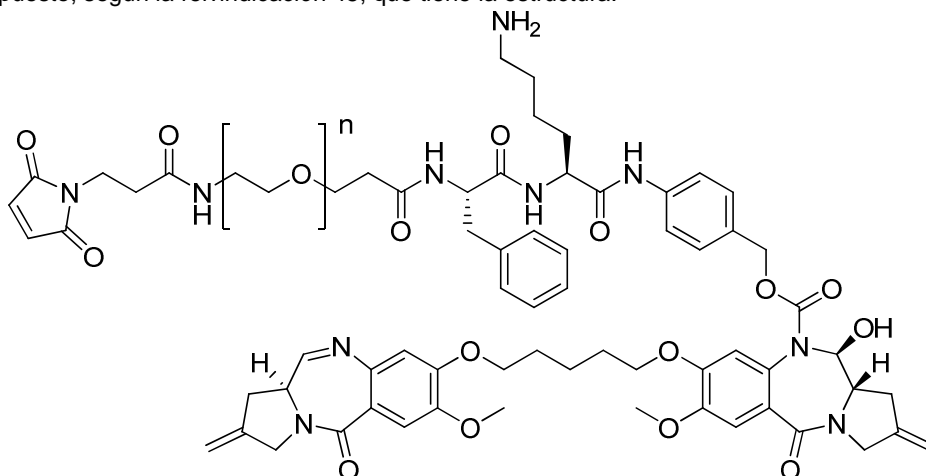
R¹¹ es H, o R o, cuando Q es O, R¹¹ es SO₃M, en el que M es un catión metálico; cada uno de R y R' se selecciona independientemente entre los grupos opcionalmente sustituidos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, y opcionalmente en relación al grupo NRR', R y R' junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4, 5, 6 ó 7 miembros;

5 R" es un grupo alquileo C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo benceno o piridina, estando dichos anillos opcionalmente sustituidos con NH₂;

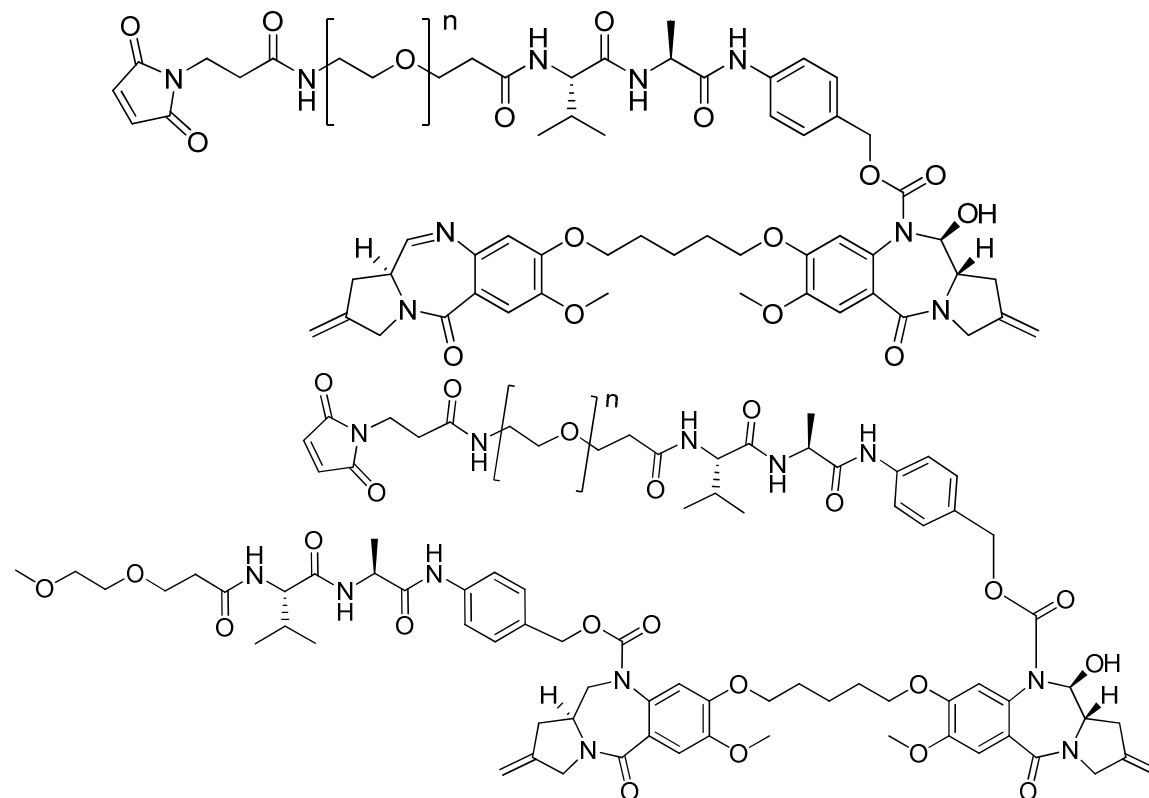
cada X es O, S o N(H); y

10 en el que R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹, Q" y X" son como se han definido de acuerdo con R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹¹, Q y X respectivamente, y R^C es un grupo de terminación; en el que R^t es diferente a R^C.

46. Compuesto, según la reivindicación 45, que tiene la estructura:



15



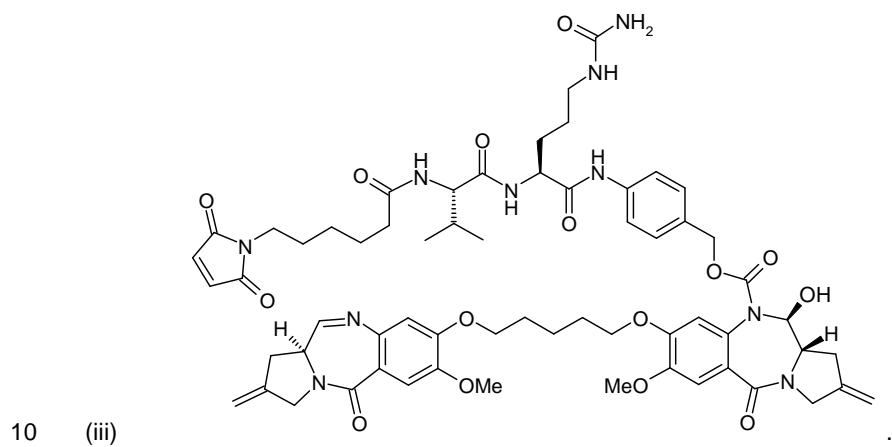
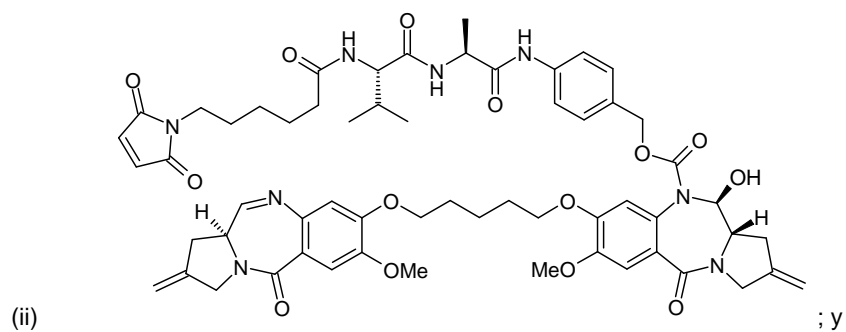
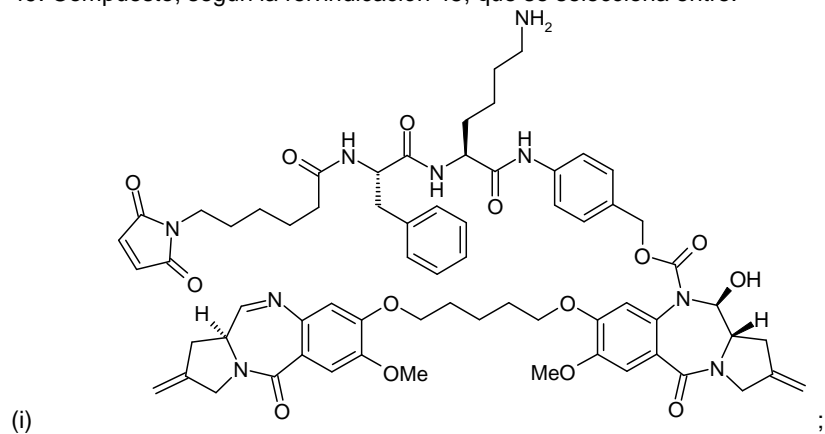
20

en la que n es un número entero de 1 a 24.

47. Compuesto, según la reivindicación 46, en el que n es un número entero de 1 a 12.

48. Compuesto, según la reivindicación 47, en el que n es 4 u 8.

5 49. Compuesto, según la reivindicación 45, que se selecciona entre:



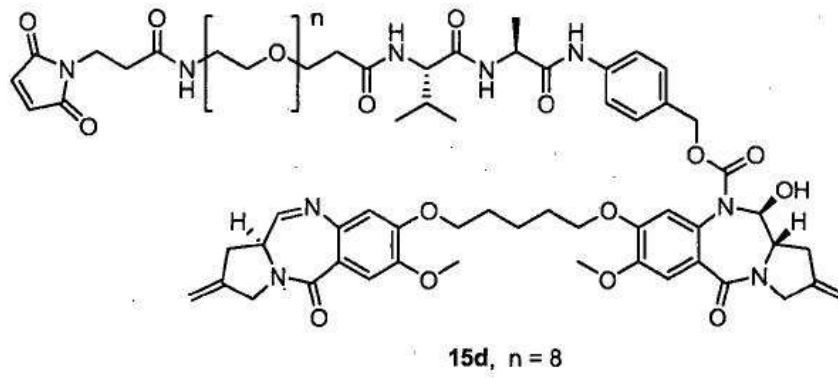
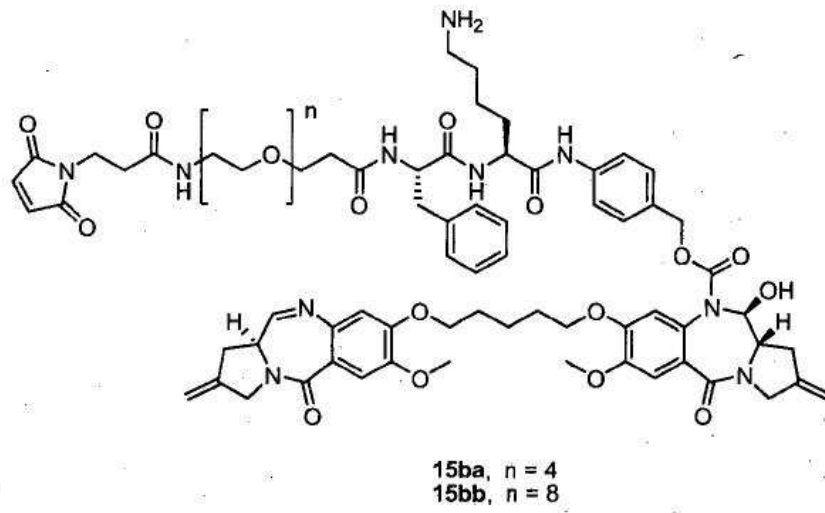


Figura 1a

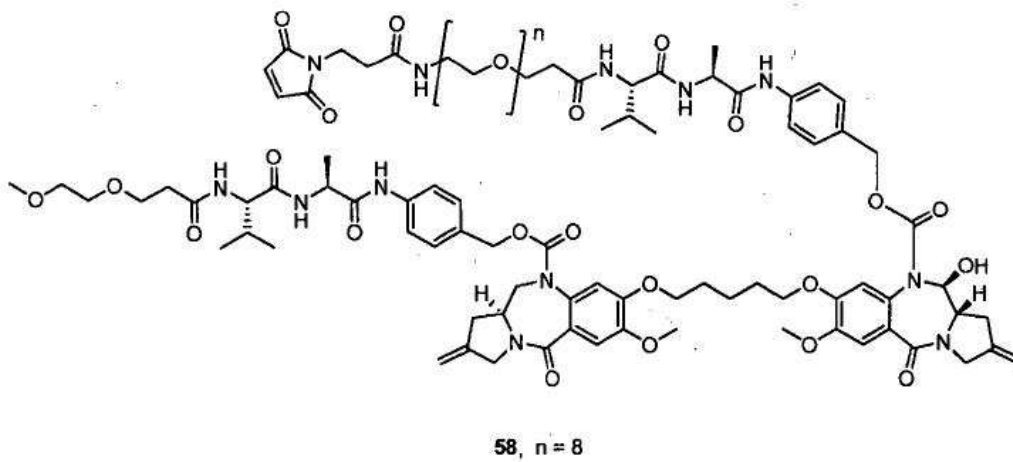


Figura 1b

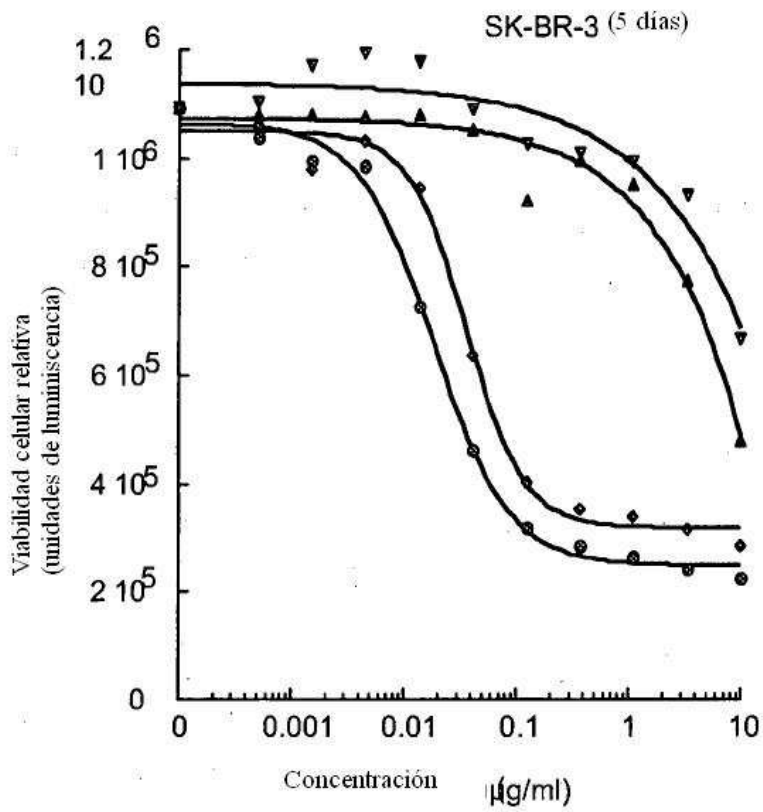


Figura 2

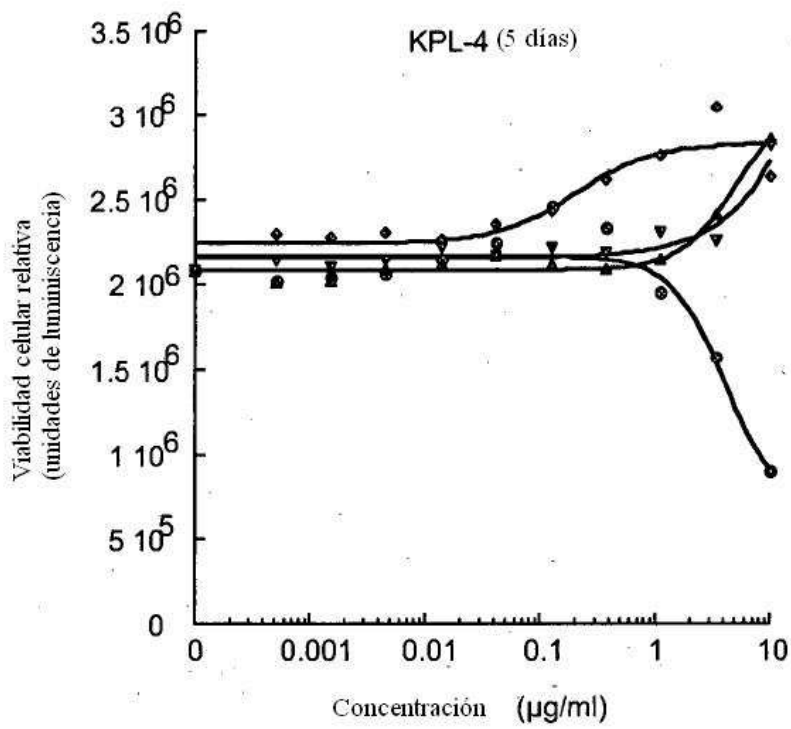


Figura 3

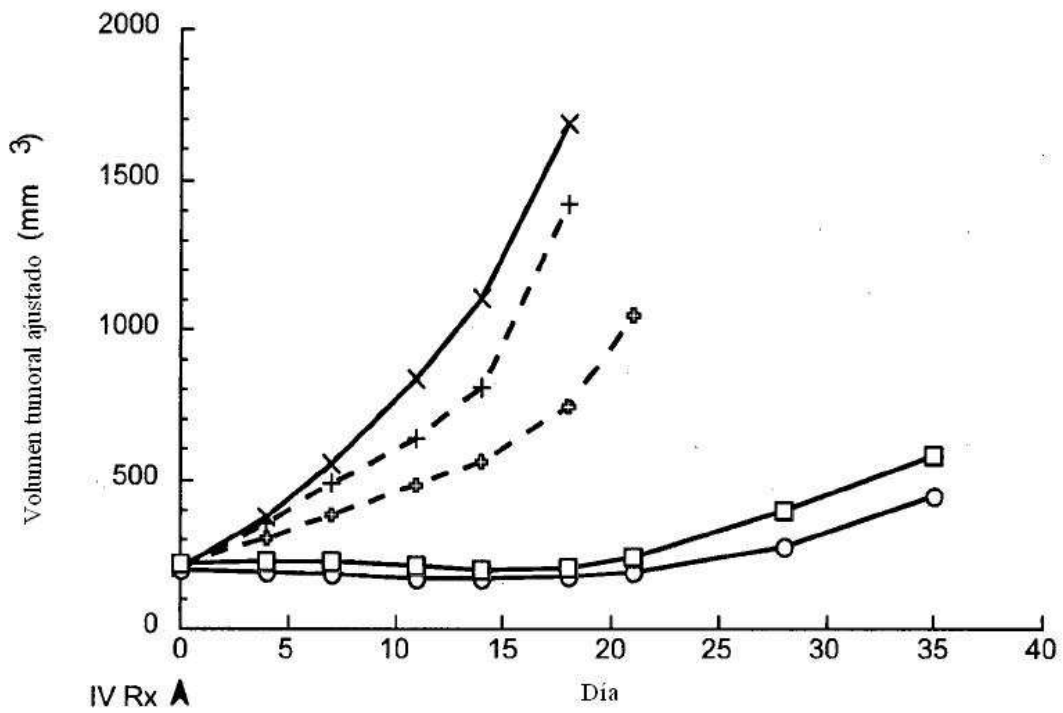


Figura 4

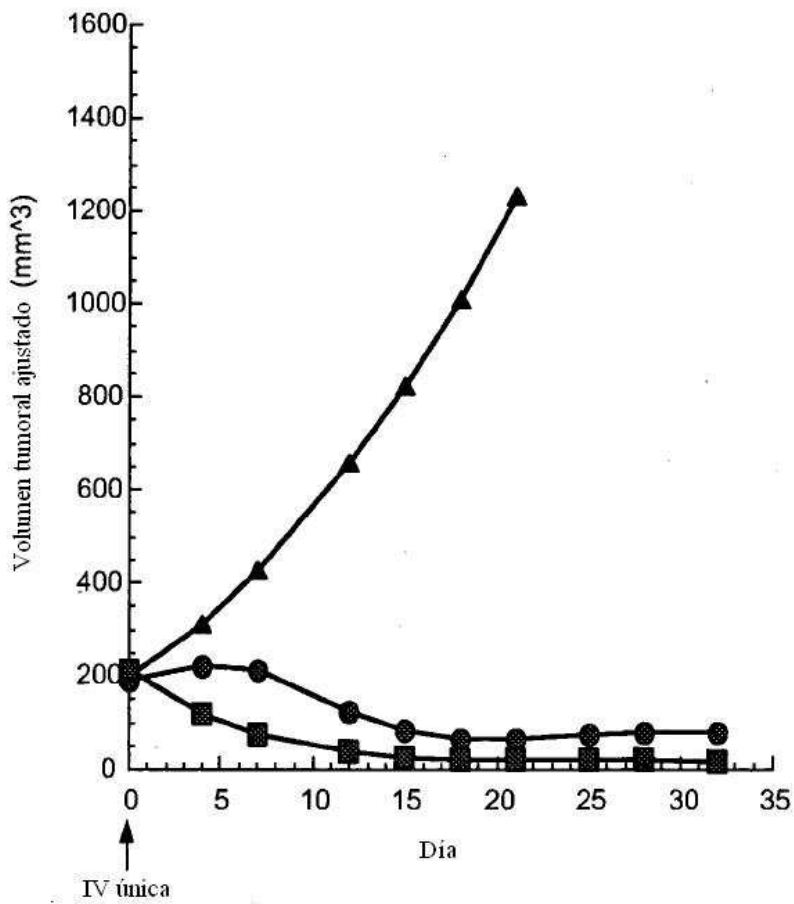


Figura 5

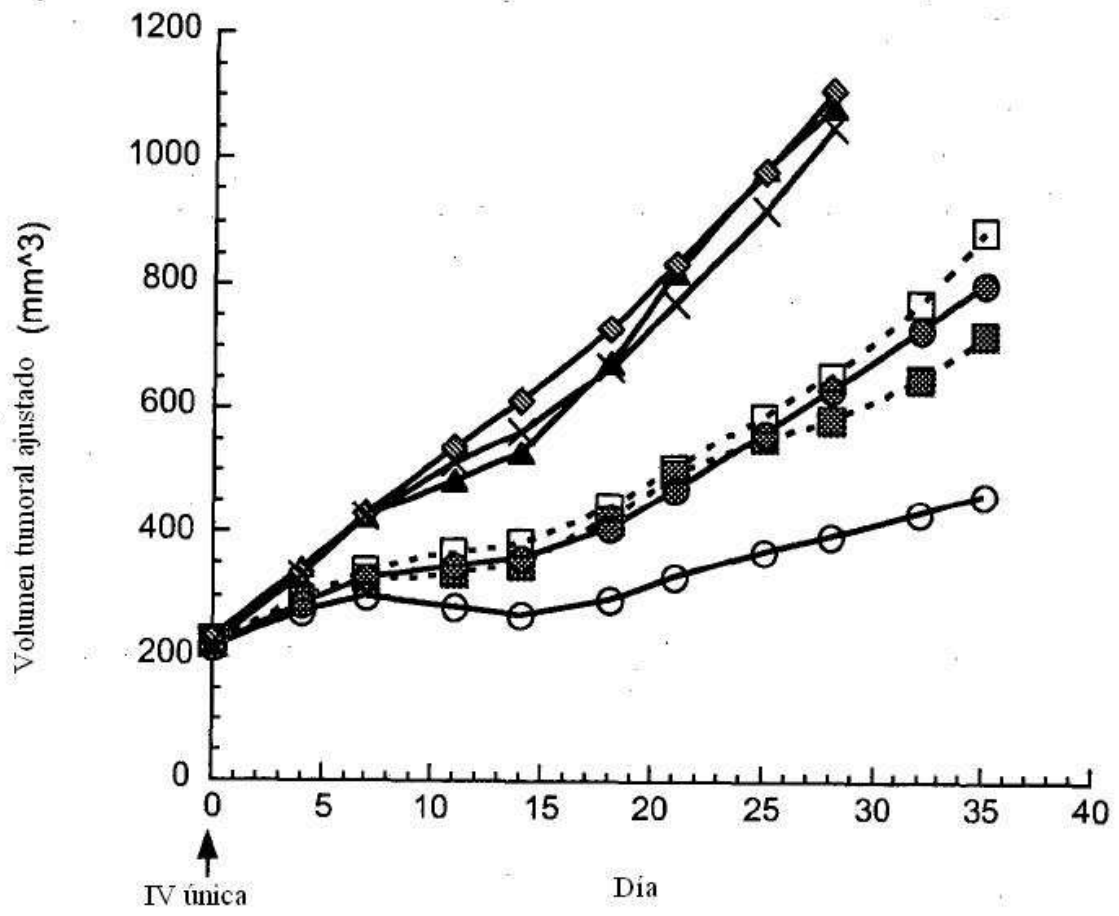


Figura 6